

**Sequenz-definiert sulfatierte und sulfonierte
Glykooligo(amidoamine) und deren
Präsentation auf Membranen**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von

Miriam Hoffmann

aus Düsseldorf

Düsseldorf, November 2022

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. PD Dr. Klaus Schaper

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2023

Eidesstattliche Versicherung

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.

Name

Ort, Datum

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Laura Hartmann dafür bedanken, dass sie mir die Gelegenheit gegeben hat in ihrer Arbeitsgruppe an einem überaus spannenden und interessanten Thema zu arbeiten und zu diesem Thema meine Dissertation anzufertigen. Ich danke ihr für die vielen produktiven Gespräche und für ihr Vertrauen in mich. Ich danke ihr ebenso für die Möglichkeit meine Forschungsergebnisse auf verschiedenen Konferenzen vorstellen zu dürfen. Prof. Dr. Hartmann hat mir durch ihre unterstützende und enthusiastische Art genauso wie durch ihr fachliches Wissen immer wieder neue Motivation gegeben.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Klaus Schaper für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit bedanken.

Ich danke Prof. Dr. Nicole L. Snyder für die produktive Zusammenarbeit an mehreren Projekten und Publikationen und für die zahlreichen Gespräche. Sie hat es auch in frustrierenden Zeiten immer wieder geschafft, die richtigen Worte zu finden. Ich bedanke mich auch für ihre fortwährende Unterstützung bei sprachlichen Verbesserungen und fachlichen Fragestellungen und ihre stets positive Art, die oft genug ansteckend war.

Ein weiterer Dank richtet sich an das Team der Arbeitsgruppe Hartmann. Besonders Frau Dr. Monir Tabatabai, Frau Stephanie Scheelen und Frau Michaela Kitza danke ich für ihre Unterstützung. Ebenfalls danke ich Frau Sonja Coors und Frau Birgit Ohler für ihre Hilfe und für eine schöne gemeinsame Bürozeit.

Ein besonderer Dank geht an Nils Schomann, der durch seine hervorragende fachliche Arbeit im Rahmen seiner Masterarbeit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat und mit dem die Zusammenarbeit auch auf persönlicher Ebene immer eine große Bereicherung war.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen Kooperationspartner*innen am CICbioGUNE und hier besonders bei Marta Gutierrez Lete und Prof. Dr. Jesús Jimenéz-Barbero. Vielen Dank für die produktive Zusammenarbeit und vielen Dank auch für den engen fachlichen Austausch.

Ein großer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe. Danke Luca-Cesare Blawitzki für all deine Hilfe und für die genialen gemeinsamen Zeiten in Labor und Büro. Ebenso danke auch an Robert Steinfort als zweiten Büro- und zeitweise Laborkollegen für die immer wieder witzigen und herzlichen Gespräche. Danke an alle meine weiteren Laborpartner Patrick Konietzny, Lorand Bonda, Nicole Hugo und Simon Walber, mit denen allen die Zusammenarbeit immer sehr viel Spaß gemacht hat und die alle nicht zuletzt durch ihren hervorragenden Musikgeschmack zur guten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Danke an Serap Üclü für die tolle Teamarbeit im Biopraktikum und an der Frauenklinik. Ich bin außerdem sehr dankbar für die Klassenfahrten, Grill- und Sozialraumabende und für die generell immer sehr freundschaftliche und gute Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Danke an Dr. Ulla Gerling-Driessen und Dr. Stephen Hill, die als Postdocs ganz besondere Vorbilder waren und unendlich viel fachlichen und persönlichen Rat geben konnten.

Danke auch an die ehemaligen Doktoranden und Masteranden, die zu wichtigen Freunden für mich geworden sind und mir ebenfalls immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Ich danke für das Korrekturlesen von Publikationen und der Dissertation ganz besonders: Luca-Cesare Blawitzki, Nicholas Jäck, Alisa Kayser, Nicole L. Snyder, Serap Üclü und Melina Feldhof.

Zum Abschluss richtet sich mein größter Dank an meine Familie und engen Freunde. Ihr habt mich immer unterstützt und mir auch in stressigen oder frustrierenden Zeiten immer wieder Kraft gegeben. Ich bin euch unglaublich dankbar für euer Vertrauen. Ich danke ganz besonders meinen Eltern, die immer für mich da sind und ohne die ich nicht der Mensch geworden wäre, der ich heute bin. Zuallerletzt ein Dankeschön für unsere Familienfrauenabende an meine Mutter, meine Tante und meine Cousine. Das waren immer wieder ganz besondere Momente, die mir neue Kraft für kommende Aufgaben gegeben haben.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	I
Liste der Publikationen	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Glykobiologie – Kohlenhydrate und ihre Rolle in der Natur.....	1
1.1.1 Lektin-Kohlenhydrat-Interaktionen – Design von Galektinliganden.....	3
1.1.2 Glykosaminoglykane in Interaktionen mit Proteinen – ihre Rolle als Virusrezeptoren.....	10
1.1.3 Die Zellmembran als Schauplatz von Kohlenhydrat-Rezeptor-Wechselwirkungen – die Rolle der Ligandpräsentation	17
1.2 Glykomimetika zur Untersuchung von Ligand-Protein-Interaktionen	19
1.2.1 Unterschiede beim Design von Glykomimetika zur Ansteuerung der sGAG-bindenden Proteine und von Lektinen	20
1.2.2 Polymer-sGAG-Mimetika zur Ansteuerung HSPG-bindender Proteine	21
1.2.3 Glykomimetika mittels Festphasensynthese.....	23
2 Zielsetzung und Gliederung.....	28
3 Ergebnisse und Diskussion	30
3.1 Synthese segmentweise sulfatierter Präzisionsglykomakromoleküle als sGAG-Mimetika mittels Festphasensynthese	30
3.1.1 Etablierung eines Syntheseprotokolls zur Herstellung sulfatierter Glykooligo(amidoamine) auf der Festphase	31
3.1.2 Synthese sulfatierter GlcNAc-funktionalisierter Oligo(amidoamine) mit spezifisch variierbaren Eigenschaften als sGAG-Mimetika.....	35
3.1.3 Koagulationsstudien mit sulfatierten GlcNAc-funktionalisierten Oligo(amidoaminen)	40
3.2 Synthese Membrananker-tragender sGAG-Mimetika und deren Anwendung in ersten Studien zu Virus-Membran-Interaktionen	43
3.2.1 Funktionalisierung von Liposomen mit Fondaparinux.....	44
3.2.2 Etablierung einer Plattform zur Synthese verschiedener sGAG-mimetischer Glykomakromoleküle mit Membrananker.....	50
3.2.3 Erste Studien zur Interaktion von Virus-ähnlichen Partikeln mit membranverankerten sGAG-Mimetika	60
3.3 Synthese und Liposom-Inkorporation von heteromultivalenten Glykomakromolekül-Lipid-Konjugaten zur Ansteuerung von Interaktionen mit Gal-1 und Gal-3 und deren Studie mittels NMR	66

3.3.1	Festphasensynthese von homo- und heteromultivalenten Oligo(amidoaminen) zur Adressierung von Galektinen.....	68
3.3.2	Ligand-Lipid-Konjugation zur Präsentation homo- und heteromultivalenter Galektinliganden auf der Oberfläche von Liposomen.....	71
3.3.3	Studie von Galektin-Ligand-Wechselwirkungen – Interaktionen in Lösung und auf Modellmembranen – mittels NMR, Cryo-EM und Molekulardynamik-Simulationen	73
4	Zusammenfassung und Ausblick	85
5	Experimentalteil.....	92
5.1	Materialien	92
5.2	Analytische Methoden und verwendete Geräte	93
5.3	Generelle Methoden	94
5.4	Synthesen	98
5.4.1	Festphasensynthese von sequenz-definierten Glykooligo(amidoaminen) als sGAG-Mimetika.....	98
5.4.2	Synthese von Fondaparinux-funktionalisierten Liposomen	106
5.4.3	Festphasensynthese von Glykooligo(amidoaminen) und deren Membranankertragenden Analoga zur Untersuchung gegenüber Viren.....	108
5.4.4	Festphasensynthese von sequenz-definierten funktionalisierten Oligo(amidoaminen) zur Ansteuerung von Galektinen.....	118
5.4.5	Synthese von Ligand-Lipid-Konjugaten.....	123
6	Anhang.....	126
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	126
6.2	Tabellenverzeichnis	138
6.3	Analytik.....	140
7	Literaturverzeichnis	187

Kurzzusammenfassung

Die Glykokalyx, eine strukturell komplexe Schicht aus Polysacchariden auf der Zellmembran, ist Schauplatz zahlreicher Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen, über die verschiedenste biologische Prozesse gesteuert werden. In Zeiten der COVID-19-Pandemie sind besonders die Anbindungsprozesse von Viren über die Proteine des Virions an die Glykokalyx in den Fokus der Forschung gerückt. Hierbei spielen häufig sulfatierte Glykosaminoglykane (sGAGs), bei denen es sich um anionische lineare Polysaccharide handelt, eine wichtige Rolle. Diese sind in Form von Proteoglykanen in der Zellmembran verankert, wobei besonders Heparansulfatproteoglykane einen Großteil der Proteininteraktionen im Organismus vermitteln und somit von großem Interesse für die Erforschung solcher Interaktionen sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass beispielsweise lösliche Heparansulfate oder strukturell verwandte Polysaccharide, aber auch synthetische polymere Analoga zur Inhibition der Virusinfektion genutzt werden können, da sie an die Virusproteine anlagern und so die vorhandenen Bindungsstellen blockieren.

Ein großes Hindernis bei der Entwicklung solcher Inhibitoren, aber auch allgemein bei der Untersuchung von Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen, ist die inhärente Heterogenität und die aufwändige Isolierung natürlicher Polysaccharide. Daher werden häufig synthetische, polymere Analoga der natürlichen Strukturen verwendet, die auch als Glykomimetika bezeichnet werden und deren hohe strukturelle Definition unter anderem die Entschlüsselung von Struktur-Wirkung-Beziehungen erlaubt. So wurde von Hartmann *et al.* die Festphasensynthese unter Verwendung maßgeschneiderter Bausteine zur Herstellung von Glykooligo(amidoaminen) als eine Klasse von Glykomimetika entwickelt, die sich besonders durch ihre Sequenzdefinition und geringe Dispersität auszeichnet (siehe Abbildung 1 oben).

Zur Untersuchung von Kohlenhydrat-vermittelten Adhäsionsprozessen mit Hilfe von Glykomimetika stand im Fokus der vorliegenden Arbeit die Entwicklung von Glykooligo(amidoaminen) als Heparansulfat-Mimetika und deren Präsentation auf Membransystemen zur Untersuchung der Anbindung von Virus-ähnlichen Partikeln. Darüber hinaus wurden Glykooligo(amidoamine) zur Studie der Anbindungsprozesse von Galektinen an Vesikelmembranen untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Synthese einer neuen Klasse von Glykomimetika entwickelt (siehe Abbildung 1 – Kapitel 1). Entlang der Polysaccharidketten natürlicher Heparansulfate wechseln sich stark, gering und nicht sulfatierte Bereiche ab. Über die Bedeutung dieses strukturellen Parameters für die biologische Funktion der Heparansulfate ist, auch aufgrund fehlender strukturell definierter Glykomimetika zu deren Untersuchung, bisher wenig bekannt. Im ersten Teil der Arbeit wurde daher die Synthese sequenz-definiert sulfatierter Glykooligo(amidoamine) als Heparansulfatmimetika realisiert, die es nun ermöglicht, die Sequenz der natürlichen Polysaccharide nachzuahmen. Hierzu wurde die Verwendung eines photospaltbaren Linkers für die Festphasensynthese nach Hartmann *et al.* etabliert, was, im Vergleich zu vorherigen Syntheserouten, erstmalig die Sulfatierung der Glykooligo(amidoamine) auf der Festphase ermöglichte. Darauf basierend konnte durch Weiterentwicklung des Protokolls die Synthese von Strukturen, die im Wechsel Segmente

Kurzzusammenfassung

sulfatierter und nicht sulfatierter Kohlenhydratmotive aufweisen, durchgeführt werden. Zudem konnte durch Verwendung von Oligoprolineinheiten die Zusammensetzung des Glykomakromolekülrückgrats variiert werden. Da sulfatierte Glykooligo(amidoamine), wie vorherige Arbeiten gezeigt haben, potenziell als Virusinhibitoren verwendet werden können, wurde anschließend zum ersten Mal auch deren Einfluss auf die Blutgerinnung untersucht. Antikoagulative Eigenschaften, wie sie für verschiedene sGAGs und sGAG-Mimetika beobachtet werden, können bei medizinischen Anwendungen potenziell ungewünschte Kreuzreaktivitäten hervorrufen. Die hergestellten global und segmentweise sulfatierten Glykooligo(amidoamine) zeigten jedoch im getesteten Konzentrationsbereich nur geringe antikoagulative Aktivität.

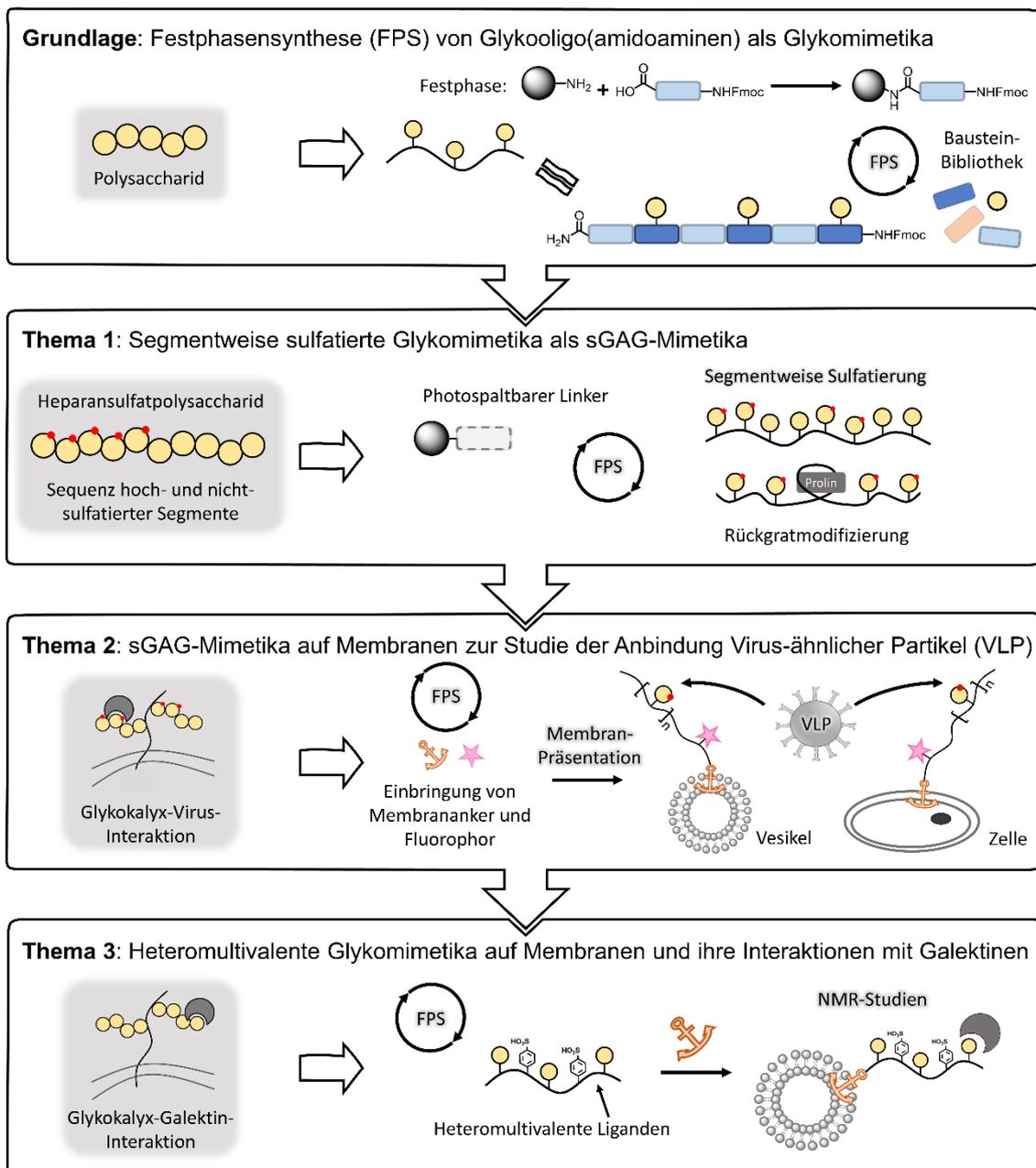


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kapitel der vorliegenden Arbeit basierend auf der Festphasensynthese nach Hartmann et al. (oben) mit dem übergeordneten Ziel die Untersuchung von Ligand-Protein-Interaktionen auf Membranen zu ermöglichen.

Basierend auf dem ersten Teil der Arbeit wurde anschließend die Funktionalisierung sGAG-mimetischer Glykooligo(amidoamine) sowie weiterer sGAG-Mimetika mit Membranankern, deren Inkorporierung in künstliche und natürliche Membranen und die Untersuchung der Virusproteinanbindung an die dekorierten Membransysteme durchgeführt (siehe Abbildung 1 – Kapitel 2). Virus-Glykan-Interaktionen laufen auf der Glykokalyx und somit als Teil eines komplexen und dynamischen Ensembles ab und werden maßgeblich durch das Membranverhalten der beteiligten Glykoproteine- und lipide sowie auch durch andere dort verankerte Glykane beeinflusst. Daher ist die Untersuchung von Virus-Ligand-Interaktionen in Lösung nicht ausreichend, um die natürlichen Prozesse vollständig zu entschlüsseln. Stattdessen können künstliche Membransysteme, wie beispielsweise Vesikel aus Lipiddoppelschichten, als Modelle der Zellmembran verwendet werden. Ein weiteres Werkzeug stellt die Manipulation der natürlichen Glykokalyx im Rahmen des *de novo Glycocalyx Engineering* dar. Daher wurden diese Methoden nun für sGAG-Mimetika zur Studie von Virus-Membran-Interaktionen untersucht. Als synthetische Werkbank für die Einführung von Membranankern, die den Einbau in Lipiddoppelschichten erlauben, wurde die Festphasensynthese gewählt und weiterentwickelt, sodass sGAG-mimetische Glykooligo(amidoamine) mit verschiedenen Lipiden funktionalisiert und die so erhaltenen Strukturen anschließend in Vesikelmembranen eingebaut werden konnten. Über die etablierte Synthesepattform konnten zudem auch andere Modifikationen, wie die Anbringung eines Farbstoffs, vorgenommen werden, und sie kann als modularer Ansatz auch in zukünftigen Arbeiten eine große Bandbreite an Membrananker-tragenden Glykomimetika zugänglich machen. Darüber hinaus konnten in einem separaten Ansatz vorformulierte Vesikel mit dem kommerziell erhältlichen sGAG-Pentasaccharid Fondaparinux dekoriert werden. Erste Studien mit dekorierten Vesikelmembranen, aber auch mit nachträglich modifizierten Membranen von Zellen zeigten, dass Virus-ähnliche Partikel die präsentierten Glykomimetika zur Anbindung nutzen. Die vorgestellten Arbeiten erlauben somit die zielgerichtete Untersuchung struktureller Parameter der Virusanbindung auf dynamischen Membransystemen, wie sie für den Infektionsprozess von entscheidender Rolle sind, wodurch potenziell wichtige Erkenntnisse zu den ablaufenden Mechanismen sowie zum Design von Inhibitoren zugänglich gemacht werden können.

Das Prinzip der Präsentation von Liganden auf Vesikelmembranen als Glykokalyxmimetika zur Untersuchung von Adhäsionsprozessen ist auch für andere Proteine von großem Interesse und wurde im letzten Abschnitt dieser Arbeit auf die Studie von Galektinen, β -Galaktosid-bindenden Proteinen, übertragen, die insbesondere bei der Zelladhäsion von Tumorzellen von Bedeutung sind. Die Studie von Galektinen mit Hilfe solcher Systeme bietet großes Potenzial, da diese einen Großteil ihrer natürlichen biologischen Aktivität über die Bildung von Glykan-Protein-Clustern auf der Glykokalyx ausüben, wozu sie oligomerisieren und multiple Interaktionen mit mehreren Glykanen eingehen können. Es treten dabei sogenannte multivalente Effekte auf, die die Gesamtbindungsstärke erhöhen. Von Freichel *et al.* vorgestellte potente heteromultivalente Glykooligo(amidoamin)-Galektinliganden wurden nun erstmalig mit Membranankern funktionalisiert und in die Membran von Vesikeln inkorporiert (siehe Abbildung 1 – Kapitel 3). Zur Studie der Interaktion mit den ausgewählten Galektinen, Galektin-1 und Galektin-3, wurden insbesondere NMR-Experimente verwendet, da diese es erlauben, das System in einem dynamischen Zustand zu untersuchen. Die NMR-

Kurzzusammenfassung

Experimente sowie ergänzend Cryo-Elektronenmikroskopie und Molekulardynamik-Simulationen wurden in Zusammenarbeit mit Kooperationspartner*innen am Institut CICbioGUNE in Derio (Spanien) unter der Leitung von Prof. Dr. Jesús Jiménez-Barbero durchgeführt. Die Untersuchung der Liganden ohne Membrananker in Lösung erlaubte es zunächst mittels *saturation-transfer difference* NMR bisher fehlende Informationen zu den strukturellen Parametern der Interaktion zu erhalten. Anschließend konnte die Studie der Ligand-funktionalisierten Vesikeln die Bedeutung der Membranpräsentation für die Untersuchung von Ligand-Protein-Interaktionen aufzeigen. So konnten Hinweise zur Entstehung von Clustern auf den Vesikeln und auf das Ablaufen multivalenter Prozesse erhalten werden, die durch die Präsentation der Liganden auf der dynamischen Vesikelmembran begünstigt werden können. Allgemein ist die vorgestellte Verwendung von Ligand-funktionalisierten Vesikeln zur Untersuchung von Proteininteraktionen mittels NMR insbesondere unter Verwendung multivalenter Liganden eine der ersten Studien dieser Art. Um die natürliche Situation auf der Glykokalyx besser verstehen zu können, ist die Verwendung von Membransystemen im dynamischen Zustand von großer Bedeutung. Die vorgestellten Studien zeigen, dass Glykooligo(amidoamine) als multivalente Liganden präsentiert auf der Membran von Vesikel in Kombination mit NMR-Studien die Betrachtung von Proteininteraktionen unter diesem Aspekt ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten somit durch die Etablierung der segmentweisen sowie globalen Sulfatierung von Glykooligo(amidoaminen) Mimetika natürlicher sGAGs zugänglich gemacht werden. Die Einführung von Lipiden erlaubte wiederum die Inkorporierung von sGAG-Mimetika in Membranen, sodass die Untersuchung der Anbindung virusähnlicher Partikel auf künstlichen sowie natürlichen Membranen ermöglicht wurde. Ebenso konnten durch Membran-verankerte Galektinliganden die Interaktionen von Galektin-1 und Galektin-3 mittels NMR-Methoden mit Ligand-funktionalisierten Vesikeln untersucht werden. Insgesamt wurden also basierend auf der Festphasensynthese von Glykooligo(amidoaminen) neue synthetische Möglichkeiten zur Nachahmung und Untersuchung von Protein-Glykokalyx-Interaktionen geschaffen, die es ermöglichen können, neue Parameter dieser Prozesse zu entschlüsseln.

Liste der Publikationen

Veröffentlichungen, die Teil dieser Arbeit sind:

M. Hoffmann, N. L. Snyder, L. Hartmann

“Glycomacromolecules with Sequence-Defined Sulfation and Rigidity Patterns”

Biomacromolecules 2022, 23 (9), 4004-4014.

Eigenanteil: Gemeinschaftliche Projektentwicklung. Entwicklung des Festphasensynthese-Protokolls unter Einsatz des photospaltbaren Linkers und Synthese aller sulfatierten und nicht sulfatierten Glykomakromoleküle. Charakterisierung der Produkte (LC-MS, ¹H-NMR, Elementaranalyse, HR-ESI-MS) und Vorbereitung der Proben zur Studie der antikoagulativen Eigenschaften, die am Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf unter Leitung von Dr. Hermsen durchgeführt wurde. Mitarbeit an der Verfassung der Publikation.

M. Hoffmann, N. L. Snyder, L. Hartmann

“Polymers Inspired by Heparin and Heparan Sulfate for Viral Targeting”

Macromolecules 2022, 55 (18), 7957-7973.

Perspective-Artikel

Eigenanteil: Durchführung von Literaturrecherche und Mitarbeit an der Verfassung der Publikation inklusive Erstellung von Grafiken.

Publikationen in Vorbereitung:

M. G. Lete[†], M. Hoffmann[†], N. Schomann, A. Martínez-Castillo, F. Peccati, S. Delgado, N. L. Snyder, G. Jiménez-Oses, N. G. A. Abrescia, A. Ardá, L. Hartmann, J. Jiménez-Barbero

[†] Die Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

„Molecular Recognition of Lactose-Bearing Glycomacromolecules Presented at Membrane Surfaces by Galectins: An NMR View”

Eigenanteil: Gemeinschaftliche Projektentwicklung mit den Kooperationspartnern. Synthese und Charakterisierung (LC-MS, ¹H-NMR, MALDI-TOF-MS, HR-ESI-MS) der folgenden Strukturen: (1,3,5)-Lac-(2,4,6)-EDS-6, (1)-Lac-(2,3)-EDS-(4)- α Ala-4, (1,3,5)-Glc-(2,4,6)-EDS-6 und der entsprechenden Lipidkonjugate. Betreuung der Synthese der weiteren Glykooligomere und der entsprechenden Lipidkonjugate durch Nils Schomann im Rahmen seiner Masterarbeit. Mitarbeit an der Verfassung der Publikation.

L. Bonda, M. Hoffmann, S. Ueclue, S. Ludwig, N. L. Snyder, M. Schelhaas, L. Hartmann

„Synthetic glycopolymers as inhibitors of SARS-CoV-2 cell attachment and infection”

Eigenanteil: Gemeinschaftliche Entwicklung des Projekts mit den Kooperationspartnern. Synthese und Charakterisierung der nonavalenten Glykooligomere. Vorbereitung,

Liste der Publikationen

Organisation und Unterstützung bei der Durchführung der Studie der antikoagulativen Eigenschaften, die am Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf unter Leitung von Dr. Hermsen durchgeführt wurde. Mitarbeit an der Verfassung der Publikation.

M. Hoffmann[†], L. C. Blawitzki[†], K. Schmidt, L. Bonda, R. Groza, H. Ewers, L. Hartmann

[†] Die Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

„Presentation of sulfated Glycosaminoglycan Mimetics on Synthetic and Natural Membranes and Their Interactions with Virus-like Particles of HPV16“

Eigenanteil: Gemeinschaftliche Entwicklung der Projektidee. Funktionalisierung von vorformulierten Vesikeln mit Fondaparinux und deren Charakterisierung. In paritätischer Arbeitsteilung mit L.C. Blawitzki Synthese und Charakterisierung (LC-MS, ¹H-NMR, Elementaranalyse, HR-ESI-MS) der vorgestellten oligomeren Zielstrukturen (ausschließlich der Polymere) und Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie der Virusstudien. Mitarbeit an der Verfassung der Publikation.

U. I. M. Gerling-Driessen, Miriam Hoffmann, Stephan Schmidt, Nicole Snyder, L. Hartmann

„Glycopolymers against pathogen infection“

Eigenanteil: Literaturrecherche und Unterstützung bei der Verfassung des Manuskripts.

Weitere Publikationen, die nicht Teil dieser Arbeit sind:

T. Freichel, D. Laaf, M. Hoffmann, P. B. Konietzny, V. Heine, R. Wawrzinek, C. Rademacher, N. L. Snyder, L. Elling, L. Hartmann

“Effects of Linker and Liposome Anchoring on Lactose-Functionalized Glycomacromolecules as Multivalent Ligands for Binding Galectin-3“

RSC Adv. 2019, 9 (41), 23484-23497.

Präsentationen bei wissenschaftlichen Konferenzen:

M. Hoffmann, L. Bonda, L.-C. Blawitzki, R. Groza, H. Ewers, M. Schelhaas, N.L. Snyder, L. Hartmann

„Polymer Chemistry meets Virology – Sulfated Glycomacromolecules as GAG Mimetics“

Makromolekulares Kolloquium, Februar, 23.-25. Februar 2022, Freiburg.

T. Freichel, M. Hoffmann, D. Laaf, R. Wawrzinek, P.B. Konietzny, C. Rademacher, S. Sarafova, L. Elling, N.L. Snyder, L. Hartmann

„Synthesis of Lactose-Functionalized Precision Glycomacromolecules for Understanding the Role of Galectin-3 in Tumor Migration“

Makromolekulares Kolloquium, 20.-22. Februar 2019, Freiburg.

T. Freichel, M. Hoffmann, D. Laaf, V. Heine, R. Wawrzinek, E. E. Mackintosh, C. Rademacher, S. Sarafova, L. Elling, N.L. Snyder, L. Hartmann

“Homo- and Heteromultivalent Precision Glycomacromolecules and their Lipid-Conjugates as Tools for Studying Carbohydrate-Protein Interactions”

ACS Spring Meeting 2021, Macromolecular Chemistry: The Second Century, 5.-16. April 2021.

1 Einleitung

1.1 Glykobiologie – Kohlenhydrate und ihre Rolle in der Natur

Die Bedeutung von Kohlenhydraten und Glykanen in biologischen Prozessen ist lange unterschätzt worden. So lag der Schwerpunkt der Molekularbiologie in ihren Anfängen in den 1950er bis 1970er Jahren auf der Erforschung der beiden anderen Hauptklassen biologischer Polymere, der DNA und den Proteinen.¹ Der Begriff Glykobiologie hingegen wurde erst in den späten 1980er Jahren geprägt, als klar wurde, dass Kohlenhydrate und Glykane eine wichtige Rolle in zahlreichen biologischen Prozessen einnehmen.¹⁻⁶ So sind Glykane und Glykoproteine, also Protein-konjugierte Kohlenhydrate, essentiell für Prozesse wie Befruchtung, Immunabwehr, Virusreplikation, Zellwachstum und Entzündungen.^{3,7-10} Folgerichtig gelten Glykane und die Glykobiologie als die „schwarze Materie“ des biologischen Universums, deren Bedeutung lange vernachlässigt wurde und deren Anerkennung als elementarer Bestandteil des natürlichen biologischen Systems zu einem Umdenken in der biologischen Forschung führen musste.¹¹

Doch wo liegen die Gründe für diese Diskrepanz und wo liegen die Herausforderungen in der Erforschung von Glykanen? Zum einen weisen Glykane eine außerordentliche Komplexität auf. Im Gegensatz zu Proteinen und der DNA können Glykane verzweigt sein und die Monosaccharide in einem Glykan sind über stereochemisch variable Bindungen zwischen dem anomeren Zentrum des einen Zuckers und den verschiedenen Hydroxylgruppen des nächsten Zuckers verknüpft. Darüber hinaus wird die Diversität der Glykane während ihrer Biosynthese durch Funktionalisierungen wie Sulfatierung, Acetylierung oder Phosphatisierung sowie die Konjugation an Proteine und Lipide weiter erhöht.^{3,12-13} Zum anderen ist die Aufklärung der Glykanbiosynthese weitaus aufwändiger als die der DNA und Proteine, bei der die DNA die Bauanleitung zur Proteinsynthese liefert. Ein weiteres Hindernis bei der Untersuchung von Glykanen war lange Zeit der Mangel an Methoden zur Extraktion und Sequenzierung, also zur Strukturaufklärung natürlicher Polysaccharide.^{3,7,13-14}

Heute, nach 40 Jahren intensiver Forschung, ist die Glykobiologie in ihrem Kenntnisstand so weit vorangeschritten, dass beispielsweise Ajit Varki in seinem Review zur biologischen Rolle von Glykanen schon ganz zu Beginn feststellt, dass eine umfassende Diskussion aller publizierten Erkenntnisse zu diesem Thema unmöglich ist.¹³ Glykane liegen in der Natur vorwiegend als Konjugate in Form von Glykoproteinen und Glykolipiden vor und dekorieren so unter anderem alle Zellen im menschlichen Körper, wo sie die sogenannte Glykokalyx bilden (siehe Abbildung 2).¹⁵⁻¹⁷

Einleitung

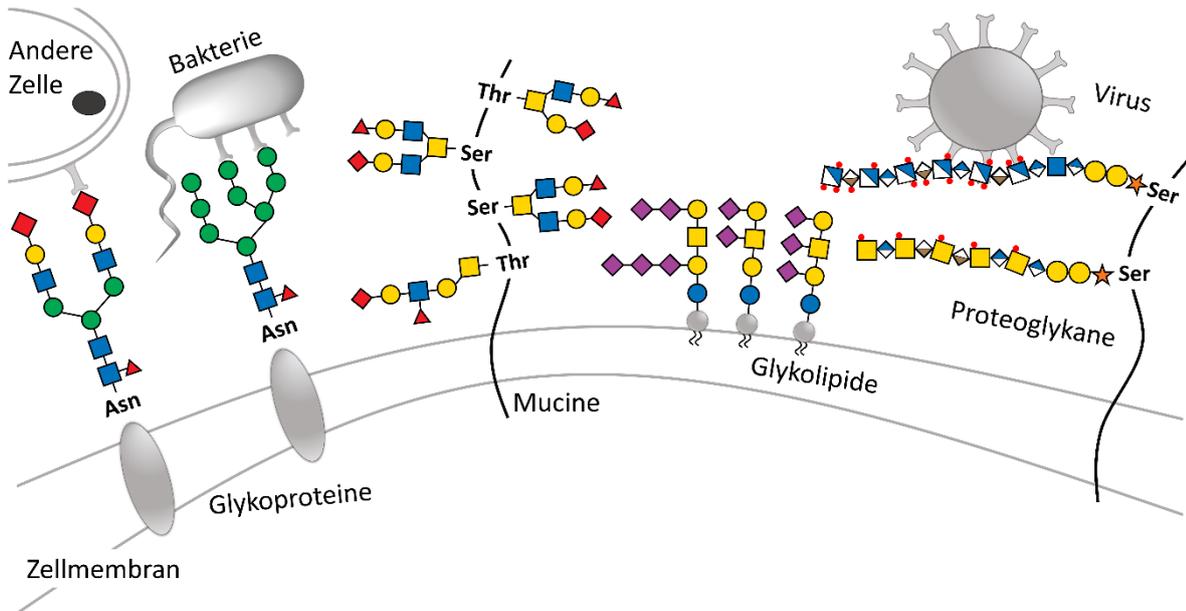


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Glykokalyx und der Interaktion von Proteinen, z.B. von Bakterien, Viren oder anderen Zellen, mit den präsentierten Glykanen, die an Lipide und Proteine konjugiert vorliegen.

Viele Prozesse wie Zell-Zell- und Zell-Pathogen-Interaktionen werden durch die Wechselwirkungen Kohlenhydrat-erkennender Proteine mit den Glykanen der Glykokalyx vermittelt und Fehlregulierungen in der Glykosylierung sind eng verknüpft mit Krankheitsprozessen.^{15,18-20} Daher besitzen Glykane und ihre biologische Funktion eine große pharmazeutische Bedeutung und werden auch im Kontext der medizinischen Forschung eingehend untersucht.^{15-16,18,21-23} Im Menschen vorkommende Glykane bestehen hauptsächlich aus den folgenden zehn Monosacchariden: Glukose (Glc), Galaktose (Gal), *N*-Acetylglukosamin (GlcNAc), *N*-Acetylgalaktosamin (GalNAc), Fucose (Fuc), Xylose (Xyl), *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), Glucuronsäure (GlcA), Mannose (Man) und Iduronsäure (IdoA) (siehe Abbildung 3).^{14-15,24-25}

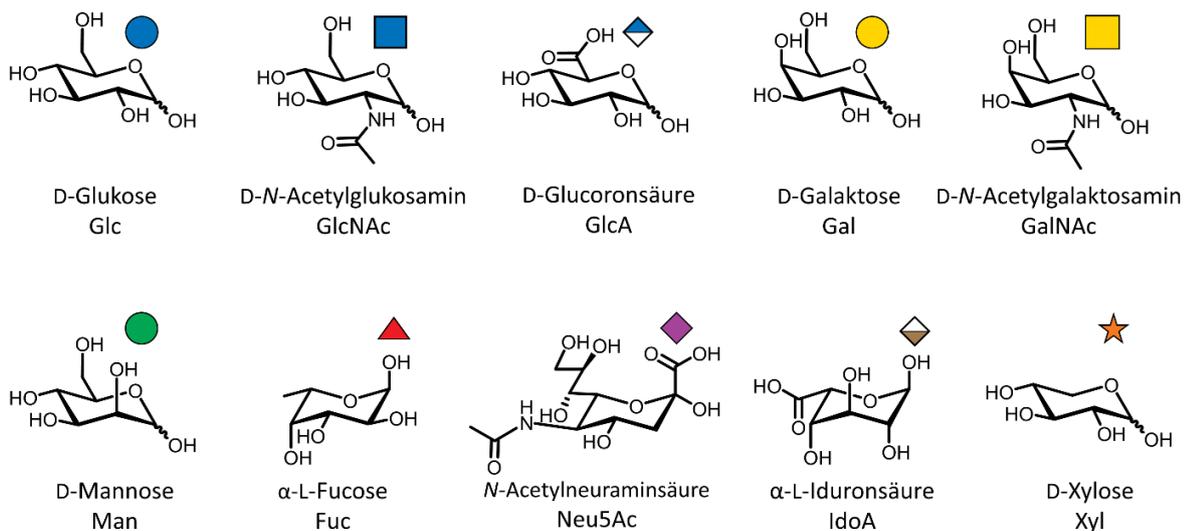


Abbildung 3: Die häufigsten natürlichen Monosaccharide: Glukose (Glc), Galaktose (Gal), *N*-Acetylglukosamin (GlcNAc), *N*-Acetylgalaktosamin (GalNAc), Fucose (Fuc), Xylose (Xyl), Sialinsäure (Neu5Ac), Glucuronsäure (GlcA), Mannose (Man) und Iduronsäure (IdoA).

Kohlenhydrat-erkennende Proteine können in zwei Klassen unterteilt werden. Lektine binden über ihre Kohlenhydrat-erkennenden Domänen (englisch: *carbohydrate recognition domain*, CRD), also über definierte Bindungstaschen, terminale Mono- und Oligosaccharide von Glykanen. Dahingegen binden Glykosaminoglykan(GAG)-bindende Proteine negativ geladene, meist sulfatierte, Polysaccharid-Ketten über positiv geladene Aminosäuren auf der Proteinoberfläche.²⁶ Durch Protein-Glykan-Interaktionen werden so Prozesse wie Zellkommunikation, Interaktionen mit Mikroben sowie mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die Zellbewegungen ermöglichen, Proteintransport, Zelladhäsion und die Immunantwort vermittelt.^{1,8,27-31}

1.1.1 Lektin-Kohlenhydrat-Interaktionen – Design von Galektinliganden

Lektine werden basierend auf ihrer CRD in verschiedene Familien unterteilt und wurden 1888 in Extrakten von Rizinussamen entdeckt.³²⁻³⁴ Grundlegendes Prinzip der reversiblen Lektin-Kohlenhydrat-Interaktionen ist die Multivalenz. Die Bindungsaffinitäten einzelner Kohlenhydrat-basierter Rezeptor-Ligand-Interaktionen sind relativ schwach. Treten jedoch mehrere Liganden bzw. Rezeptoren gleichzeitig in Wechselwirkung zueinander, so können multivalente Effekte auftreten, wie Rezeptor-Clustering, statistische Effekte wie *statistical rebinding* und Chelatbindungen, die die tatsächliche Bindungsstärke erhöhen.³⁵⁻³⁶ Multivalente Wechselwirkungen sind immer dann möglich, wenn die Rezeptorproteine mehrere CRDs enthalten oder clustern, sowie wenn Glykane mehrere Bindungs epitope aufweisen.^{35,37-42}

Galektine und ihre biologische Relevanz

Eine wichtige Klasse der Lektine sind die Galektine, zu deren Familie neunzehn Lektine zählen, deren CRDs sich durch eine hohe Homologie ihrer Aminosäuresequenzen auszeichnen und die β -verknüpfte Galaktose binden, wie sie z.B. in Polylaktosaminen wie Fibronectin oder Laminin vorkommt. Galektine sind kleine, lösliche Lektine, die in *Prototyp*-, *Chimera*-Typ und *Tandem-Repeat*-Typ-Lektine unterteilt werden (siehe Abbildung 4A-C).⁴³⁻⁴⁶

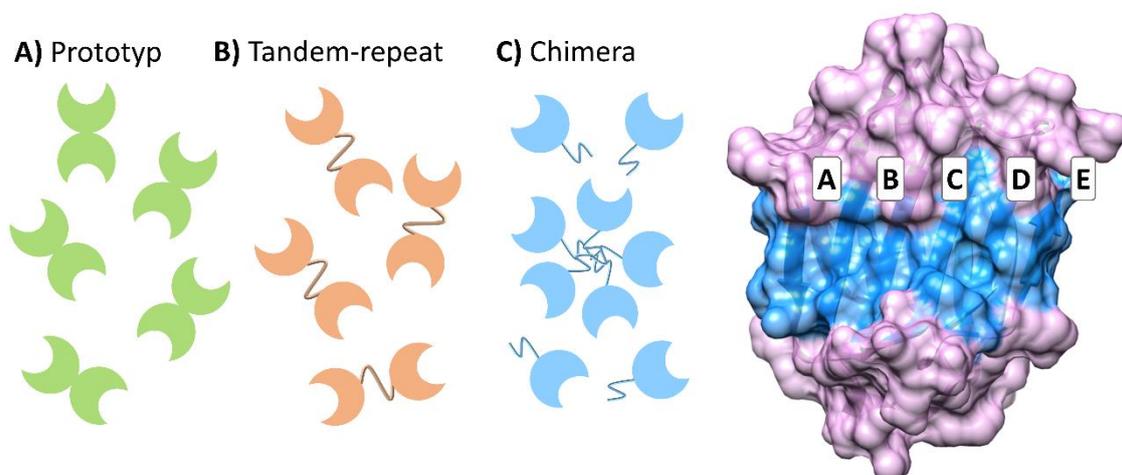


Abbildung 4: Schematische Struktur der Galektinklassen: A) Prototyp; B) Tandem-repeat; C) Chimera; sowie Darstellung der Proteinstruktur von Gal-3 mit den Untereinheiten der CRD (PDB ID: 1A3K).

Einleitung

Prototyp-Galektine (Gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15, -17, -29, -20) bestehen aus zwei gleichen CRDs, die über elektrostatische Wechselwirkungen Homo-Dimere bilden. Galektin-3 ist das einzige *Chimera*-Typ Galektin und besitzt neben der CRD eine *N*-terminale Domäne, über die es durch nicht-kovalente Wechselwirkungen pentamerisieren kann, was durch die Anwesenheit multivalenter Liganden gefördert wird. *Tandem-repeat*-Galektine hingegen (Gal-4, -6, -8, -9, -12) bestehen aus zwei verschiedenen CRDs, die über ein Linkerpeptid verbunden sind.^{43-44,47-48}

Galektine kommen sowohl intra- als auch extrazellulär vor und werden über nicht-klassische Wege, also unabhängig vom klassischen durch Golgi-Apparat und Endoplasmatisches Retikulum gesteuerten Prozess, sekretiert. Sie können wie bereits erwähnt dimerisieren oder oligomerisieren und dann mehrere Glykoproteine und -lipide auf der Zelloberfläche verknüpfen, wodurch Proteinverbände entstehen, die verschiedene Prozesse wie Zellanbindung, -migration und -kommunikation steuern.^{43,47} Wie für Lektine allgemein, gilt auch für Galektine, dass Unterschiede in ihrer Glykosylierung und Expression mit pathogenen Prozessen wie der Karzinogenese und Herz-Kreislauf-Erkrankungen verknüpft sind, weshalb sie unter anderem als Biomarker interessante therapeutische Ziele darstellen.^{43,47,49-52} Galektin-1 und Galektin-3 gehören zu den besterforschten Galektinen und ihre therapeutische Relevanz in der Behandlung von chronische Entzündungsstörungen, Fibrose und Krebs wird intensiv untersucht.^{43,47,53-59}

Gewinnung und Synthese von Galektinliganden

Um Galektine im therapeutischen Kontext anzusteuern, ist das Design und die Synthese von spezifischen Liganden von großem Interesse. Bisherige Arbeiten zu diesem Thema umfassen (chemo-)enzymatische Synthesen von Poly-*N*-Acetyllaktosaminen (Poly-LacNAc)⁶⁰⁻⁶³, die Synthese und gezielte Modifikation kleiner Moleküle als Glykomimetika⁶⁴⁻⁷⁴, sowie die Funktionalisierung künstlicher Systeme⁷⁵⁻⁷⁸, wie beispielsweise Dendrimere⁷⁹⁻⁸¹, aber auch natürlicher Träger wie Proteine⁸²⁻⁸⁵, mit Kohlenhydratepitopen zur multivalenten Präsentation. Zudem spielt auch die Gewinnung inhärent multivalenter Polysaccharid-Strukturen aus natürlichen Quellen⁸⁶⁻⁸⁸ eine wichtige Rolle.^{43,54}

Vor allem die Studien zu kleinen Molekülen als Galektin-bindende Glykomimetika haben neue Erkenntnisse zur Bindungsspezifität und zu den Einflussfaktoren auf die Galektin-Ligand-Interaktionen hervorgebracht. Grundlage für das Design von Galektinliganden ist die genaue Kenntnis der Struktur der Galektin-Bindungstasche (siehe Abbildung 4). Im Fall von Gal-3 besteht diese aus zwei Teilen, dem konservierten Teil, dessen Aminosäuresequenz also durch die verschiedenen Galektinklassen hindurch kaum variiert und die Unterabschnitte C und D umfasst sowie an den kaum definierten Abschnitt E grenzt, und dem nicht-konservierten Teil, zu dem die Unterabschnitte A und B gehören.⁸⁹ Die Unterabschnitte C und D binden mit hoher Affinität Zuckereinheiten wie LacNAc. Im Gegensatz dazu kann der nicht-konservierte Teil der Bindungstasche auch durch Epitope, die keine Kohlenhydrate sind, sogenannte sekundäre Bindungsmotive, wie beispielsweise Aromaten angesteuert werden.⁸⁹ Wegbereitend waren in diesem Kontext unter anderem die Arbeiten von Nilsson *et al.* zu funktionalisierten Mono- und

Disaccharide, an denen der positive Einfluss von Arginin-Aren- π -Interaktionen mit dem nicht-konservierten Teil der CRD untersucht wurde. Dazu wurden Aromaten an der C-3-Position von LacNAc-Derivaten eingeführt und die aromatischen Einheiten zudem durch Substituenten modifiziert.⁶⁴ Basierend auf diesen Studien dienten vor allem *N*-Acetyllaktosamin und Thiodigalaktosid (TDG) als Ausgangsstrukturen für hoch aktive Galektinliganden. Durch die Einführung von Fluoratomen an aromatischen C-3-Substituenten konnten zusätzliche vorteilhafte Fluor-Arginin-Interaktionen ermöglicht werden und auch die Einführung einer Sulfatgruppe an der C-2-Position zeigte einen positiven Einfluss.⁷¹⁻⁷² Abbildung 5 zeigt sowohl das unfunktionalisierte TDG (1) als auch Derivate mit fluorierten Aromaten (2) und Sulfatgruppen (3) als Substituenten, für die hohe Affinitäten zu Gal-3 gemessen wurden.^{67,71-74}

74

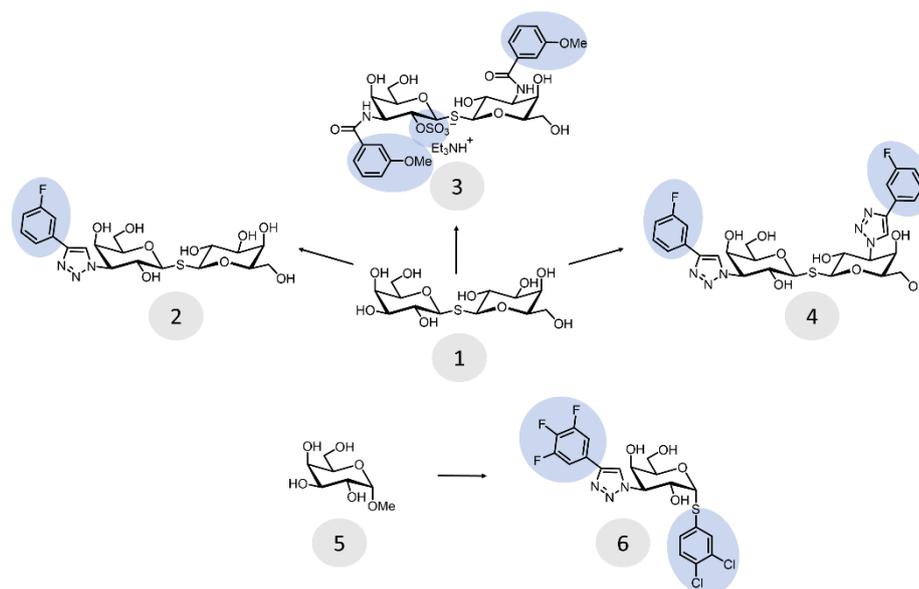


Abbildung 5: Synthetische Glykomimetika zur Ansteuerung von Gal-1 und Gal-3: Verbindung 1 – unfunktionalisiertes TDG, Verbindung 2 – TDG mit fluorsubstituiertem Aromaten an der C3-Position⁷¹, Verbindung 3 – TDG mit u.a. einem Sulfatsubstituenten an C2⁷², Verbindung 4 – TD139⁷³, Verbindung 5 – unsubstituierte Galaktose, Verbindung 6 – an C2 und C3 substituierte Galaktose⁷⁴.

Die dargestellte Verbindung TD139 (4), jetzt als GB0139 geführt, ist ein Beispiel für das erfolgreiche Design eines Galektinliganden, der aktuell in einer klinischen Phase II Studie als Medikament gegen Lungenfibrose getestet wird (siehe Abbildung 5).⁷³ Eine große Herausforderung bei der Synthese von Galektinliganden ist die Selektivität, da die CRDs der verschiedenen Galektine ähnlich beschaffen sind. Dennoch konnte durch gezielte Funktionalisierung eine Diskriminierung zwischen Gal-1 und Gal-3 erreicht werden. Zweifach mit halogenierten Aromaten substituierte Galaktose (siehe Abbildung 5, Verbindung 6) zeigte z.B. eine 100-fach größere Aktivität gegenüber Gal-3 im Vergleich zu Gal-1.⁷⁴

Wie bereits erwähnt spielen multivalente Effekte eine wichtige Rolle bei Lektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen.^{35,37-38,42} Dies wird auch bei der Ansteuerung von Galektinen ausgenutzt, indem beispielsweise künstliche Trägermaterialien mit einer großen Zahl von Bindungsepitopen funktionalisiert werden. So wurden bereits Dendrimere, Polymere oder

Einleitung

auch selbst-assemblierende Systeme wie Vesikel aus Lipiddoppelschichten, genannt Liposomen, Glykodendrimeren, amphiphile Glykopeptide und auch Calixarene als künstliches Rückgrat zur Ligandpräsentation genutzt.^{75-81,90} Durch die multivalente Präsentation, die das Auftreten multivalenter Effekte ermöglichen, können höhere Bindungsaviditäten erreicht und somit hochpotente Systeme entwickelt werden. Auch Proteine wurden bereits als biokompatible Gerüste genutzt. So wurde von Zhang *et al.* Humanalbumin mit funktionalisiertem Thiodigalaktosid dekoriert und das erhaltene Neo-Glykoprotein zeigte in ELISA-Studien (englisch: *enzyme-linked immunosorbent assay*) gegenüber Gal-3 einen IC_{50} -Wert im einstelligen nanomolaren Bereich.⁸⁴

Anwendung der Festphasensynthese zur Gewinnung von Galektinliganden

Eine andere Methode zur Synthese multivalenter Liganden ist die Festphasensynthese von Präzisionsglykomakromolekülen, die in Abschnitt 1.2.3 ausführlicher erläutert wird. Sie wurde von Freichel *et al.* zum einen zur Synthese heteromultivalenter Galektinliganden genutzt, bei denen ein Oligo(amidoamin)-Rückgrat mit Laktose und sowohl mit neutralen, als auch mit Amin- und Sulfat-/Sulfonat-funktionalisierten Aromaten als potenzielle sekundäre Bindungsepitope funktionalisiert wurde (siehe Abbildung 6).⁹¹⁻⁹² Über einen ELISA-Assay und Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (englisch: *surface plasmon resonance*, SPR) konnte gezeigt werden, dass sich die Aviditäten gegenüber Gal-3 für die heteromultivalenten Strukturen im Vergleich zur homomultivalenten Struktur um das 1,5 bis 3-fach erhöhen. Im Gegensatz dazu wurden die Aviditäten gegenüber Gal-1 vermindert, wobei in beiden Fällen die Sulfonat- und Sulfat-substituierten Aromaten den größten Einfluss hatten. Es kann also vermutet werden, dass dies über eine Interaktion der zusätzlich eingeführten Motive mit der nicht-konservierten Untereinheit von Galektin-3 vermittelt wird, einen direkten experimentellen Nachweis der Interaktion gab es allerdings nicht. Es wurde für ausgewählte Strukturen zudem ein biologischer Effekt in einem *wound-scratch*-Assay mit einer Gal-3-positiven Tumorzelllinie festgestellt.⁹²

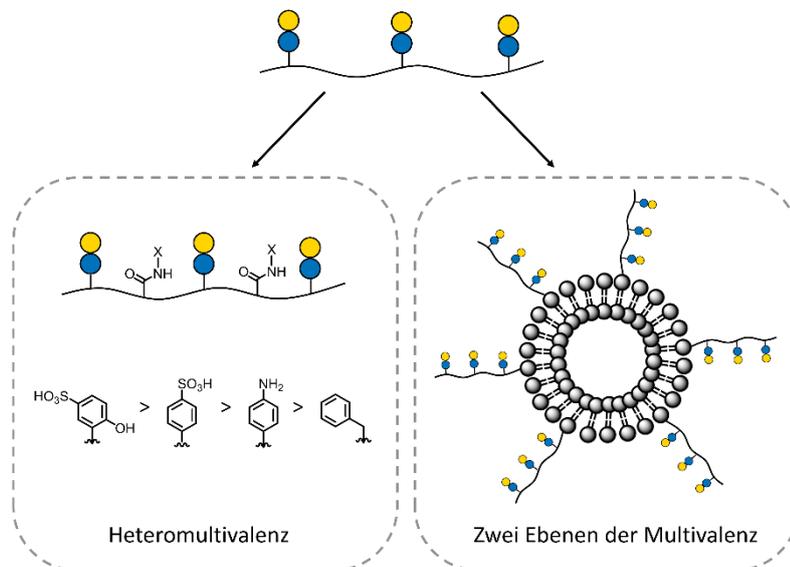


Abbildung 6: Per Festphasensynthese erhaltene Galektinliganden unter Anwendung zweier verschiedener Strategien. A) Synthese heteromultivalenter Liganden; B) Erhöhung der Multivalenz durch Präsentation auf der Liposomoberfläche.

Für eine andere Studie, ebenfalls von Freichel *et al.*, wurden homomultivalente Laktose-funktionalisierte Oligo(amidoamine) als Liganden wiederum multivalent auf der Oberfläche von Liposomen präsentiert (siehe Abbildung 6).⁹⁰ Dadurch wurden zwei Ebenen der multivalenten Präsentation ermöglicht und eine deutliche Steigerung der Bindungsavidität erzielt. Für den stärksten Liganden wurde der über ELISA bestimmte IC_{50} Wert so von 37 auf 0,3 μM erhöht.⁹⁰

Methoden zur Studie von Lektin-Ligand-Wechselwirkungen

Die oben bereits erwähnte SPR-Spektroskopie und der ELISA sind nur zwei von einer Vielzahl von Methoden, die zur Studie von Lektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen zur Verfügung stehen. Ein Aspekt dabei ist die Quantifizierung der Interaktionen, also die Bestimmung von Bindungsstärken und die Studie der Kinetik und Thermodynamik.^{36,40,42} Weitere Methoden, die hierzu verwendet werden, sind z.B. die Isotherme Titrationskalorimetrie, Trübungsassays, die Messung der Fluoreszenzpolarisation und des Circular dichroismus, die Verwendung von Quarzkristall-Mikrowaagen, die dynamische Lichtstreuung und die Atomkraftmikroskopie.⁴²

Allgemein gilt, dass eine genaue Kenntnis der ablaufenden Prozesse nötig ist, um die erhaltenen Ergebnisse richtig zu interpretieren. Wichtig ist dabei u.a. die Unterscheidung von Bindungsaffinitäten und -aviditäten. Der Affinitäts- K_d beschreibt dabei die Stärke einer Interaktion zwischen einem einzelnen Rezeptor mit einem einzelnen Kohlenhydratepitop. Da bei Kohlenhydrat-Ligand-Wechselwirkungen aber vor allem multivalente Interaktionen auftreten, wird stattdessen oft der Aviditäts- K_d bestimmt, der die Gesamtstärke der Interaktion inklusive der verstärkenden multivalenten Anteile beschreibt.⁴⁰

Auch Inhibitions- bzw. Kompetitions-Assays, bei denen üblicherweise die Bestimmung einer mittleren inhibitorischen Konzentration, der IC_{50} , im Fokus steht, spielen eine wichtige Rolle. Dafür können beispielsweise SPR- und ELISA-Messungen unter kompetitiven Bedingungen durchgeführt werden.^{36,40}

Neben der Bestimmung von Bindungsaviditäten und thermodynamischen Eigenschaften von Kohlenhydrat-Lektin-Bindung ist auch die Strukturaufklärung solcher Interaktionen von großer Bedeutung. Hierbei finden vor allem die Röntgenstrahl-Kristallographie und Kernspinresonanz-Spektroskopie (englisch: *nuclear magnetic resonance*, NMR) oft auch in Kombination mit Molekulardynamik-Simulationen (MD) Anwendung.⁴² Diese Techniken haben auch bei der Untersuchung pathogener Prozesse und beim Design von Wirkstoffen eine große Bedeutung.⁹³⁻⁹⁴

Zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Wechselwirkungen verwendete NMR-Methoden umfassen die Sättigungstransfer-Differenz (englisch: *saturation-transfer difference*, STD), die Transfer NOE (Kern-Overhauser-Effekt, englisch: *nuclear Overhauser effect*) und die zweidimensionale HSQC- (englisch: *heteronuclear single quantum coherence*) NMR-Spektroskopie.⁹⁵⁻⁹⁷ NMR Methoden bieten den Vorteil, dass sie die strukturellen Informationen im dynamischen Zustand und in ihrem atomischen Detail erfassen. Auch NMR-Methoden besitzen jedoch Limitierung, da sie auf Liganden kleiner und mittlerer Größe

Einleitung

beschränkt sind. Neben Informationen zu den Liganden können auch für die interagierenden Proteine Informationen über deren Bindungstasche erhalten werden, sofern sie in Isotopenmarkierter Form vorliegen und bezüglich ihrer Größe für NMR-Studien geeignet sind.⁹⁵⁻⁹⁷

Die STD-NMR-Spektroskopie ist eine Ligand-basierte Methode und dient dem *Epitop-Mapping* der Liganden. Sie umfasst stets zwei Messungen, eine *off-resonance* und ein *on-resonance* Messung. Bei der *on-resonance* Messung wird die Sättigung der Proteinprotonen spezifisch angeregt.⁹⁷⁻⁹⁸ Durch den Transfer dieser Sättigung auf die Kerne der Ligandmoleküle, die mit dem Protein interagieren, werden diese beeinflusst (siehe Abbildung 7). Dadurch wiederum verringern sich die Signale der interagierenden Ligandkerne im aufgenommenem Spektrum. Abhängig von der Nähe zum Protein variiert diese Auswirkung und nimmt mit größerem Abstand ab. Bei der *off-resonance* Messung erfahren weder Protein noch Ligand eine Sättigung. Durch Subtraktion des *on-resonance* Spektrums vom *off-resonance* Spektrum, wird letztendlich das STD-Spektrum erhalten, welches nur noch die Signale der Ligandkerne zeigt, die an der Interaktion beteiligt waren.⁹⁷⁻⁹⁸

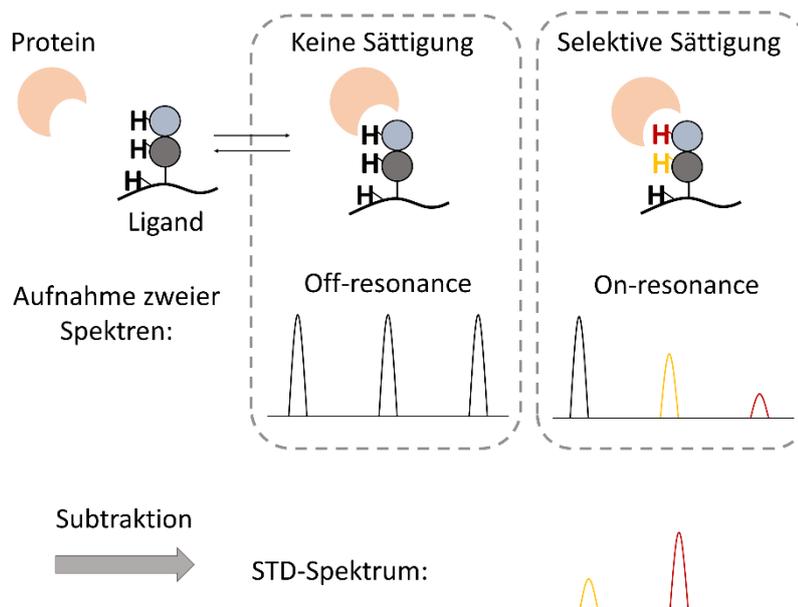


Abbildung 7: Das Prinzip der STD-NMR-Spektroskopie: Gleichgewicht der Protein-Ligand-Komplexbildung; Off-resonance-Experiment: die Ligandenprotonen werden im ^1H -NMR-Experiment registriert; On-resonance-Messung: Die Sättigung des Proteins wird auf die an der Interaktion beteiligten Teile des Liganden übertragen, die entsprechenden Signale im ^1H -NMR-Spektrum werden verringert; Subtraktion der aus beiden Experimenten erhaltenen ^1H -NMR-Spektren ergibt das STD-Spektrum.

Rezeptor-basierte Messungen können für Isotopen-markierte Proteine dann wertvolle Informationen liefern, wenn eine Zuordnung der Proteinsignale bekannt ist.^{94,99} In diesem Fall können ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Messungen durchgeführt und die Änderung der chemischen Verschiebungen der Proteinsignale bestimmt werden, um Informationen über die Interaktion zu erhalten. Über Titrationsexperimente, bei denen die Ligandkonzentration schrittweise erhöht wird, kann so auch die Assoziationskonstante bestimmt werden.^{94,99}

Mit dieser Methode wird die Bildung eines Protein-Ligand-Komplexes AB untersucht¹⁰⁰:



Herrscht ein Gleichgewichtszustand, so kann die Komplexbildung über die Dissoziationskonstante K_D (Einheit: M) und die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation ($k_{on} [M^{-1}s^{-1}]$) und Dissoziation ($k_{off} [s^{-1}]$) wie folgt beschrieben werden¹⁰⁰:

$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (1)$$

Ist der Austausch langsam, dann ist k_{off} deutlich kleiner als die Differenz der chemischen Verschiebungen des Proteins im freien (f) und gebundenen (g) Zustand in Hz¹⁰⁰⁻¹⁰¹:

$$k_{off} \ll |\omega_f - \omega_g| \quad (2)$$

Ist der Austausch deutlich schneller als die Differenz der chemischen Verschiebungen, so kann die Situation wie folgt beschrieben werden:

$$k_{off} \gg |\omega_f - \omega_g| \quad (3)$$

Für eine mittlere Geschwindigkeit des Austauschs sind k_{off} und die Differenz der chemischen Verschiebungen ähnlich groß.

In einem Experiment, bei dem Ligand zum Protein titriert wird, werden nun je nach schnellem oder langsamem Austausch zwischen gebundenem und freiem Protein verschiedene Phänomene beobachtet. Bei schnellem Austausch treten keine separaten Peaks (*fast exchange*, siehe Abbildung 8) für das Protein im gebundenen und freien Zustand auf, sondern lediglich ein gemittelter Peak, bei dem die beobachtete chemische Verschiebung (δ_{beo}) durch die Molanteile (P) von freiem und gebundenem Protein gewichtet ist¹⁰¹⁻¹⁰²:

$$\delta_{beo} = \delta_f \times P_f + \delta_g \times P_g \quad (4)$$

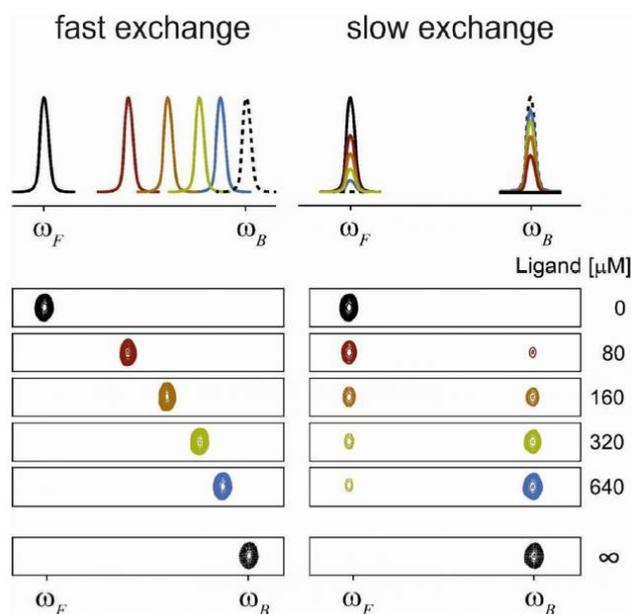


Abbildung 8: Beispielhafte NMR-Spektren und Verhalten eines exemplarischen Proteinsignals bei einem NMR-Experiment unter Titration von Ligand: A) schneller Austausch zwischen gebundenem und freiem Zustand des Proteins; B) langsamer Austausch zwischen gebundenem und freiem Zustand des Proteins (Nachgedruckt mit Erlaubnis von Becker, W.; Bhattachiprolu, K. C.; Gubensäk, N.; Zangger, K. *Investigating Protein-Ligand Interactions by Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Chemphyschem* **2018**, 19 (8), 895-906. DOI: 10.1002/cphc.201701253. Copyright 2018 John Wiley and Sons).

Einleitung

Ist der Austauschprozess hingegen langsam (*slow exchange*, siehe Abbildung 8), so können separate Signale des Proteins im freien und gebundenen Zustand beobachtet werden, da während des Zeitraums der Signaldetektion kein merklicher Austausch zwischen den Zuständen erfolgt. In diesem Fall ist die Signalintensität abhängig vom entsprechenden Molanteil des gebundenen und freien Zustands.^{100,102} Allgemein wird die Verschiebung der Proteinsignale, die in beiden Fällen beobachtet wird, als CSP bezeichnet (englisch: *chemical shift perturbation*).¹⁰⁰

Liegt die Zeitskala des Austauschprozesses im mittleren Zeitregime so wird auch von Koaleszenz gesprochen. Es wird auch hier nur ein Signal beobachtet. Dieses ist allerdings durch den Austausch während der Detektionsperiode des Signals verbreitert. Die Betrachtung der CSP erlaubt somit die Einordnung der ablaufenden Proteinbindung auf der Zeitskala. Zudem können über die Rezeptor-basierten ¹H-¹⁵N-HSQC-NMR-Messungen die Aminosäuren identifiziert werden, welche an der Interaktion beteiligt sind, da für die zugehörigen Protonen eine stärkere CSP auftritt als für die Aminosäuren der Proteinbereiche, die nicht oder wenig mit einem Liganden interagieren.^{100,103}

Eine besondere Bedeutung kommt bei der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen dem Zusammenspiel von NMR-Methoden und Molekulardynamik-Simulationen (MD) zu. Via MD können detaillierte Informationen über die an der Wechselwirkung beteiligten Epitope des Proteins und der Liganden erhalten und Bindungsstellen identifiziert werden, was wiederum die Auswertung der erhaltenen NMR-Daten unterstützt.⁹⁹ Insgesamt stehen eine Vielzahl verschiedener Methoden zur quantitativen und qualitativen Untersuchung von Lektin-Kohlenhydrat-Interaktionen zur Verfügung.

1.1.2 Glykosaminoglykane in Interaktionen mit Proteinen – ihre Rolle als Virusrezeptoren

Neben den Lektinen ist die zweite Gruppe Kohlenhydrat-bindender Proteine die der GAG-bindenden Proteine. GAGs sind lineare, negativ geladene Polysaccharide, die sich durch eine ausgesprochene Heterogenität und strukturelle Komplexität auszeichnen und mit Ausnahme von Hyaluronsäure (HA) sulfatiert und an Proteine gebunden in Form der sogenannten Proteoglykane (PG) vorliegen.¹⁰⁴⁻¹⁰⁵ Zu den GAGs zählen neben der Hyaluronsäure Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat und Keratansulfat sowie die zwei strukturell eng verwandten Klassen Heparin (HP) und Heparansulfat (HS) (siehe Abbildung 9).¹⁰⁴ Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) sind am weitesten verbreitet und machen 50 bis 90% der endothelialen Proteoglykane aus. Sie spielen daher *in vivo* eine bedeutende Rolle bei einer Vielzahl biologischer Prozesse. Heparin hingegen kommt hauptsächlich in Mastzellen vor.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ Aufgrund seiner einfachen Gewinnung aus biologischen Quellen wird Heparin dennoch häufig in der Forschung verwendet, um beispielsweise *in vitro* HP/HS-bindende Proteine zu identifizieren. Auch als Wirkstoff und in der pharmazeutischen Forschung findet Heparin Anwendung.¹⁰⁷⁻¹⁰⁸

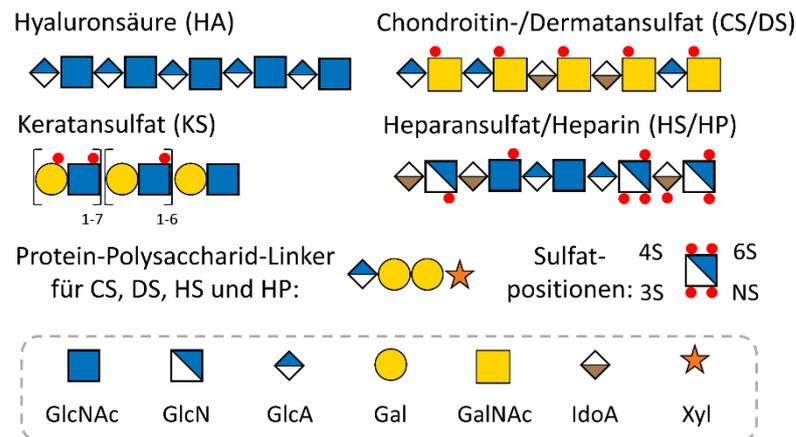


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Monosaccharidsequenz verschiedener Glykosaminoglykane: Hyaluronsäure (HA), Chondroitin-/Dermatansulfat (CS/DS), Keratansulfat (KS), Heparansulfat/Heparin (HS/HP) sowie die Protein-Polysaccharid-Linker-Sequenz $\text{GlcA-}\beta\text{-1,3-Gal-}\beta\text{-1,3-Gal-}\beta\text{-1,4-Xyl}$ für CS, DS, HS und HP.

Die Biosynthese von Heparin- und Heparansulfatproteoglykanen

Während der Biosynthese von Heparin- und Heparansulfatproteoglykanen wird zunächst eine Verbindungsstelle bestehend aus dem Tetrasaccharid $\text{GlcA-}\beta\text{-1,3-Gal-}\beta\text{-1,3-Gal-}\beta\text{-1,4-Xyl}$ an eine Serineinheit des Proteinkerns angebracht (siehe Abbildung 9). Anschließend werden die Polysaccharidketten in abwechselnder Reihenfolge aus D-Glucuronsäure (GlcA) und N-Acetyl-D-Glukosamin (GlcNAc) zusammengesetzt und dann modifiziert.^{104,109-112} Bei HS ist, im Gegensatz zu HP, die ablaufende N-Deacetylierung/N-Sulfatierung der GlcNAc-Einheiten unvollständig, wodurch sowohl N-sulfatierte (NS) als auch N-acetylierte (NA) Segmente bzw. Domänen, sowie solche mit gemischter N-Substitution (NS/NA) entstehen. Vorwiegend an GlcA-Einheiten, die zu den zuvor N-sulfatierten GlcN-Monosacchariden benachbart sind, laufen anschließend die Epimerisierung von GlcA zu IdoA und die 2-O-Sulfatierung ab.^{104,109-112} Nach der Biosynthese der HS-Kette sind die NS-Domänen somit hoch sulfatiert und besitzen einen großen IdoA-Anteil wohingegen die NA und NS/NA-Bereiche eine geringere Sulfatierung und weniger IdoA-Einheiten aufweisen. Durch die Regulierung der Biosynthese entsteht so eine spezifische Domänenstruktur bei HSPGs, während HP global hoch sulfatiert und IdoA-reich ist (siehe Abbildung 9).^{9,107,109-114} Die Sequenz unterschiedlich modifizierter Abschnitte entlang der Polysaccharidkette kann auch als *globales* Sulfatierungsmuster beschrieben werden. Muster positionsspezifischer Sulfatierung an einzelnen oder benachbarten Monosacchariden sind dann folgerichtig als *lokale* Sulfatierungsmuster zu bezeichnen (siehe Abbildung 10).

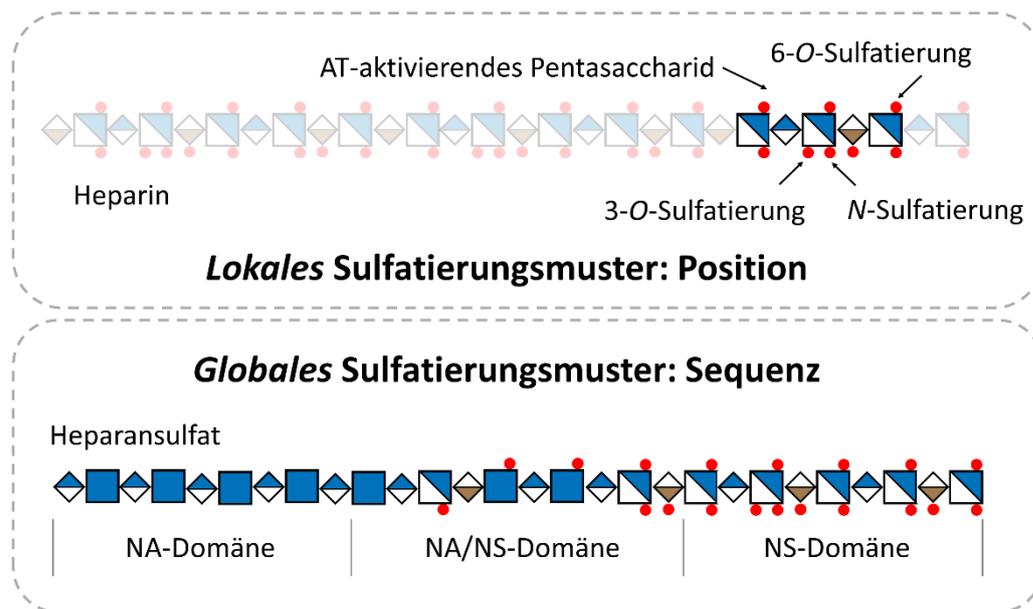


Abbildung 10: Unterschiedliche Arten von Sulfatierungsmustern, die die Protein-Interaktion beeinflussen können: Lokales Sulfatierungsmuster, welches positionsspezifische Sulfatierungen umfasst und globales Sulfatierungsmuster, welches durch die Abfolge unterschiedlich stark sulfatierter Domänen entsteht.

Prinzipien der GAG-Protein-Interaktionen

Allgemein unterscheidet sich die GAG-Protein-Interaktion deutlich von der Lektin-Kohlenhydrat-Anbindung. Lektine binden über eine konservierte, enge Bindungstasche die terminalen Epitope von membranverankerten Kohlenhydraten (siehe auch 1.1.1).^{105,107} GAG-bindende Proteine interagieren hingegen über Cluster positiv geladener Aminosäuren auf ihrer Oberfläche mit den negativ geladenen sulfatierten Zuckereinheiten entlang der Polysaccharidkette.^{105,107} Dies gilt nicht für HA, weshalb HA-bindende Proteine, die eine konservierte Bindungstasche tragen, eher als Lektine klassifiziert werden sollten.^{27,105} Um diese im Folgenden auszuklammern, wird daher von sulfatierten GAGs, kurz sGAGs, sowie sGAG-bindenden Proteinen gesprochen. In erster Linie wird deren Interaktion mit Proteinen durch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt, aber auch van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen tragen zur Interaktion bei.^{105,107}

Die große Heterogenität und strukturelle Vielfalt der Proteoglykane begünstigt in Kombination mit ihrer weiten Verbreitung, dass diese mit einer großen Zahl von Proteinen wie z.B. Chemokinen, Proteinen der extrazellulären Matrix, Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Lipasen, Apolipoproteinen, Morphogenen, viralen Hüllproteinen und Adhäsinen interagieren. So werden eine Vielzahl biologischer Prozesse wie Hämostase, Zellwachstum und -wanderung, Lipidtransport, Homöostase, allgemein Regulierung von Enzymaktivitäten und auch die Infektion durch Pathogene vermittelt, was eindrucksvoll die große biologische Bedeutung der sulfatierten Glykosaminoglykane aufzeigt.^{9,27,105,107,114-122}

Spezifität von sGAG-Protein-Interaktionen

Die Untersuchung der Spezifität von sGAG-Protein-Wechselwirkungen ist Gegenstand intensiver Forschung.^{108,120-134} Während für Lektin-Kohlenhydrat-Interaktionen vereinfacht

gesagt das Schlüssel-Schloss-Prinzip angewendet werden kann, ist die sGAG-Protein-Interaktion variabler.^{28,135} Es können beispielsweise für sGAG-bindende Proteine keine konservierten Aminosäuresequenzen definiert werden, die die Interaktion mit der sGAG-Polysaccharidkette vermitteln. Zudem gibt es Proteine, die verschiedene sGAGs binden und Prozesse in denen verschiedene Proteine an dieselbe Polysaccharidkette binden können.^{105,108-109,115,136} Zu den Faktoren, die die sGAG-Protein-Interaktion beeinflussen gehören die Länge, das Sulfatierungsmuster und der Sulfatierungsgrad, die Flexibilität und dreidimensionale Anordnung der Monosaccharide sowie die Eigenschaften des Zielproteins.^{107,114,137}

Diese strukturellen Parameter ermöglichen eine Bandbreite unterschiedlich spezifischer Interaktionen. So können unspezifische vornehmlich elektrostatische Wechselwirkungen auftreten, bei denen allgemein ein höherer Sulfatierungsgrad einen verstärkenden Effekt hat.^{107-111,114-115} Ebenso sind hochspezifische Interaktionen, die durch selten vorkommende Anordnungen ortsspezifischer Sulfatierungen, also *lokale* Sulfatierungsmuster, und Monosaccharidsequenzen vermittelt werden, möglich. In diesem Zusammenhang spricht man auch vom *Sulfation Code*.^{123,133,136} Die Untersuchung der Spezifität von sGAG-Protein-Interaktionen und Studien zur Identifikation spezifischer Bindungsepitope innerhalb von sGAG-Polysaccharidketten haben bereits interessante Erkenntnisse zur Entschlüsselung des *Sulfation Code* geliefert. Ein Beispiel für eine hochspezifische Interaktion ist die des Proteins Antithrombin mit Heparin.¹³⁸

Heparin ist wegen seiner antikoagulativen Eigenschaften bereits in den 1930er und 40er Jahren in ersten klinischen Studien untersucht worden. Heute ist es der wichtigste Wirkstoff in der Prävention und Behandlung venöser Thromboembolien.¹³⁷⁻¹⁴⁰ Der zugrundeliegende Mechanismus beruht auf der Aktivierung des Glykoproteins Antithrombin (AT) durch Interaktion mit einer spezifischen Pentasaccharid-Sequenz des Heparins, die 1983 von Choay *et al.* identifiziert wurde (siehe Abbildung 11), wobei jeder Sulfat substituent dieser Sequenz zur Interaktion maßgeblich beiträgt. Dies sind die seltenere 3-O-Sulfatgruppe sowie die häufiger auftretende 2-O-Sulfatgruppe der Iduronsäure sowie die N- und 6-O-Sulfate der GlcN-Einheiten.¹⁴¹ AT ist ein Serinproteaseinhibitor (Serpine), es inhibiert also Serinproteasen, die als Gerinnungsfaktoren bei der Blutgerinnung eine entscheidende Rolle spielen.¹⁴⁰ Bindet AT an die Oligosaccharidsequenz von Heparin, erfolgt durch eine Konformationsänderung eine Aktivierung des Proteins. Dadurch wird die Anbindung von AT an die Gerinnungsfaktoren IIa und Xa verstärkt und diese werden inhibiert, wodurch die Blutgerinnung gehemmt wird. Im Falle des Gerinnungsfaktors IIa, auch bekannt als Thrombin, ist zudem eine Templatfunktion Voraussetzung für eine effektive Inhibition des Gerinnungsfaktors.¹⁴¹⁻¹⁴² Dafür muss eine längere, ungefähr 18 Monosaccharide umfassende, Polysaccharidkette vorliegen, an die AT und Thrombin simultan anbinden können, sodass ein ternärer Komplex entstehen kann. Zusammen führen die Mechanismen der Heparin-AT-Interaktion zu einer tausendfach verstärkten Aktivität von AT und somit zu einer effektiven Inhibition der Gerinnungsfaktoren.¹⁴¹⁻¹⁴⁵ Als Medikament wird heutzutage kaum noch unfraktioniertes Heparin (UFH), sondern vor allem das durch chemische und enzymatische Spaltung des

Einleitung

natürlichen Heparins gewonnene niedermolekulare Heparin (englisch: *low-molecular weight heparin*, LMWH) sowie das synthetisch hergestellte Pentasaccharid Fondaparinux (Handelsname: Arixtra®) verwendet, wobei Letzteres aufgrund der geschilderten Unterschiede in den Inhibitionsmechanismen lediglich eine anti-Xa-Aktivität aufweist.^{9,118,140-146}

AT-aktivierende Pentasaccharidsequenz: Fondaparinux

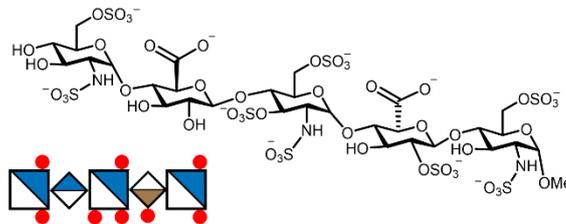


Abbildung 11: Pentasaccharidsequenz des Fondaparinux (Arixtra®) zur Aktivierung von AT.

Ähnlich der von AT ausgehenden anti-Thrombin-Aktivität ist auch die Interaktion des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 2 mit HSPGs abhängig von spezifischen Sequenzen und die resultierende mitogene, also zellteilungsanregende, biologische Aktivität basiert auf gleichzeitiger Anbindung des Wachstumsfaktors selber als auch des Fibroblast Wachstumsfaktor Rezeptors an die Polysaccharidkette.^{105,108,111} Auch die Anbindung des Glykoproteins D des Herpes-simplex-Virus (HSV) an HSPGs während der Virusinfektion wird durch spezifische Sulfatierungen verstärkt.¹⁴⁷ Andere Prozesse, bei denen der *Sulfation Code* eine Rolle spielt sind beispielsweise die neuronale Entwicklung, Alzheimer, Krebs und pathogene Prozesse.¹⁴⁸⁻¹⁵⁵

Neben dem *lokalen* Sulfatierungsmuster am Monosaccharid wird auch der Einfluss der Sequenz der NS, NA und NA/NS-Domänen, also des *globalen* Sulfatierungsmusters, untersucht (siehe Abbildung 10). Auch dieser strukturelle Parameter kann die Interaktionen mit Proteinen beeinflussen, dabei können die NA und NA/NS-Domänen die Beweglichkeit der Ketten erhöhen und als *spacer* dienen. Beides kann zu einer besseren Zugänglichkeit der NS-Domänen führen und so auch mehrere simultane Proteininteraktionen an einer Kette ermöglichen.^{108-109,156} Beispielsweise ist für Interleukin-8 und den Platelet Faktor 4 eine zusammengesetzte Bindungsstelle bestehend aus NS, NA und NS-Domäne an der Interaktion beteiligt. Die Domänenverteilung hat somit einen wichtigen Effekt auf die Proteininteraktion.^{109,111,122,138}

HSPGs als virale Rezeptoren

Wie bereits erwähnt, stellen auch die viralen Hüllproteine eine Klasse von Proteinen dar, die HSPGs als Rezeptoren auf der Zellmembran nutzen.¹⁵⁷⁻¹⁶⁹ Die Bedeutung antiviraler Therapien ist durch die COVID-19-Pandemie ins Zentrum der öffentlichen Aufmerksamkeit und unweigerlich auch in den Fokus der naturwissenschaftlichen Forschung gerückt worden.^{153-154,165,170-186} Damit verbunden hat auch die Untersuchung der Rolle von HSPGs in viralen Infektionen wieder vermehrt an Aufmerksamkeit gewonnen. Am Beginn seines Replikationszyklus steht die Anbindung eines Virus an die Wirtszelle, die über zellverankerte

Glykane und Rezeptoren erfolgt. Hier nehmen vor allem Sialinsäure-tragenden Glykane, die Histoblotgruppenantigene und Glykosaminoglykane, insbesondere Heparansulfat, eine wichtige Rolle ein.^{122,187-188}

Bereits vor 75 Jahren wurde zufällig das antivirale Potenzial von Polysacchariden entdeckt als Horsfall und McCarty Mäuse gleichzeitig mit einem Virus und Streptokokken Bakterien impften. Sie taten dies eigentlich mit dem Ziel eine verstärkte Infektion zu beobachten und stellten dann aber fest, dass die Virusinfektion einen leichteren Verlauf nahm. Dies führten sie auf aus den Bakterien stammende Polysaccharide zurück.¹⁸⁹ Es folgten weitere Studien, die die Bedeutung des anionischen Charakters der Zucker nachwiesen und später die Untersuchung von Polysacchariden gegen HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) und HSV. Doch erst 1992 gelang die Identifikation von HSPGs als Rezeptor für HSV.¹⁹⁰⁻¹⁹⁵

Der Hauptmechanismen über den Viren HSPGs nutzen ist die Anlagerung an die Zellgebundenen Glykane zur Erhöhung ihrer Konzentration auf der Zelloberfläche, was zum Transfer zu spezifischeren Proteinrezeptoren führen kann und anschließend zur Prozessierung des viralen Proteins und der Infektion der Zelle (siehe Abbildung 12A). Zu diesen Viren gehören beispielsweise das Dengue-Virus, Enteroviren, HIV, das Hepatitis-B-Virus (HBV), Humane Papillomaviren, das Merkelzell Polyomavirus (MCPyV) und auch SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*), für welches die Anbindung an Heparansulfat Voraussetzung für die Infektion ist und zu einer Konformationsänderung führt, die die Anbindung an den ACE2-Rezeptor ermöglicht.^{164-170,196} Auch in anderen Fällen ist die Anbindung mit einer aktivierenden Konformationsänderung verknüpft. Zudem können manche Viren die HSPG-vermittelte Endozytose nutzen, um in die Zelle zu gelangen.¹⁹⁷ Im Falle von HSV sind HSPGs nicht nur initialer Anknüpfungspunkt, sondern vermitteln auch die Wanderung des Virus weiter hin zur Zellmembran und können dort als Rezeptor für die Membranfusion und Freisetzung des Viruscapsids ins Cytoplasma dienen. Allerdings stehen für diesen finalen Schritt auch andere Rezeptoren zur Verfügung (siehe Abbildung 12B).¹⁹⁸ In anderen Fällen beispielsweise für das Venezuelanische Pferdeenzephalomyelitis-Virus oder auch für bestimmte Flaviviren wurde hingegen beobachtet, dass eine erhöhte Fähigkeit der HS-Bindung zu einer schnelleren Beseitigung der Viren aus dem Blut und einer geringeren Sterblichkeit führte. Dies deutet auf eine erleichterte Entfernung des Virus aufgrund seiner Anbindung an die ubiquitär vorhandene HSPGs hin, wobei der zugrundeliegende Mechanismus noch nicht bekannt ist.¹⁹⁹⁻²⁰⁰ Es wurde auch beobachtet, dass bestimmte Viren die HSPG-Abhängigkeit erst unter Zellkulturbedingungen entwickeln, was darauf zurückzuführen ist, dass Viren schnell mutieren und sich den äußeren Bedingungen anpassen können. Ebenso wurden auch nach der menschlichen Infektion neue Varianten mit veränderten Eigenschaften nachgewiesen.¹⁶⁴⁻¹⁶⁵

Auch HSPG-modifizierende Enzyme wie Heparanase nehmen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese viraler Infektionen ein. So kann beispielsweise die Hochregulierung von Heparanase zu einer Ablösung der HS-Ketten führen und dadurch die Verbreitung der angehenden Viren im Organismus ermöglichen. Aber auch die Immunantwort kann durch

Einleitung

die Heparanaseaktivität stimuliert werden, was zu einer höheren Überlebensrate von Zellen führen kann.^{161,163}

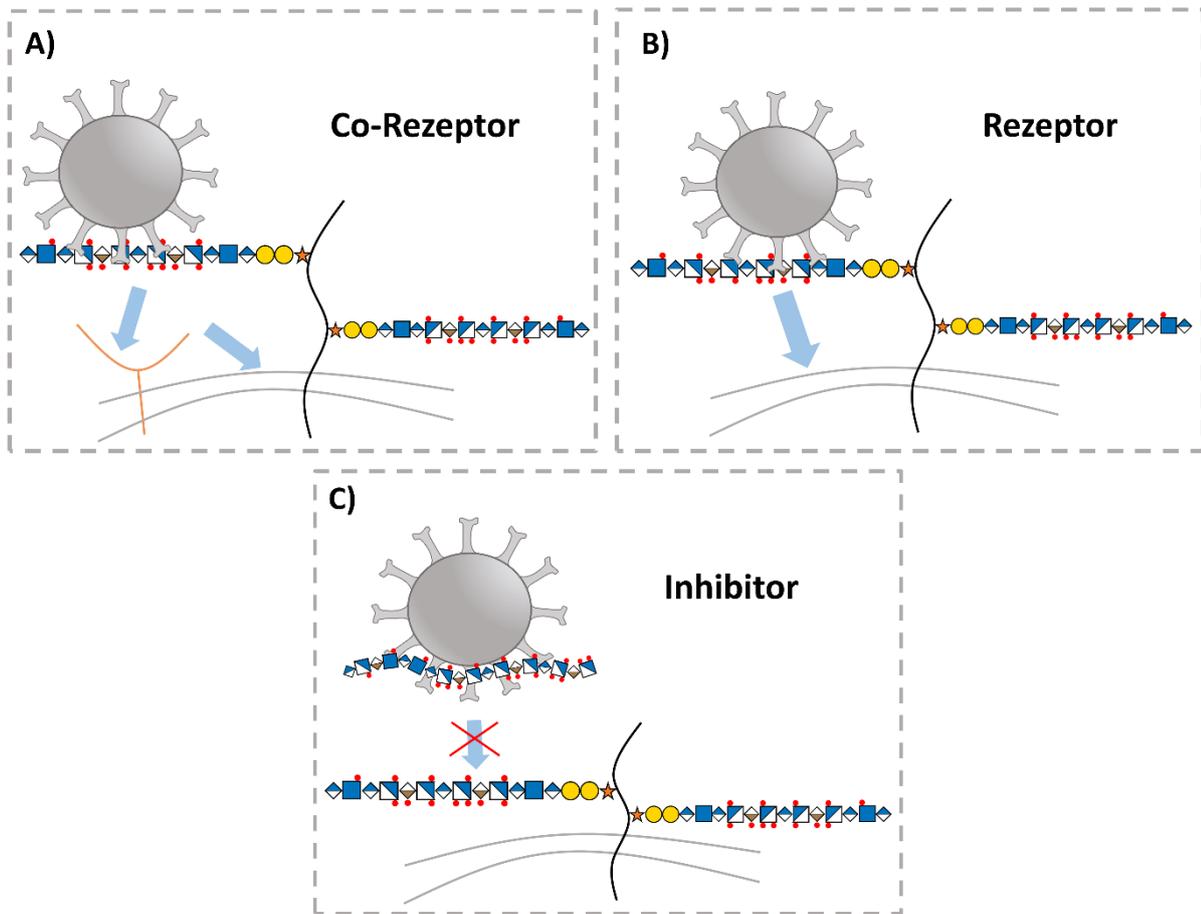


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Mechanismen, über die HSPG und therapeutisches HP/HS die Virusinfektion beeinflussen: A) Viren nutzen HSPGs zur Anreicherung auf der Zelloberfläche und interagieren anschließend mit sekundären Rezeptoren zur Internalisierung in die Zelle; B) Viren nutzen HSPGs als Rezeptor zur Anbindung an die Zellmembran und zur Internalisierung in die Zelle; C) lösliche sGAGs können die Interaktion von Viren mit den HSPGs und somit die Infektion einer Zelle inhibieren.

Die hohe Affinität von Viren gegenüber HSPGs ist aus pharmazeutischer Sicht äußerst relevant. So kann beispielsweise lösliches Heparin an die Bindungsstellen des viralen Proteins anlagern und somit die Anbindung an HSPGs und folglich die Virusinfektion verhindern (siehe Abbildung 12C). Ein Mechanismus, der schon für verschiedene Virusklassen untersucht wurde und auch in der aktuellen COVID-19-Pandemie erneut vielversprechende Ergebnisse lieferte. So konnte die Infektion mit SARS-CoV-2 *in vitro* durch den Einsatz von Heparin inhibiert werden.^{165,177,201}

Die Untersuchung von Virusprotein-HSPG-Interaktionen wird durch die große Heterogenität und Komplexität der natürlichen HSPGs erschwert. So kann beispielsweise ein HS-Tetrasaccharid durch Variation der N-Substitution und IdoA-Anteile bereits 2000 verschiedene Sulfatierungsmotive aufweisen und in Kombination mit den Parametern der Monosaccharidsequenz, der Monosaccharidkonformation und der dreidimensionalen Struktur ergibt sich eine große strukturelle Vielfalt, die die Aufklärung solcher sGAG-Protein-

Interaktionen erschwert.¹²³ Heparin und Heparansulfat können aus natürlichen Quellen gewonnen werden, doch werden dabei heterogene Mischungen erhalten. Zudem besteht das Risiko der Kontamination, welches vor allem bei pharmazeutischen Anwendungen relevant ist.²⁰²⁻²⁰⁷ Ähnliches gilt auch für die zuvor diskutierten Lektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen. Für viele Fragestellungen und Anwendungen ist daher der Einsatz von sogenannten Glykomimetika von großer Bedeutung, auf die in Abschnitt 1.2 weiter eingegangen werden soll.²⁰⁸

1.1.3 Die Zellmembran als Schauplatz von Kohlenhydrat-Rezeptor-Wechselwirkungen – die Rolle der Ligandpräsentation

Wie die im vorherigen Abschnitt erläuterten Virus-HPSG-Interaktionen spielen sich eine Vielzahl biologischer Kohlenhydrat-Ligand-Wechselwirkungen auf der die Zellmembran umgebenden Glykokalyx ab.¹⁸ Die Untersuchung von Ligand-Protein-Wechselwirkungen in Lösung oder unter Immobilisierung einer der beiden Komponenten auf starren Oberflächen, wie dies in vielen Aviditätsassays nötig ist, vernachlässigt somit Faktoren, die im natürlichen Kontext Einfluss auf die Interaktion haben können. Die Glykokalyx ist ein dicht funktionalisiertes Ensemble von verschiedensten Molekülen wie Glykolipiden und Glykoproteinen und die Anordnung und gegenseitige Wechselwirkung sowie die Art der Präsentation dieser Biomakromoleküle hat entscheidende Auswirkungen auf die Ligand-Protein-Interaktion.²⁰⁹ Um die Einflussfaktoren auf die Interaktion von Glykokonjugaten mit Proteinen vollständig zu entschlüsseln, ist es somit nötig, die Landschaft der Glykokalyx in ihrer dreidimensionalen Komplexität zu untersuchen. Dieser Herausforderung wird mit Hilfe verschiedener Methoden des *Glycocalyx Engineering* begegnet, wobei die präzise Steuerung und Modifikation der Zusammensetzung und Anordnung der membran-verankerten Glykane eine besondere Hürde darstellt.²⁰⁹⁻²¹⁰

Grundlegende Methoden des *Glycocalyx Engineering* umfassen genetische, chemoenzymatische und metabolische Manipulierungen der zell-verankerten Glykane. Nachteil ist hier, dass die Modifikation global durchgeführt wird und präzise Änderungen nicht möglich sind.²⁰⁹⁻²¹⁰ Um dieses Problem zu umgehen, bieten sich zwei Vorgehensweisen an. Zum einen können Systeme, die die natürliche Glykokalyx nachahmen, sogenannte Glykokalyx-Mimetika, zur Studie von Membran-Prozessen verwendet werden. Zum anderen dient die neue Methode des *de novo Glycocalyx Engineering* dazu die natürliche Glykokalyx durch synthetische Glykokonjugate zu verändern oder sogar neu aufzubauen.²⁰⁹⁻²¹⁰

Zur Verwendung als Glykokalyx-Mimetika bieten sich neben einfach modifizierbaren statischen Systemen wie Goldoberflächen vor allem Membranen aus Phospholipiddoppelschichten an. Diese können beispielsweise als unterstützte Membrandoppelschicht auf einer Oberfläche aufgebracht werden (siehe Abbildung 13). Größere Zellähnlichkeit weisen hingegen sogenannte unilamellare gigantische Vesikel (GUV) auf, die als Protozellen verwendet werden können.²⁰⁹ GUV sind eine Unterklasse von Liposomen – kugelförmigen aus einer Lipiddoppelschicht bestehenden Vesikeln – die einen

Einleitung

Teil des umgebenden Lösungsmittels einschließen und aus amphiphilen Lipiden aufgebaut sind. Im polaren Lösungsmittel erfolgt aufgrund der amphiphilen Eigenschaften der Lipide automatisch die Selbstassemblierung zu Vesikeln, da so die ungünstigen Wechselwirkungen der unpolaren Lipidalkylketten mit dem polaren Lösungsmittel minimiert werden (siehe Abbildung 13).²¹¹⁻²¹³ GUVs ähneln der Zellmembran, da sie eine natürliche Krümmung aufweisen und zur Membranfusion fähig sind.²⁰⁹

Verschiedene Arten von Glykokalyx-Mimetika

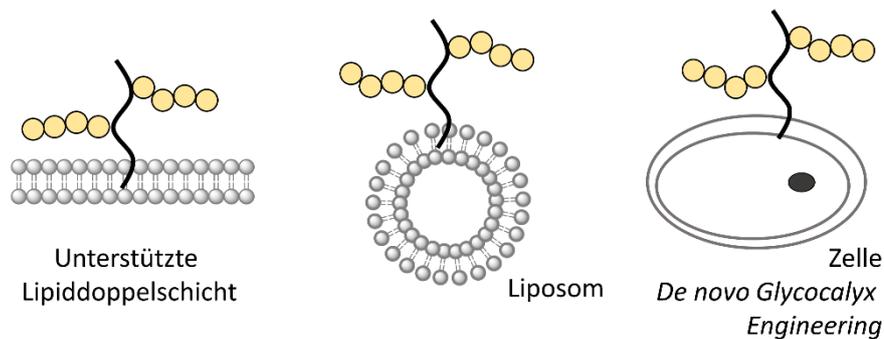


Abbildung 13: Schematische Darstellung verschiedener Systeme zur Untersuchung von biologischen Prozessen auf der Glykokalyx: A) Eine unterstützte Membrandoppelschicht; B) ein Liposom als Protozelle; C) Manipulation der natürlichen Glykokalyx im Rahmen des Glycocalyx Engineering.

Synthetische Konjugate von Glykanen mit Membranankern, wie Phospholipiden oder Cholesterol, können in solche künstlichen Membransysteme eingebracht werden und die Interaktionen mit Proteinen und das Membranverhalten der synthetischen Biomakromoleküle wie beispielsweise die laterale Diffusion oder der Einfluss von Phasenseparationen der Membran auf die Lokalisation untersucht werden. Außerdem können auch Prozesse wie das Cross-Linking multivalenter Proteine durch mehrere Glykokonjugate auf der Membran beobachtet werden.²⁰⁹

Die Untersuchung von Prozessen auf der Oberfläche lebender Zellen ermöglicht das *de novo Glycocalyx Engineering*. Auch hier werden chemisch synthetisierte Lipid- oder Cholesterol-verankerte Glykane verwendet, die über passive Prozesse in die Plasmamembran eingebracht werden.²⁰⁹⁻²¹⁰ Zum einen wurden beispielsweise CS-Polysaccharide mit spezifischen Sulfatierungsmustern mit einem Membrananker funktionalisiert und in die Zellmembran von Neuronen eingebracht, wo sie das Neuritenwachstum stimulierten.²¹⁴ Beispiele, bei denen statt Polysacchariden künstliche Kohlenhydrat-funktionalisierte Polymere als synthetische Analoge der natürlichen sGAGs verwendet wurden, sind die Arbeiten aus der Gruppe von Kamil Godula. Solche Strukturen können allgemein als Glykomimetika bezeichnet werden (siehe auch Kapitel 1.2).²¹⁵⁻²¹⁷ Beispielsweise wurden HS-mimetische Polymere in HS-defizitäre embryonale Stammzellen eingebracht und so die neuronale und mesodermale Differenzierung angeregt.²¹⁵⁻²¹⁶ Ebenfalls mittels GAG-mimetischer Polymere wurden von Huang *et al.* Prozesse der frühen Stadien der neuromuskulären Synapsenbildung initiiert.²¹⁷ Auch Mucin-Mimetika wurden zur Modifikation der Glykokalyx verwendet. Woods *et al.* konnten in dieser Studie zudem zeigen, dass durch die Verwendung eines Cholesterylamino-Ankers die Verweilzeit der Glykokonjugate auf der Zelloberfläche über Recyclingprozess

verlängert wurde.²¹⁸ Honigfort *et al.* untersuchten den Einfluss ihrer Mucin-mimetischen Glukosepolymere auf die Anbindung und den Eintritt des Influenza Virus (H1N1).²¹⁹

Bisher wurden jedoch noch keine Arbeiten zur Ansteuerung von Virusinteraktionen mittels sGAG-mimetischer Glykokonjugate präsentiert. Das Potenzial eines solchen Ansatzes lässt sich aber anhand der vorgestellten Beispiele erahnen. Die Kombination etablierter und neu entwickelter synthetischer und analytischer Methoden bietet dabei die Plattform, um neue Erkenntnisse über die Details von Virus-Membran-Interaktionen zu erhalten.

1.2 Glykomimetika zur Untersuchung von Ligand-Protein-Interaktionen

Zur Untersuchung von Ligand-Protein-Interaktionen auf Membranen aber auch in Lösung werden häufig die bereits im vorherigen Abschnitt erwähnten Glykomimetika, also künstliche Strukturen, die die natürlichen Polysaccharide nachahmen, verwendet. Polysaccharide aus natürlichen Quellen weisen häufig eine hohe Heterogenität auf und es besteht das Risiko der Kontamination, welches vor allem bei pharmazeutischen Anwendungen kritisch ist.²⁰²⁻²⁰⁷ Im Gegensatz dazu bieten synthetische Methoden den Vorteil, dass Liganden mit einer großen Kontrolle über chemische Struktur, Dispersität und Reinheit der Probe erhalten werden können.^{38-39,220} Zum einen können hierfür definierte und derivatisierte Mono-, Oligo- und Polysaccharide über chemische und chemoenzymatische Methoden gewonnen werden.^{22,221-223} Durch gezielte Modifikationen kann dabei die Selektivität und metabolische Stabilität erhöht werden. Dies wird vor allem bei der Entwicklung von kleinen Molekülen als Wirkstoffen genutzt.^{19,21,224-225} Beispielsweise bei der Untersuchung von GAG-bindenden Proteinen spielt diese Methode zudem zur Identifikation von spezifischen lokalen Sulfatierungsmustern eine große Rolle.^{123,134,226-228} Die Synthese und präzise Variation solcher Systeme bleibt jedoch komplex und Bedarf mehrstufiger, aufwändiger Syntheserouten.^{36,229}

Alternativ kann das Prinzip der Simplifizierung zum Design und der Synthese von Glykomimetika genutzt werden. Insbesondere zur Ansteuerung multivalenter Wechselwirkungen und zur Steigerung der Avidität wurde das Potenzial dieses Ansatzes in vielfachen Beispielen gezeigt.^{38-39,220,230} Hierbei werden allgemein synthetische Gerüste mit funktionellen Einheiten versehen, um multivalente Liganden zur Bindung an Proteine zu erhalten.^{38-39,220,230}

Die Anpassung der Hydrophobizität²³¹, Flexibilität²³², Ligandendichte²³³ und -größe²³⁴ sowie der Distanz zwischen Bindungsepitopen²³⁵ spielt eine wichtige Rolle bei Design und Synthese solcher Glykomimetika, um ausgewählte Proteine gezielt anzu steuern zu können. Hierfür steht eine Vielzahl künstlicher Gerüste zur Verfügung, z.B. verschiedene Arten von Polymeren wie lineare Polymere, sternförmige Kammpolymere, Block-Copolymere, Pfropfpolymere, außerdem Partikel-basierte Systeme wie Dendrimere, Nanopartikel, Cyclodextrine und Liposomen sowie Calixarene und (verzweigte) sequenz-definierte Glykomakromoleküle.^{38-39,236-246}

Einleitung

Polymere bieten den Vorteil einer hohen Ligandendichte und durch neuere Polymerisationstechniken ist eine große Kontrolle über Polymerlänge und Endgruppenfunktionalisierung möglich.^{238,246-248} Etablierte Polymerisationsmethoden bieten jedoch keine Möglichkeit die Sequenz der eingebauten Monomere zu kontrollieren. Dies jedoch ist eine Voraussetzung, um Struktur-Wirkung-Beziehungen bei der Interaktion der Liganden mit einem Protein im Detail entschlüsseln zu können, wodurch z.B. das zielgerichtete Design von Proteinliganden in medizinischen Anwendungen ermöglicht werden kann.²⁴⁹ Hauptsächlich wird zur Synthese sequenz-kontrollierter Oligomere und Polymere die Festphasensynthese angewendet.^{241,250} Neuere synthetische Entwicklungen haben zudem Fortschritte hin zur Synthese sequenz-kontrollierter Polymere mittels *atom-transfer radical polymerization* (ATRP) oder Olefinmetathese hervorgebracht.²⁵¹ Die weite Anwendung dieser Polymerisationsmethoden jedoch bleibt bisher aufgrund ökonomischer und technischer Herausforderungen sowie der beschränkten Skalierbarkeit limitiert.²⁵¹

1.2.1 Unterschiede beim Design von Glykomimetika zur Ansteuerung der sGAG-bindenden Proteine und von Lektinen

Um eine glykomimetische Zielstruktur zu entwerfen, kann ein Liganden- oder ein Rezeptor-basierter Ansatz verfolgt werden.³⁶ Für Lektine wird oft der Rezeptor-basierte Ansatz gewählt, da häufig lediglich die terminalen Sequenzen der natürlichen Polysaccharide essentiell für die Bindung an das Protein sind.^{4,36,252-253} Das Glykomimetikum wird somit mit diesen notwendigen Mono- oder Disaccharidepitopen funktionalisiert und die Struktur des Glykomimetikums wird beispielsweise in Bezug auf den Abstand der präsentierten Bindungsepitope an die Bindungstasche des Lektins angepasst (siehe Abbildung 14A).^{4,36,252-253}

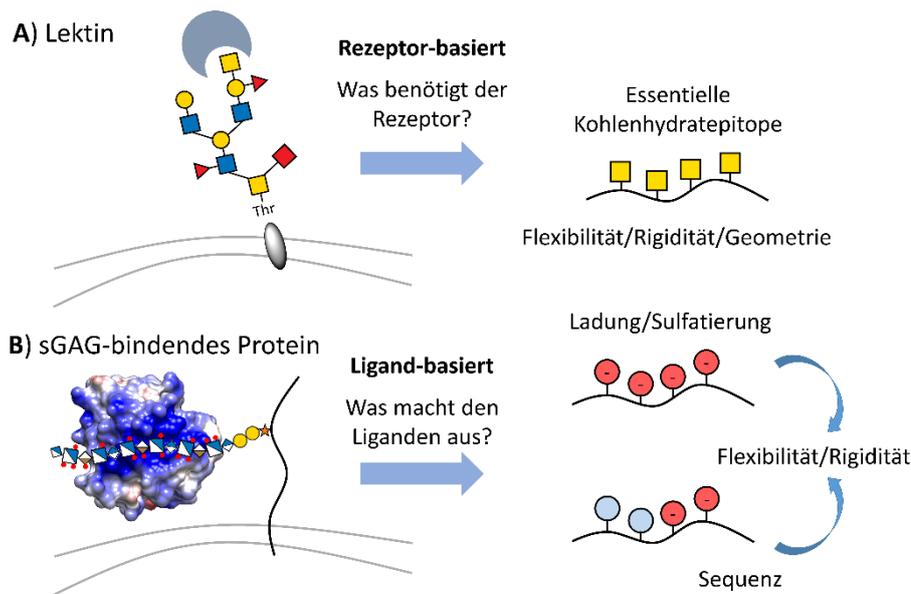


Abbildung 14: Beispiele für Designprinzipien von synthetischen Glykomimetika zur Ansteuerung von: A) Lektinen über einen Rezeptor-basierten Ansatz durch Präsentation essentieller terminaler Kohlenhydratepitope; B) sGAG-bindenden Proteinen, hier als Beispiel FGF2 (PDB ID: 1BFB), über einen Ligand-basierten Ansatz durch Nachahmung globaler und lokaler Strukturparameter.

Daneben kann auch die Einführung von nicht-Saccharid-Epitopen zur Adressierung weiterer Wechselwirkungen mit der CRD, wie π -Stacking, genutzt werden. Dies wurde beispielsweise wie bereits erläutert zur Adressierung sekundärer Wechselwirkungen mit der CRD von Gal-3 angewendet (siehe 1.1.1).⁶⁴

Im Gegensatz zu Lektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen erfolgen GAG-Protein-Interaktionen nicht über enge Bindungstaschen, sondern vielmehr durch die Anbindung von Clustern positiv geladener Aminosäuren an die negativ geladenen Liganden (siehe Abbildung 14B).¹⁰⁵ Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 diskutiert, erschwert zudem die geringe Definition der sGAG-bindenden Proteinsequenzen eine Identifizierung essenzieller spezifischer Ligandsequenzen und -eigenschaften und auch unspezifische Wechselwirkungen tragen einen großen Teil zu Interaktionen bei.¹⁰⁸⁻¹⁰⁹ Daher wird bei sulfatierten sGAG-Mimetika oft der Liganden-basierte Ansatz verwendet, wobei die Eigenschaften der Gesamtstruktur wie die hohe Dichte und Sequenz von Sulfatierungen bzw. Ladungen sowie Kohlenhydraten oder auch die Flexibilität bzw. Rigidität nachgeahmt werden.^{205-207,254} Neben den oben erwähnten Poly- und Oligosaccharid-basierten Strukturen finden zur Synthese von sGAG-Mimetika vor allem Polymere und Partikel-basierte Systeme^{175-176,183-185,255-256}, wie Dendrimere oder Nanopartikel, Verwendung.

1.2.2 Polymer-sGAG-Mimetika zur Ansteuerung HSPG-bindender Proteine

Polymere sGAG-Mimetika können in Kohlenhydrat-funktionalisierte, sogenannte Glykopolymere, und Polyanionen, die keine Kohlenhydratepitope sondern lediglich geladene Einheiten aufweisen, unterteilt werden. Den kontrolliert-radikalischen Polymerisationsmethoden kommt bei ihrer Synthese eine besondere Bedeutung zu, da sie im Vergleich zu ionischen Polymerisationen eine größere Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen und verschiedenen Lösungsmitteln bei hoher struktureller Kontrolle und geringen Dispersitäten aufweisen.^{230,257-262} Die RAFT-Polymerisation bietet zusätzlich den Vorteil, dass im wässrigen Medium gearbeitet werden kann.²⁶³ Paluck *et al.* nutzten diese Methode beispielsweise zur Synthese des Blockcopolymers Poly(styrolsulfonat-co-polyethylenglycol)methylethermethacrylat)-*b*-vinylsulfonat (siehe Abbildung 15A), das anschließend an den Fibroblast Wachstumsfaktor 2 (FGF2) konjugiert wurde.²⁶⁴ Das Konjugat zeigte eine verbesserte Anbindung an den FGF2-Rezeptor und die Konjugation erhöhte die Stabilität des Wachstumsfaktors.²⁶⁴ Weiterhin fanden die Ring-öffnende Metathese²⁶⁵⁻²⁶⁸, die Stufenwachstums-Polymerisation^{232,269-270}, die Cyanoxy- vermittelte freie radikalische Copolymerisation²⁷¹⁻²⁷⁶ und freie radikalische Polymerisationen²⁷⁷⁻²⁸⁵ Verwendung zur Synthese polymerer sGAG-Mimetika. Die Sulfatierung der Glykopolymere kann vor oder nach der Polymerisation erfolgen. Für die Einführung positionsspezifischer Sulfatierungen wird die Synthese sulfatierter Monomere verwendet. So stellten beispielsweise Oh *et al.* zunächst an der AT-aktivierenden Pentasaccharidsequenz orientierte selektiv sulfatierte Disaccharidmonomere her, die dann durch Ring-öffnende Polymerisation zur Herstellung von Polymeren mit antikoagulativen Eigenschaften genutzt wurden, wobei sie über Kettenlänge und Sulfatierungsmuster die antikoagulativen Eigenschaften modulieren konnten (siehe

Einleitung

Abbildung 15B).²⁶⁷ Global sulfatierte Strukturen lassen sich auch durch nachfolgende Sulfatierung der Glykopolymere erreichen, wobei der Sulfatierungsgrad durch die Anpassung der eingesetzten Äquivalente an Sulfatierungsreagenz variiert werden kann.^{232,277} Ein anderer Ansatz wurde von Wang *et al.* verfolgt, wobei Monomere mit ungeladenen Kohlenhydraten und Monomere mit ladungstragender Funktionalität kombiniert wurden (siehe Abbildung 15C).²⁶¹ Auch die Flexibilität von sGAG-Mimetika spielt eine wichtige Rolle bei der Proteininteraktion. Sie kann beispielsweise über die Wahl des Monomers und der Polymerisationsmethode und die daraus resultierenden Eigenschaften des Polymerrückgrats variiert werden.^{206,232,266} Ein Beispiel für die Untersuchung des Einflusses von Sulfatierungsgrad und Flexibilität auf die biologischen, in diesem Fall antikoagulativen, Eigenschaften der hergestellten sGAG-Mimetika ist die Arbeit von Ayres *et al.*; mittels Stufenwachstumscopolymerisation wurden verschiedenen Laktose-tragenden Diamine mit verschiedenen Isocyanaten polymerisiert und anschließend das Glykopolymer global sulfatiert.²³² Die Variation des Isocyanats deutete dabei den positiven Einfluss erhöhter Rückgrat-Flexibilität an, während ein höherer Sulfatierungsgrad ebenfalls verstärkend auf die antikoagulativen Eigenschaften wirkte.²³²

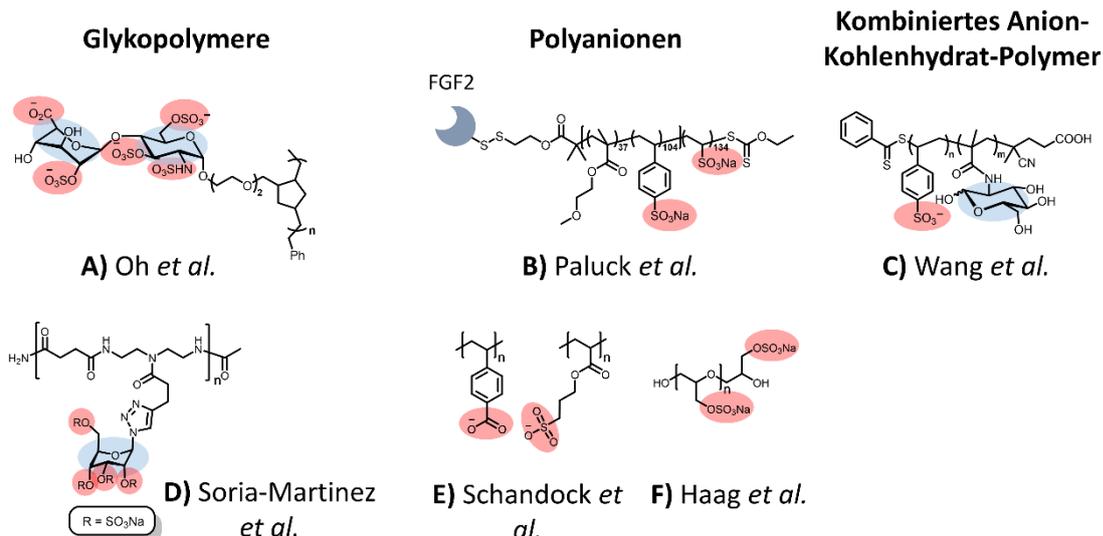


Abbildung 15: Beispiele für Polymer-basierte sGAG-Mimetika: Polyanionen, Glykopolymere und ein Polymer mit anionischen und Kohlenhydrat-Einheiten; rot: Sulfatgruppen = Ladungen und blau: Kohlenhydratepitope.

Polymer-basierte sGAG-Mimetika wurden auch zur Anwendung als antivirale Inhibitoren entwickelt.²⁰⁸ So wurde von Soria-Martinez *et al.* eine Reihe von sGAG-Mimetika hergestellt. RAFT wurde zur Synthese global sulfatierter Mannose- und Galaktoseglykopolymere genutzt, wohingegen via Festphasensynthese GlcNAc-funktionalisierte, vollständig sulfatierte Oligomere hergestellt wurden (siehe Abbildung 15D).²⁶² Die Polymere zeigten eine breite antivirale Aktivität *in vitro* gegenüber HPV16, HSV-1, MCPyV sowie, wenn auch mit geringerer Effektivität, gegen SV40 und Influenza A Virus (IAV). Die Glykooligomere zeigten eine verminderte Effizienz der viralen Inhibition, interessanterweise aber auch einen anderen molekularen Inhibitionsmechanismus.²⁶²

Eine andere Studie zur Entwicklung von breitband-antiviralen sGAG-Polymer-Mimetika wurde von Schandock *et al.* durchgeführt. Vierzehn verschiedene polyanionische Polymere mit Carboxylat-, Phosphat-/Phosphonat- und Sulfonat-tragenden Einheiten wurden synthetisiert und in einem Screening-Prozess *in vitro* auf ihr inhibitorisches Potenzial gegenüber zehn verschiedenen Viren getestet (Beispiele siehe Abbildung 15E).²⁸⁶ Hierbei wurde Poly(vinylbenzoesäure) als *Lead*-Kandidat identifiziert, der antivirale Aktivität gegen alle Viren zeigte. Außerdem wurde eine höhere Empfänglichkeit gegenüber den sGAG-Polymeren für Viren mit höherer Glykoproteindichte nachgewiesen. Auf Polymerseite war zudem das Vorhandensein von hydrophoben Strukturen vorteilhaft. Insgesamt zeigt dieser Ansatz das Potenzial von sGAG-mimetischen Polymeren als antivirale Inhibitoren und zur Untersuchung von Struktur-Wirkung-Beziehungen.²⁸⁶

Auch gegen SARS-CoV-2 wurden bereits sGAG-Mimetika getestet. Haag *et al.* zeigten *in vitro* die Infektionsinhibition für eine Familie von Polyglycerolsulfaten (PGS) (siehe Abbildung 15F).¹⁷⁶ Lineare, dendritische und hochverzweigte PGS wurden über Ring-öffnende Polymerisation hergestellt, wobei die flexibleren linearen PGS mit hohem Sulfatierungsgrad die höchste inhibitorische Aktivität zeigten.¹⁷⁶

Trotz der großen Bedeutung von sGAG-Protein-Interaktionen ist die Karte von Struktur-Wirkung-Beziehungen aufgrund ihrer großen strukturellen Vielfalt und verbleibender Limitierungen bei der Gewinnung von HP und HS mit kontrollierten strukturellen Variationen weiterhin unvollständig. Ein bisher wenig untersuchter Parameter ist der Einfluss der Abfolge von unterschiedlich stark sulfatierten Domänen wie sie HS aufweist.^{109,156} Um solche Domänen nachahmen zu können, ist die Sequenzkontrolle der synthetisierten Struktur eine Voraussetzung. Die Festphasensynthese ist die bisher prominenteste Technik zur Gewinnung sequenz-kontrollierter Strukturen.²⁵⁰

1.2.3 Glykomimetika mittels Festphasensynthese

Historischer Hintergrund und synthetische Grundlagen der Festphasensynthese

Ursprünglich entwickelt wurde die Festphasensynthese von Merrifield zur Herstellung von Peptiden. Durch Verwendung eines festen Trägermaterials, an das die Aminosäuren Schritt für Schritt gekuppelt werden können, wurde es möglich überschüssige Reagenzien und Lösungsmittel durch einfache Filtrations-Waschschritte, bei der die gekuppelte Aminosäuresequenz auf dem Harz verbleibt, zu entfernen. Dies führt letztendlich zu hohen Umsätzen in jedem Kupplungsschritt und so zu Strukturen mit hoher Reinheit und Ausbeute bei geringeren Reaktionszeiten im Vergleich zur Flüssigphasensynthese.²⁸⁷⁻²⁸⁸

Bei der Festphasenpeptidsynthese werden Harzkügelchen als Trägermaterial verwendet, die mit einem Linker als Ankerpunkt für die erste anzubringende Aminosäure versehen sind. Merrifield nutzte Styrol, welches mit *para*-Divinylbenzol vernetzt war.^{287,289} Wichtig für die Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen auf dem Harz ist dessen Quellverhalten.²⁹⁰⁻²⁹¹ Für den Einsatz hydrophilerer Lösungsmittel wurde daher beispielsweise das TentaGel®-Harz entwickelt, welches zusätzlich Poly(ethylenglycol)ketten enthält (siehe Abbildung 16A).

Einleitung

Als Linker verwendete Merrifield eine Chloromethyleinheit.²⁸⁸ Alternativen dazu sind beispielsweise der Chlorotryl- und der Rink Amid-Linker (siehe Abbildung 16B).²⁹² Die Wahl des Linkers bestimmt die Abspaltbedingungen, unter denen die vollständig aufgebaute Sequenz abgespalten werden kann und legt darüber hinaus die Funktionalität, die nach der Abspaltung am zuvor Harz-verankerten Terminus der Zielstruktur vorliegt, fest.²⁹² Eine interessante Alternative zu säure- und basenlabilen Linkern ist der von Holmes *et al.* entwickelte photolabile *O*-Nitrobenzyl-linker, der heute als Fmoc-Photo-Linker kommerziell erhältlich ist (siehe Abbildung 16B).²⁹³ Unter Bestrahlung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 365$ nm zerfällt der Photolinker nach einem Norrish-Typ-II-Mechanismus unter Bildung eines Nitrosoketons am Harz und einer Amidfunktion am C-Terminus der aufgebauten Sequenz (siehe Abbildung 16B).²⁹⁴⁻²⁹⁵

Im ersten Schritt der Festphasenpeptidsynthese wird die erste Aminosäure an die Linkereinheit des gewählten Trägermaterials unter Einsatz von Kupplungsreagenzien angebracht. Die verwendeten Aminosäuren tragen eine freie Carboxylgruppe und eine durch eine temporäre Schutzgruppe blockierte Aminfunktionalität, ebenso sind gegebenenfalls vorhandene Seitenkettenfunktionalitäten mit Schutzgruppen ausgestattet (siehe Abbildung 16C).²⁸⁹ Bei der Wahl der *N*-terminalen Schutzgruppe ist es wichtig auf die Orthogonalität zu den Abspaltbedingungen des Harzes und zu denen der Seitenketten-Schutzgruppen zu achten. So kann die *N*-terminale Schutzgruppe nach dem Kupplungsschritt selektiv unter Erhalt der anderen Schutzgruppen abgespalten werden und die nächste Aminosäure an das frei werdende Amin angebracht werden.²⁹⁶ Zur Vervollständigung der gewünschten Sequenz werden die Kupplungs- und Entschützungs-schritte wiederholt und abschließend die Seitenketten entschützt und die Struktur vom Harz abgespalten. Merrifield nutzte zu seiner Zeit *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) als terminale Schutzgruppe und hauptsächlich Benzyl-basierte Schutzgruppen zur Schützung der Seitenketten. Boc ist eine säurelabile Schutzgruppe, kann aber dennoch unter Einsatz von 4M HCl in Dioxan orthogonal unter Vermeidung der Linkerspaltung entfernt werden.²⁹⁷⁻²⁹⁸ Heutzutage wird zur *N*-terminalen Schützung meistens auf die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe zurückgegriffen.²⁹⁸⁻²⁹⁹ Da diese basenlabil ist, ist sie inhärent orthogonal zu den meist nötigen sauren Spaltbedingungen der Linkereinheit. Außerdem kann das nach der Fmoc-Entschützung entstehende Dibenzofulven-Chromophor über UV Absorption nachgewiesen und somit zur Kontrolle des Reaktionsumsatzes genutzt werden. Durch den Einsatz von Piperidin als Base erfolgt eine Adduktbildung mit dem Dibenzofulven, wodurch Nebenreaktionen wie dessen Polymerisation oder eine Michael-Addition mit dem freien *N*-terminalen Amin verhindert werden (siehe Abbildung 16C).³⁰⁰

Für eine vollständige Kupplung wird zum einen auf den Einsatz mehrerer Äquivalente zurückgegriffen, was durch die bereits erwähnte einfache Entfernung überschüssiger Reagenzien durch Filtration möglich ist. Zudem werden aktivierende Kupplungsreagenzien verwendet, die die freie Carboxylgruppe aktivieren. Merrifield nutzte Dicyclohexylcarbodiimid, das durch Bildung eines *O*-Acylisoureas den nukleophilen Angriff eines primärenamins begünstigt.²⁸⁷ Ein anderes, heute häufig verwendetes

Kupplungsreagenz ist PyBOP (Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat), welches zusammen mit DIPEA (Diisopropylethylamin) eingesetzt wird.³⁰¹⁻³⁰³ Im ersten Schritt der Aktivierung wird eine aktivierte Acyloxyphosphoniumsalz-Zwischenstufe unter Freisetzung von HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) gebildet. HOBt greift nun die gebildete Zwischenstufe an und es entsteht ein weniger labiler Aktivester, der wiederum nukleophil vom freien Amin der wachsenden Aminosäuresequenz auf der Festphase angegriffen kann, sodass die gewünschte Amidbindung entsteht (siehe Abbildung 16D).³⁰¹⁻³⁰²

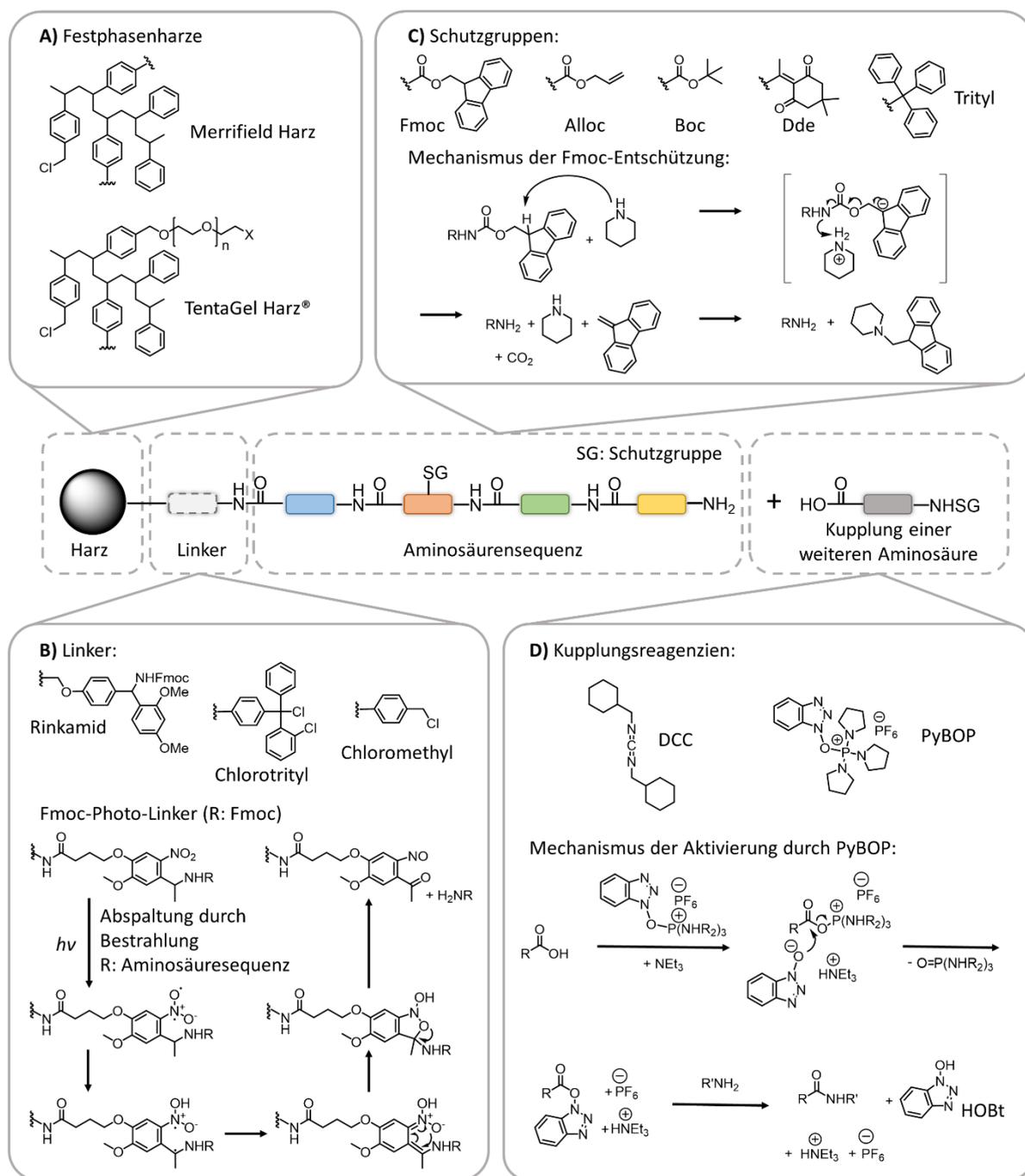


Abbildung 16: Übersicht über bei der Festphasensynthese verwendete Harze, Linker, Kupplungsreagenzien und Schutzgruppen.

Festphasensynthese sequenz-definierter Glykooligo(amidoamine)

Das Prinzip der Festphasenpeptidsynthese wurde inzwischen auch auf die Synthese von Biopolymeren wie Nukleinsäuren³⁰⁴ und Polysacchariden angewendet.^{221,305} Doch auch nicht-natürliche Strukturen lassen sich hiermit realisieren. So wurde die Festphasensynthese von Hartmann *et al.* zur Synthese von sequenz-definierten Glykooligo(amidoaminen) zur Ansteuerung von Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen weiterentwickelt.^{240-241,243,306-309} Während das Syntheseprinzip beibehalten wird, werden statt Aminosäuren sogenannte Bausteine verwendet, die ebenfalls freie Carboxylgruppen und Fmoc-geschützte Amine tragen, aber deren restliche chemische Struktur maßgeschneidert für die gewünschte Anwendung angepasst wurde. Es werden *funktionale* und *spacer* Bausteine unterschieden. *Funktionale* Bausteine tragen Seitenketten, über die eine Dekoration der synthetisierten Oligo(amidoamin)-Gerüste möglich ist (siehe Abbildung 18).^{91,241,309} Zur Synthese der Strukturen wird zunächst durch Wiederholung von Kupplungs- und Entschützungschritten ein Rückgrat aufgebaut, das im nächsten Schritt durch Umsetzung der Seitenketten der *funktionalen* Bausteine dekoriert und abschließend von der Festphase abgespalten werden kann (siehe Abbildung 17). Generell ermöglicht der Baukasten der Oligo(amidoamin)-Synthese eine große Variabilität der chemischen Struktur der synthetisierten Liganden. Die Valenz, der Abstand zwischen Bindungsstellen, die Flexibilität des Rückgrats, sowie dessen Hydrophilie bzw. Hydrophobie können modifiziert werden.^{90,92,231,250} Darüber hinaus lassen sich über Verzweigungen verschiedene Architekturen erhalten und eine einfache Kombination mit natürlichen oder funktionalisierten Aminosäuren ist ebenfalls möglich.^{240,307}

Festphasensynthese funktionalisierter Glykooligo(amidoamine)

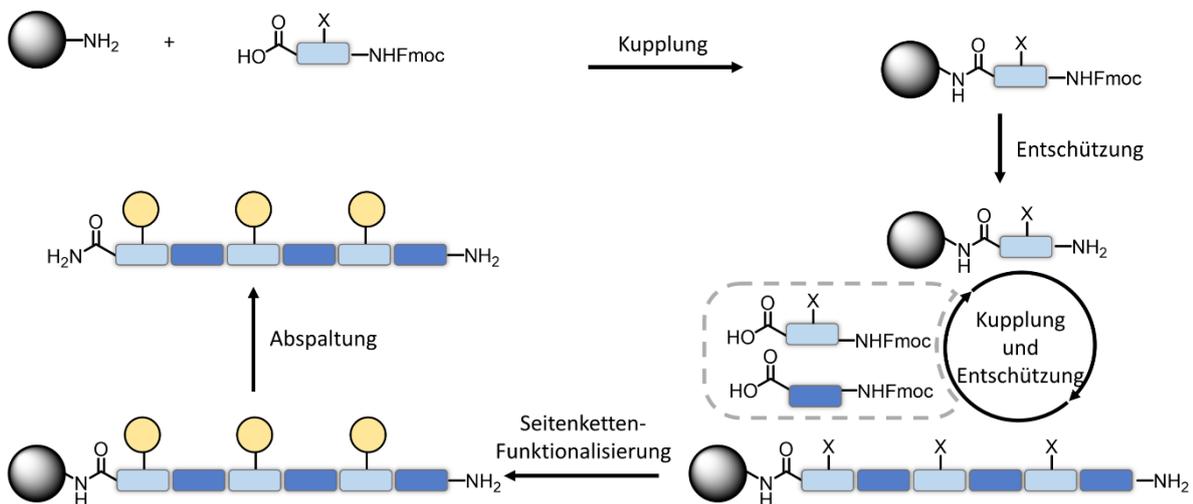


Abbildung 17: Schema der von Hartmann *et al.* entwickelten Festphasensynthese sequenz-definierter Glykooligo(amidoamine).

Grundlage für die Synthese der meisten *funktionalen* Bausteine ist eine Diethylentriamin-einheit, die eine Bernsteinsäureeinheit und ein Fmoc-geschütztes Amin sowie eine variable Seitenkette trägt (siehe Abbildung 18). Die Nomenklatur der *funktionalen* Bausteine besteht aus drei Begriffen, wobei der erste Begriff die variable Seitenkette, der zweite die

Diethylentriamineinheit (D) und der letzte die Bernsteinsäure (englisch: *Succinic acid*, S) beschreibt. So trägt TDS eine Seitenkette mit einer Dreifachbindung (englisch: *Triple bond*, T). Diese ermöglicht es Azid-funktionalisierte Kohlenhydrate über Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (englisch: *copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*, CuAAC) an das Rückgrat zu konjugieren.²⁴¹ Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine Cu(I)-katalysierte Variante der Huisgen (2+3)-Cycloaddition, bei der das Kohlenhydratepitop über ein 1,2,3-Triazol an die TDS-Seitenkette angebracht wird. Solche Reaktionen werden auch als Click-Reaktionen bezeichnet und verlaufen üblicherweise unter hohen Umsätzen.³¹⁰⁻³¹²

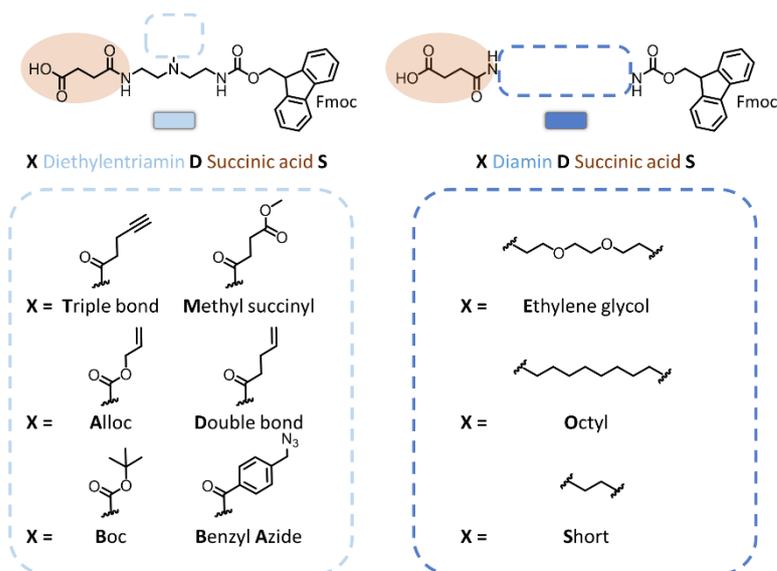


Abbildung 18: Maßgeschneiderte Bausteine für die Festphasensynthese funktionalisierter Oligo(amidoamine).

MDS hingegen trägt eine Methyl-geschützte Bernsteinsäure-Seitenkette. Nach Entschützung ermöglicht diese die Anbringung Azid-funktionalisierter Kohlenhydrate über Staudinger-Ligation oder auch die Amidkonjugation Amin-funktionalisierter Einheiten.⁹¹⁻⁹² In beiden Fällen kann dies zur Synthese heteromultivalenter Strukturen genutzt werden, wenn ein Rückgrat mit TDS und MDS-Bausteinen verwendet wird. Über Staudinger-Ligation und CuAAC können so selektiv verschiedene Kohlenhydratazide angebracht werden.³¹³ Amin-funktionalisierte Bindungsmotive können über Amidkupplung eingeführt werden, was z.B. für die Ansteuerung von sekundären Wechselwirkungen mit der CRD von Galektinen erprobt wurde (siehe auch Kapitel 3.3).⁹²

Als hydrophiler *spacer* Baustein wird EDS (Ethylenglycol Diamin Succinic acid) verwendet, welches einen Ethylenglycol-Kern besitzt. Im Gegensatz dazu dient ODS (Octyl Diamin Succinic acid) mit seinem Octyl-Kern zur Einführung hydrophober Eigenschaften.^{231,241} So können mittels der Festphasensynthese von Glykooligo(amidoaminen) Liganden für Kohlenhydrat-erkennende Proteine entwickelt und als Glykomimetika zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen genutzt werden.

2 Zielsetzung und Gliederung

Die Studie und Aufklärung von Glykokalyx-Protein-Interaktionen, zu denen beispielsweise die Anbindung von Viren an sulfatierte Glykosaminoglykane während der Infektion oder auch Galektin-vermittelte Prozesse der Tumorentstehung gehören, stellt einen wichtigen Baustein zur Entwicklung medizinischer Therapeutika dar. Synthetische Systeme, die die natürlichen Prozesse nachahmen oder auch zur Manipulation der biologischen Situation genutzt werden können, werden als Mimetika bezeichnet und sind ein wichtiges Werkzeug für solche Studien.

Die Festphasensynthese von Hartmann *et al.* erlaubt die Herstellung sequenz-definierter monodisperser Glykooligo(amidoamine) als Glykomimetika. Durch Wiederholung von Kupplungs- und Entschützungs-schritten mit speziell entwickelten *funktionalen* und *spacer* Bausteinen, die eine freie Carboxylgruppe und ein Fmoc-geschütztes Amin tragen, können Oligo(amidoamin)-Gerüste an der Festphase aufgebaut und diese anschließend über Funktionalisierung der Seitenketten dekoriert werden. Um diese Plattform weiterzuentwickeln und die Anwendungsmöglichkeiten der hergestellten Strukturen zu erweitern, soll nun insbesondere deren Präsentation auf Membranen realisiert werden, da Membransysteme es erlauben die natürlichen Prozesse auf der Glykokalyx genauer zu untersuchen als dies mit Studien in Lösung der Fall ist.

Im ersten Teil der Arbeit soll jedoch zunächst eine neue Klasse von Glykooligo(amidoaminen) erschlossen werden. Mittels Festphasensynthese sollen Strukturen, die natürlichen sulfatierten Glykosaminoglykanen, kurz sGAGs, ähneln, zugänglich gemacht werden. Hierzu soll die Anwendung eines photospaltbaren Linkers und erstmalig die Durchführung der Sulfatierung auf der Festphase ermöglicht und so die Einführung sequenz-definierter Sulfatierungsmuster umgesetzt werden. Anschließend soll die neue Syntheseroute zur Herstellung drei verschiedener Klassen von Strukturen, die als Mimetika sulfatierter Glykosaminoglykane (sGAGs) betrachtet werden können, angewendet werden. Es sollen sowohl global als auch segmentweise sulfatierte Strukturen synthetisiert werden. Insbesondere die Synthese der segmentweise sulfatierten Glykooligo(amidoamine) soll nun in besonderer Form die Nachahmung der Sequenz unsulfatierter und stark sulfatierter Domänen der natürlichen Heparansulfate, die zu den sGAGs zählen, ermöglichen. Zudem soll die Variation der Rückgrateigenschaften der Strukturen unter Verwendung von Oligoprolin-Einheiten durchgeführt werden. Wie Studien von Soria *et al.* zu global sulfatierten Glykooligo(amidoaminen) zeigen konnten, haben diese Strukturen das Potenzial Virusinfektionen zu inhibieren. Abschließend sollen die Strukturen daher zum ersten Mal auch auf ihre antikoagulativen Eigenschaften untersucht werden, da diese einen Risikofaktor für mögliche Kreuzaktivitäten und Nebenwirkungen bei medizinischen Anwendungen darstellen können.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen, unter anderem basierend auf dem neu entwickelten Syntheseprotokoll für sGAG-mimetische Glykooligo(amidoamine), verschiedene

Möglichkeiten zur Präsentation von sGAG-Mimetika auf Vesikelmembranen und natürlichen Zellmembranen untersucht werden. Finales Ziel ist es hierbei eine synthetische Plattform zu Herstellung von Membrananker-tragenden sGAG-Mimetika zu erhalten, um die Strukturen anschließend zur Modifizierung von Membransystemen zu nutzen. Solche Funktionalisierungen sollen dann erstmalig die Untersuchung von Glykooligo(amidoamin)-basierten sGAG-Mimetika im dynamischen Zustand erlauben. Hierbei stehen verschiedene Syntheseansätze zur Verfügung, die getestet werden sollen. Membrananker können in Lösung, mittels Festphasensynthese oder durch Funktionalisierung auf der Oberfläche von vorformulierten Vesikeln an die Liganden angebracht werden. All diese Varianten sollen getestet werden. Ziel ist es sowohl sGAG-mimetische Glykooligo(amidoamine) als auch mit dem kommerziell erhältlichen sGAG-Pentasaccharid Fondaparinux funktionalisierte Ligand-Lipid-Konjugat zu erhalten. Anschließend soll deren Einbau in künstliche und natürliche Membranen überprüft und final die Interaktion von Virus-ähnlichen Partikeln an die erhaltenen dekorierten Membranen untersucht werden, um so die Grundlage für Studien zu Glykokalyx-Virusprotein-Interaktionen zu legen. Solche Interaktionen wurden bisher noch nicht mittels synthetischer membranverankerter Glykomimetika untersucht, entsprechende Studien können somit potenziell einen großen Beitrag zur Entschlüsselung von Virus-Membran-Interaktionen liefern.

Im letzten Teil der Arbeit soll das Prinzip der Ligand-Membranpräsentation auf ein weiteres System übertragen werden. Dazu soll die Konjugation von heteromultivalenten und homomultivalenten Oligo(amidoaminen) an Lipide ermöglicht werden, um die erhaltenen Konjugate in Liposomen einbauen zu können, die dann als eine Art Glykokalyx-Mimetikum zur Untersuchung der Interaktionen mit Galektinen im dynamischen Zustand genutzt werden sollen. Dazu soll die von Freichel *et al.* etablierte Syntheseroute zur Herstellung heteromultivalenter Strukturen verwendet werden und anschließend deren Konjugation an Lipide in Bezug auf verschiedene Reaktionsparameter evaluiert und optimiert werden, um eine Reihe verschieden funktionalisierter Glykomakromolekül-Lipid-Konjugate zu erhalten. Anschließend soll erstmalig die Interaktion von Galektin-1 und Galektin-3, sowohl mit den Glykooligo(amidoaminen) selbst in Lösung als auch mit den entsprechenden Lipidkonjugate inkorporiert in Liposomen, in Kooperation mit Partner*innen am Institut CICbioGUNE in Derio (Spanien) unter der Leitung von Prof. Dr. Jesús Jiménez-Barbero mittels NMR-Studien, Cryo-Elektronenmikroskopie und Molekulardynamik-Simulationen untersucht werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese segmentweise sulfatierter Präzisionsglykomakromoleküle als sGAG-Mimetika mittels Festphasensynthese

sGAG-Proteoglykane und hier insbesondere HSPGs spielen eine wichtige Rolle in einer Vielzahl biologischer Prozesse. Die HS-Polysaccharidketten werden während ihrer Biosynthese aus D-Glucuronsäure (GlcA) und N-Acetyl-D-Glukosamin (GlcNAc) aufgebaut und anschließend modifiziert, wobei stark sowie nicht sulfatierte Domänen entstehen.^{111,114} Mit der Domänenstruktur eng verknüpft ist die Flexibilität bzw. Rigidität der Polysaccharidketten, da NS-Domänen im Vergleich zu NA-Domänen eine verminderte Flexibilität aufweisen.¹⁰⁸ Wie genau die Regulation dieser Prozesse abläuft und welche Rolle die strukturellen Parameter für die biologische Aktivität der HSPGs spielen und wie sie z.B. die Spezifität von HSPG-Protein-Interaktionen beeinflussen, ist Gegenstand intensiver Forschung.^{108-109,122-127,136,314-316} Zur Untersuchung des Einflusses positionsspezifischer Sulfatierung, also des *lokalen Sulfatierungsmuster* (siehe Abbildung 19A), auf die biologische Funktion gibt es bereits eine Vielzahl von Studien (siehe Kapitel 1.1.2).^{108-111,123-132,316} Im Gegensatz dazu ist die Rolle der in Domänen variierenden Sulfatierung, also des *globalen Sulfatierungsmusters* (siehe Abbildung 19B), und der damit verknüpften Flexibilität nur in geringerem Umfang untersucht worden. Studien zu Interleukin-8, Platelet Faktor 4, Fibroblast Wachstumsfaktoren und anderen Proteinen zeigen jedoch bereits, dass die Abfolge der stark und nicht sulfatierten Domänen die Interaktionen beeinflusst und teilweise sogar essentiell ist.^{109,156}

Ein großes Hindernis bei der detaillierten Untersuchung *globaler Sulfatierungsmuster* stellt die Einführung von sequenz-definierten Sulfatierungen dar. Um diese nun zu ermöglichen, wurde die Festphasensynthese nach Hartmann *et al.* (siehe 1.2.3) als synthetische Werkbank gewählt, die es ermöglicht sequenz-definierte Glykooligo(amidoamine) als Glykomimetika, also als Strukturen, die die natürlichen Vorbilder nachahmen, herzustellen. In Studien von Soria-Martinez *et al.* konnte bereits das Potenzial durch Festphasensynthese erhaltener und anschließend global sulfatierter Glykooligo(amidoamine) gezeigt werden. Die synthetisierten GlcNAc-funktionalisierten und global sulfatierten Strukturen zeigten *in vitro* eine antivirale Wirkung gegen HPV16, HSV-1, SV40 und IAV (siehe auch Kapitel 1.1.2).²⁶²

Aus synthetischer Sicht war ein großer Nachteil der gewählten Strategie, dass die Sulfatierung nicht auf der Festphase durchgeführt werden konnte, sondern erst im Anschluss in Lösung stattfand. Dies hatte zur Folge, dass die Sulfatierung nur global angewendet wurde und nicht mehr Teil der sequenz-definiert modulierbaren Arbeitsschritte war. Um nun also erstmalig eine segmentweise Sulfatierung von Glykooligo(amidoaminen) zu erlauben, wurde, wie im Folgenden erläutert, zunächst die Sulfatierung von Glykomakromolekülen auf der Festphase

ermöglicht und anschließend die Einführung von sulfatierten und nicht sulfatierten Domänen etabliert (siehe Abbildung 19C).

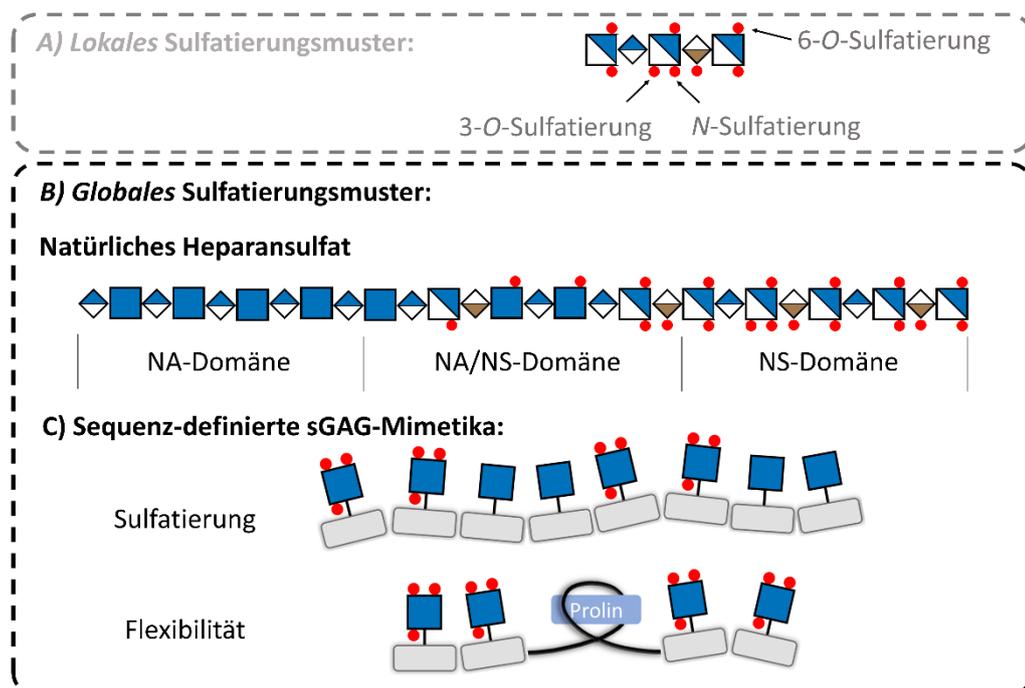


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Syntheseplanung zur Gewinnung von segmentweise funktionalisierten Glykooligomeren und Oligoprolin-Hybrid-Glykooligomeren.

Im nächsten Schritt wurde dann über die Einführung rigider Abschnitte im Oligomerrückgrat dessen Modifizierung und damit die Variation der Flexibilität der Gesamtstruktur ermöglicht (siehe Abbildung 19C). Insgesamt lassen sich so über das neu etablierte Syntheseprotokoll maßgeschneiderte sGAG-Mimetika erhalten. Abschließend wurden erstmalig die antikoagulativen Eigenschaften der hergestellten Zielstrukturen untersucht, welche einen wichtigen Faktor für mögliche therapeutische Anwendungen solcher Verbindungen darstellen können.

3.1.1 Etablierung eines Syntheseprotokolls zur Herstellung sulfatierter Glykooligo(amidoamine) auf der Festphase

Wahl des Linkers für die Festphasensynthese

Wie Sebastian Bauer in seiner Doktorarbeit zur Synthese monodisperser, sequenz-definierter sulfatierter *N*-Acetylglukosamin-Oligomere ausführlich schildert, ist die Synthese sulfatierter Glykomakromoleküle mittels der Festphasensynthese nach Hartmann *et al.* maßgeblich durch die Verwendung saurer Reaktionsbedingungen bei der finalen Oligomerabspaltung vom Harz gehindert. Diese führen während der Abspaltung zu einer Desulfatierung bereits sulfatierter Kohlenhydrate, sodass Produkte mit unzureichendem Sulfatierungsgrad erhalten werden.³¹⁷

Eine Lösung dieses synthetischen Problems stellt die Verwendung eines Linkers dar, der ohne Verwendung saurer Reaktionsbedingungen, also im gewissen Sinne orthogonal zu

vorhandenen Sulfatgruppen, gespalten werden kann und somit die Abspaltung sulfatierter Strukturen von der Festphase erlaubt. Es gibt inzwischen eine Vielzahl verschiedener Linker, die über saure, basische oder nukleophile Einwirkung gespalten werden können. Eine weitere interessante Klasse von Linkern aber stellen die photospaltbaren Linker dar, die ohne den Einsatz harsher Reaktionsbedingungen und durch Bestrahlung orthogonal zu konventionellen Synthesemethoden gespalten werden können.²⁹⁴

Die erste Veröffentlichung zur Synthese eines photolabilen Linkers zur Anbringung auf der Festphase beschrieb die Herstellung eines *O*-Nitrobenzyloxy-Linkers durch Rich und Gurwara im Jahr 1975, der unter anderem auch von Merrifield verwendet wurde.³¹⁸ Zahlreiche Derivate dieses ursprünglichen Linkers mit verschiedenen Eigenschaften wurden anschließend entwickelt und optimiert. Dennoch blieben Limitierungen durch lange Photolysezeiten und geringe Ausbeuten. In den 1990er Jahren dann wurde unter anderem von Holmes *et al.* ein *O*-Nitroveratryl(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-basierter Aminlinker vorgestellt, durch deren Bestrahlung Amid-terminierte Strukturen erhalten wurden.²⁹³⁻²⁹⁵ Ausführliche Untersuchungen zum Einfluss der aromatischen Substituenten auf die Reaktivität des Linkers zeigten eine Beschleunigung der Spaltung durch die Einführung eines elektronengebenden Alkoxy-Substituenten und einer Alkylgruppe an der α -Position des Amins. Auch eine größere Kettenlänge des Spacers zwischen Linker und Aromat war vorteilhaft.²⁹³⁻²⁹⁵ Dieser optimierte Linker ist inzwischen in Fmoc-geschützter Form kommerziell erhältlich und wurde zur Funktionalisierung des Harzes für die zu etablierende Synthese gewählt (siehe Abbildung 20). Als Harz wurde das TentaGel® S NH₂ Harz verwendet, da der Fmoc-Photo-Linker über eine stabile Amidbindung an dieses angebracht werden kann. Es sollten nun die Kompatibilität des Linkers mit den für die Festphasensynthese von Glykooligo(amidoaminen) etablierten Reaktionsbedingungen getestet sowie passende Bedingungen zur Sulfatierung und Abspaltung gefunden werden.

Ausführliche Evaluierung eines Festphasensyntheseprotokolls zur Herstellung sulfatierter Glykooligo(amidoamine)

Bei der Etablierung des Syntheseprotokolls wurde mittels Messung der UV-Absorption des bei der Fmoc-Entschützung gebildeten Dibenzofulvennebenprodukts der Reaktionsumsatz überwacht. Eine Reaktion ist dann vollständig, wenn die ursprüngliche Beladung des Harzes wiederhergestellt werden kann. Um die Messungen in den Arbeitsablauf zu integrieren, wurde ein spezielles Protokoll zur Beladungsbestimmung entwickelt. Bei exakter Harzeinwaage zu Beginn der Synthese konnte nach jeder Kupplung bei der anschließend durchgeführten Fmoc-Entschützung die ausgestoßene Lösung aufgefangen und verdünnt direkt zur Bestimmung der Beladung und somit des Reaktionsumsatzes genutzt werden (siehe auch Experimententeil).

Durch dieses Vorgehen konnte zunächst die Kupplung des Linkers, als auch jede weitere Bausteinkupplung *in-line* während der Synthese auf ihre Vollständigkeit hin überprüft werden. Für die Syntheseentwicklung wurden nach Kupplung des Linkers zunächst die gebräuchlichsten Bausteine EDS und TDS verwendet, die durch Entschützung des *N*-Terminus auf der Festphase und anschließende Kupplung an das Harz angebracht werden können. Dabei

wurde nach dem Festphasensyntheseprotokoll von Hartmann *et al.* und zusätzlich unter Lichtausschluss gearbeitet. EDS bietet generell die Möglichkeit die Hydrophilie einer Struktur zu erhöhen, wohingegen TDS zur späteren Seitenkettenfunktionalisierung mit Kohlenhydrat-Aziden notwendig ist (siehe Abbildung 20A). Es zeigte sich, dass die erste Bausteinkupplung sowohl bei der Verwendung von TDS als auch von EDS erst nach einer Doppelkupplung vollständig war. Dies kann eventuell durch die geringere Reaktivität des sekundären Amins des Photolinkers im Vergleich zu den sonst am *N*-Terminus vorhandenen primären Aminen begründet werden. Es wurde im nächsten Schritt an EDS und an TDS-funktionalisiertes Harz eine weitere EDS-Einheit gekuppelt (siehe Abbildung 20A). Hier war nur für das EDS-funktionalisierte Harz ein vollständiger Umsatz zu erkennen. Es ist zu vermuten, dass sich dies durch die höhere Hydrophilie des EDS-funktionalisierten Harzes erklären lässt. Die anschließende Kupplung einer TDS-Einheit als drittem Baustein war ebenfalls vollständig. Alle folgenden Synthesen wurde daher mit der Doppelkupplung von EDS als erstem Baustein begonnen und die Kupplungen abgesehen von dieser Anpassung nach Standardbedingungen durchgeführt.

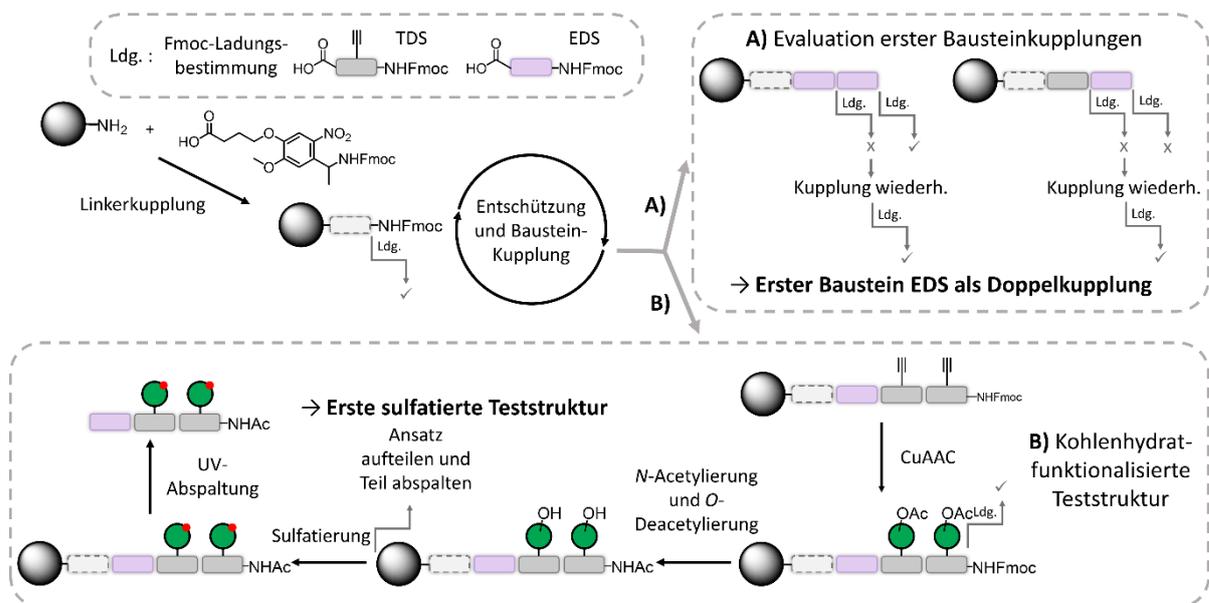


Abbildung 20: Arbeitsschritte der Linker-Etablierung: Linkerkupplung; A) Evaluation der ersten Bausteinkupplungen; B) Aufbau der ersten Teststruktur aus TDS und EDS unter Verwendung von Mannose-Azid, inkl. Sulfatierung; der Kupplungserfolg wurde durch Fmoc-Ladungsbestimmung verfolgt.

Als erste Teststruktur **T1** wurde dann ein divalentes Mannose-funktionalisiertes Glykooligomer aufgebaut (siehe Abbildung 20B). Dabei wurde nach der Kupplung der zweiten TDS-Einheit die Fmoc-Schutzgruppe auf dem Harz belassen, die Kohlenhydrat-Azide ((2-Azidoethyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid) per CuAAC angebracht, und erst dann die Fmoc-Entschützung durchgeführt. Die Beladung war auch nach der CuAAC unverändert. Dies zeigt, dass auch die Reaktionsbedingungen der CuAAC nicht zu einer ungewollten Spaltung des Linkers führten und dass allgemein die Vorsichtsmaßnahmen zum Lichtausschluss ausreichend waren. Anschließend wurde die Struktur EDS durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid *N*-terminal acetyliert und die Kohlenhydrate wurden unter Zemplén

Bedingungen *O*-deacetyliert (siehe Abbildung 20B).³¹⁹ Ein Teil des Harzes wurde zu diesem Zeitpunkt der Synthese abgenommen und durch Bestrahlung wurde das Glykooligomer **T1** erhalten.

Anhand dieser ersten Teststruktur wurden dann mit dem restlichen Harz verschiedene Sulfatierungsbedingungen getestet. Die Sulfatierung ist eine chemische Reaktion zur Bildung von Schwefelsäureestern, wodurch Schwefeltrioxid (SO₃)-Gruppen eingeführt werden. Die Sulfatierung mit aggressiven Reagenzien wie Sulfurylchlorid und Schwefelsäure oder auch mit gasförmigem oder flüssigem Schwefeltrioxid ist für empfindliche Edukte nicht geeignet. Stattdessen werden beispielsweise zur Sulfatierung der Hydroxylgruppen von Kohlenhydraten Schwefeltrioxid-Komplexe mit Aminen und Amiden wie Pyridin (Py), Trimethylamin und *N,N*-Dimethylformamid (DMF) eingesetzt.³²⁰⁻³²²

Die Sulfatierung mit 50 Äq. Py*SO₃ pro Hydroxylgruppe der Kohlenhydrate bei 70 °C über Nacht führte laut ¹H-NMR-Analytik nicht zum gewünschten Produkt. Unter den auch von Sebastian Bauer verwendeten Reaktionsbedingungen mit TMA*SO₃ (50 Äq. pro Hydroxylgruppe der Kohlenhydrate, bei 70 °C, über Nacht) hingegen konnte ein global sulfatiertes Glykooligomer (**T2**) erhalten werden.^{262,317} Der Erfolg der Sulfatierung ist gut erkennbar am Tieffeldshift der zu den Protonen der Kohlenhydrat-Einheiten gehörenden Signale im ¹H-NMR-Spektrum (siehe Abbildung 21).

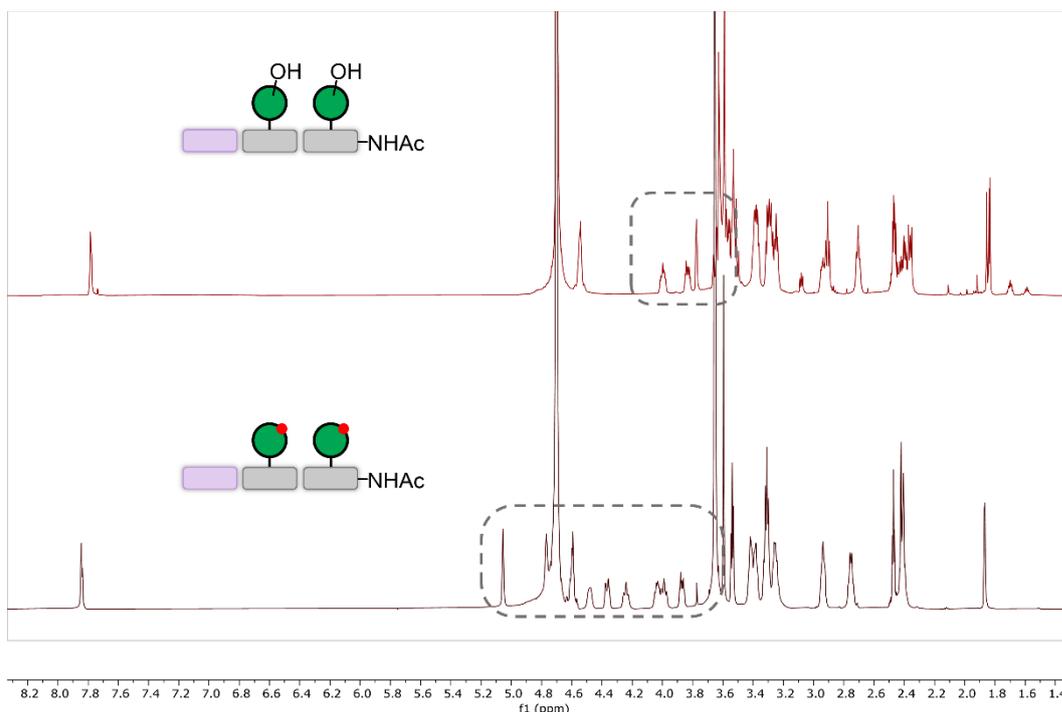


Abbildung 21: Auszüge der ¹H-NMR-Spektren der erfolgreich synthetisierten Teststrukturen **T1** (oben) und **T2** (unten).

Aufgrund der harschen Reaktionsbedingungen wurde die Sulfatierung in einem Festphasenglasreaktor mit Glasfritte durchgeführt. Anschließend wurde das Harz mit Natriumacetatlösung, Wasser und DMF gewaschen, um das im großen Überschuss verwendete Sulfatierungsreagenz zu entfernen.²⁶² Diese Filtrierungs- bzw. Waschschrte stellen eine einfache Möglichkeit zur Aufarbeitung des Produkts dar und sind ein großer

Vorteil gegenüber der Sulfatierung in Lösung. Anschließend wurde das Produkt unter Bestrahlung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 365$ nm abgespalten. Dazu wurde das Harz in einer Mischung aus Wasser und Acetonitril (1/1) in einem Schnappdeckelglas suspendiert und die Suspension auf einem Schüttler für mehrere Stunden bestrahlt. Das Harz wurde via Filtration mit Wasser und Acetonitril gewaschen und erneut zur Bestrahlung suspendiert. Nach mehreren solcher Abspaltzyklen wurden die gesammelten Fraktionen am Rotationsverdampfer eingengt und abschließend über Dialyse mittels Ultrazentrifugiereinheiten von verbleibenden Unreinheiten befreit und das finale Produkt nach Gefriertrocknung erhalten.

Vor der Synthese der finalen Zielstrukturen sollte als abschließende vorbereitende Untersuchung überprüft werden, ob der Linker unter den Reaktionsbedingungen des Festphasensyntheseprotokolls und der Sulfatierung inert ist. Dies sollte dazu dienen eventuelle Nebenreaktionen des Linkers, die zu dessen Deaktivierung und somit zu verminderten Ausbeuten führen könnten, auszuschließen. Solche Nebenreaktionen wären über die Fmoc-Bestimmung und die bisher verfügbare Analytik nicht zu detektieren gewesen. Deshalb wurde säurelabiles TentaGel® S RAM Harz mit dem Fmoc-Photo-Linker funktionalisiert, EDS und anschließend TDS gekuppelt und geschütztes GlcNAc-Azid (3,4,6-tri-O-Acetyl- β -D-GlcNAc Azid) über CuAAC eingeführt, deacetyliert und ein Anteil davon sulfatiert. Anschließend konnten die unsulfatierte und die sulfatierte Teststrukturen **T3** bzw. **T3S** unter Erhalt der Linker-Einheit unter sauren Bedingungen abgespalten werden. Die $^1\text{H-NMR}$ -Analytik zeigte die Unversehrtheit des Linkers nach Durchführung aller Reaktionsschritte, da die Signale der beiden aromatischen Protonen des Linkers weiterhin die gleiche chemische Verschiebung und entsprechenden Integrale aufwiesen, wie sie für den unbehandelten Linker detektiert werden (siehe Anhang).

Die insgesamt positive Evaluierung des Syntheseprotokolls war Grundlage für die Herstellung global sulfatierter und segmentweise sulfatierter Glykomakromoleküle sowie für die Herstellung global sulfatierter Oligoprolin-Hybrid Strukturen, die im Folgenden beschrieben werden soll.

3.1.2 Synthese sulfatierter GlcNAc-funktionalisierter Oligo(amidoamine) mit spezifisch variierbaren Eigenschaften als sGAG-Mimetika

Es wurden nun insgesamt fünf sulfatierte Glykooligo(amidoamine) nach dem etablierten Protokoll hergestellt, wobei als Kohlenhydrat GlcNAc-Azid verwendet wurde, da dieses auch als Bestandteil von HS-Polysacchariden vorkommt.³²³ Die schematische Darstellung aller synthetisierten Glykooligo(amidoamine) ist in Abbildung 22 gezeigt.

Die Strukturen können in drei Klassen unterteilt werden. Die erste Klasse bilden zwei global sulfatierte Strukturen (**1S**, **2S**). Die zweite Klasse von Strukturen trägt segmentweise Sulfatierungsmuster (**3S**, **4S**) und die letzte Verbindung kann als global sulfatierte Oligoprolin-Hybrid-Struktur beschrieben werden (**5S**).

Ergebnisse und Diskussion

Die sulfatierten Verbindungen wurden mittels Elementaranalyse (EA), $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und HR-ESI-MS untersucht und der Sulfatierungsgrad (englisch: *degree of sulfation*, DS) über zwei verschiedene Methoden bestimmt. Zum einen wurde der DS über Elementaranalyse (für Details der Berechnung siehe Experimenterteil) und zum anderen mittels $^1\text{H-NMR}$ -Analytik ermittelt. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum können für das anomere Proton des sulfatierten Hauptprodukts und des unsulfatierten Nebenprodukts ein Haupt- bzw. ein Nebenpeak (siehe grauer Kasten in Abbildung 24) detektiert werden. Es wurde daher das Signal des Triazolprotons auf den zu erwartenden Wert normiert und anschließend der Haupt- und der Nebenpeak des anomeren Protons integriert und aus dem Verhältnis der Integrale der Sulfatierungsgrad bestimmt. Die erhaltenen Sulfatierungsgrade variieren von 84 bis 97% und sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die erhaltenen Werte zeigen eine globale Sulfatierung der hergestellten Strukturen.

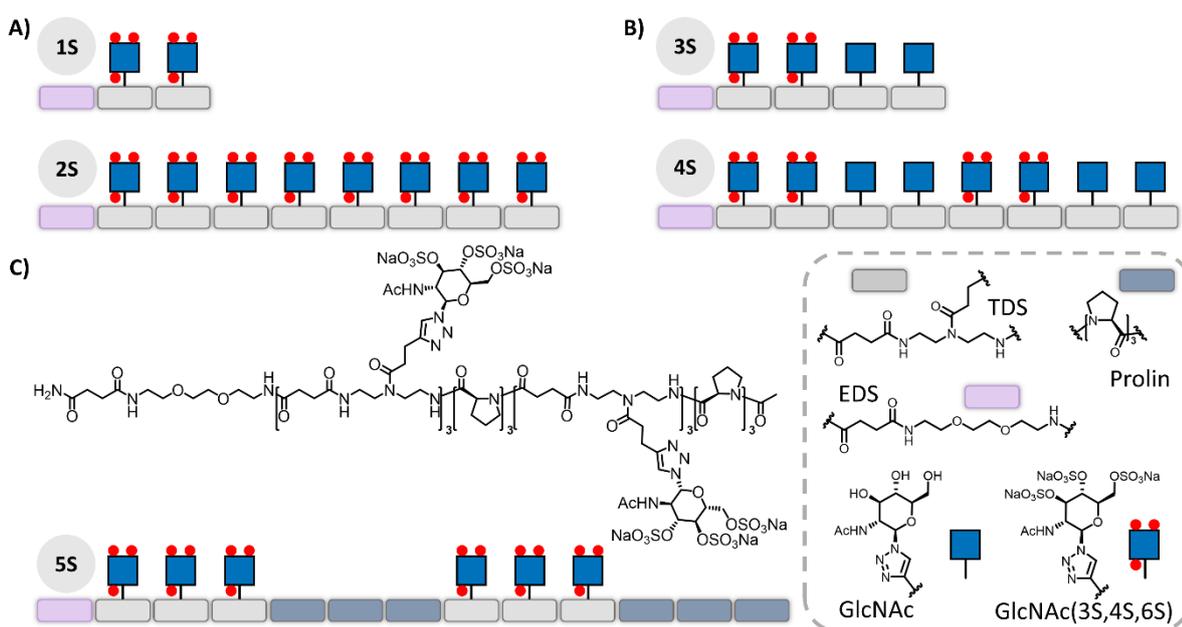


Abbildung 22: Schematische Darstellung aller GlcNAc-funktionalisierten Zielstrukturen A) global sulfatiert (1S, 2S); B) segmentweise sulfatiert (3S, 4S); C) global sulfatierte Oligoprolin-Hybrid-Struktur (5S), sowie beispielhaft die chemische Struktur für 5S.

Für alle dargestellten Zielstrukturen wurden ebenfalls die entsprechenden unsulfatierten Strukturen als Referenz hergestellt; entweder über Bestrahlung eines Anteils an Harz vor der Sulfatierung oder unter Verwendung der Standardbedingungen nach Hartmann *et al.* am TentaGel® S RAM Harz. Die unsulfatierten Strukturen wurden mittels $^1\text{H-NMR}$, RP-HPLC-MS und HR-ESI charakterisiert (siehe Anhang).

Tabelle 1: Sulfatierungsgrade bestimmt über EA und $^1\text{H-NMR}$ -Analytik sowie Ausbeuten für die synthetisierten sulfatierten GlcNAc-Oligo(amidoamine).

Glykooligomere	Nr.	DS bestimmt mittels		Ausbeute [%]
		$^1\text{H-NMR}$ [%]	EA [%]	
A) Global sulfatiert	1S	91	84	10
	2S	91	88	20
B) Segmentweise sulfatiert	3S	91	89	23
	4S	97	96	41
C) Oligoprolin-Hybrid	5S	85	87	21

Für die Synthese von **1S** wurde im Gegensatz zu den anderen Verbindungen die Ansatzgröße von 0,0125-0,025 auf 0,1 mmol erhöht, um zu überprüfen, ob eine Hochskalierung möglich ist. Die Analytik zeigte eine erfolgreiche Synthese ohne Verminderung von Reinheit oder Sulfatierungsgrad. Die geringere relative Ausbeute ist über eine hohe Lichtstreuung der stark konzentrierten Harzsuspension während der Bestrahlung zu erklären. Dies ließe sich aber durch die Durchführung mehrerer Abspaltungsvorgänge mit kleinen Portionen der Gesamtmenge Harz umgehen und sollte dann auch zu entsprechend zufriedenstellenden relativen Ausbeuten führen. Anhand der octavalenten global sulfatierten Struktur **2S**, die mit einer Ausbeute von 20% und einem Sulfatierungsgrad von 91% (bestimmt über ein $^1\text{H-NMR}$) erhalten wurde, konnte gezeigt werden, dass die Syntheseroute inklusive der Sulfatierung auch für höhervalente Systeme anwendbar ist.

Die Ausbeuten liegen insgesamt im Bereich von 10 bis 41%, womit sie vergleichbar mit den Ergebnissen anderer veröffentlichter Arbeiten sind, bei denen ein photospaltbarer Linker eingesetzt wurde.³²⁴⁻³²⁵ Eine Limitierung bei der Ausbeute stellt die Zugänglichkeit des Harzes dar, wie unter anderem von Bakhtan *et al.* ausgiebig untersucht wurde. Das einfallende Licht erreicht nur die photospaltbaren Einheiten auf dem äußeren Teil der Harzkügelchen und es kann somit nur ein Teil des hergestellten Produkts abgespalten werden. Solch eine Problematik ließe sich durch den Einsatz eines spezifisch modifizierten Harzes umgehen, wie es von Kim *et al.* hergestellt wurde. Die *core-shell*-Struktur des Harzes bewirkt hier, dass die funktionellen Gruppen lediglich auf der Oberfläche der Harzkügelchen präsentiert werden, wodurch hohe Ausbeuten von 95% erreicht werden können.

Synthese segmentweise sulfatierter GlcNAc-funktionalisierter Oligo(amidoamine)

Um segmentweise sulfatierte Glykomakromoleküle zu erhalten, die das *globale Sulfatierungsmuster* von HS nachahmen sollen, musste das vorgestellte Syntheseprotokoll modifiziert werden (siehe Abbildung 23).

Festphasensynthese segmentweise sulfatierter Glykooligo(amidoamine)

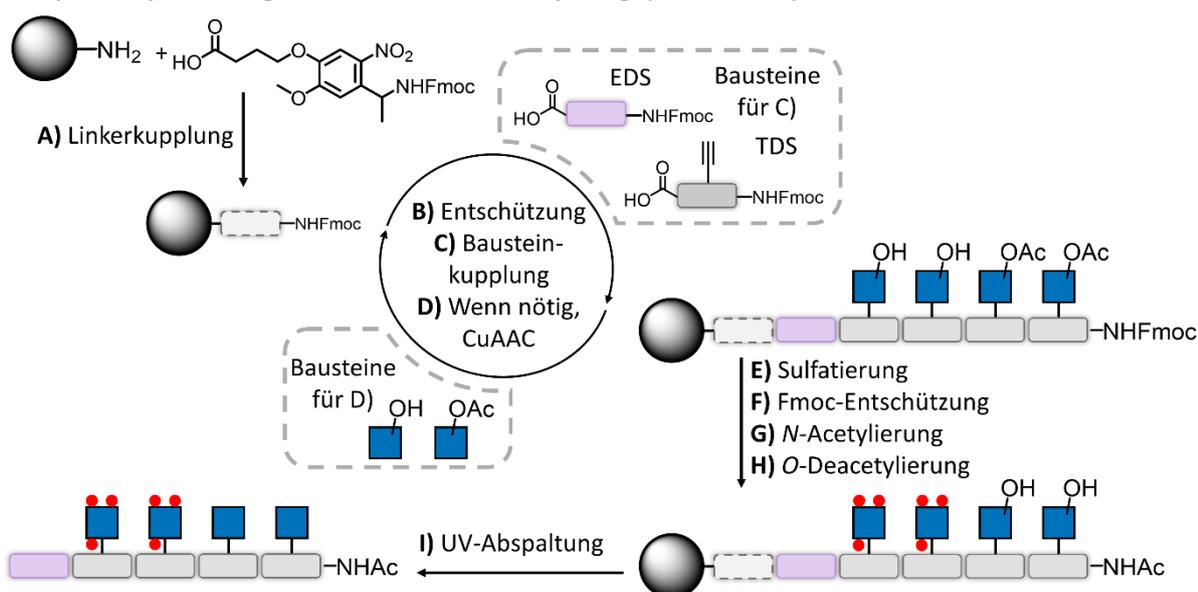


Abbildung 23: Syntheschema für die Herstellung segmentweise sulfatierter Glykooligomere: A) Kupplung des Fmoc-Photo-Linkers; B) Fmoc-Entschützung; C) Baustein-Kupplung mit TDS oder EDS; D) falls in diesem Schritt vorgesehen, CuAAC mit GlcNAc in acetylierter oder deacetylierter Form; E) Sulfatierung der freien Hydroxylgruppen; F) Fmoc-Entschützung; G) N-Acetylierung; H) O-Deacetylierung; I) Abspaltung von der Festphase durch Bestrahlung.

Nach Anbringung des Linkers am TentaGel® S NH₂ Harz wurden zunächst EDS und zwei TDS-Einheiten gekuppelt. Anschließend wurde zuvor O-deacetyliertes GlcNAc-Azid über CuAAC an die Seitenketten der ersten beiden TDS-Einheiten angebracht. Anschließend wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe entfernt und die Kupplung zwei weiterer TDS-Bausteine durchgeführt, wieder gefolgt von der Seitenkettenfunktionalisierung durch CuAAC, wobei nun geschütztes GlcNAc-Azid verwendet wurde. Für Zielstruktur **3S** wurde dann die Sulfatierung durchgeführt, wobei nur die Hydroxylgruppen der ersten beiden, ungeschützten Kohlenhydrat-Einheiten umgesetzt wurden. Anschließend wurde das terminale Amin Fmoc-entschützt, N-acetyliert und die geschützten Kohlenhydrate O-deacetyliert. Nach Bestrahlung und Aufreinigung wurde die Zielstruktur erhalten. Für Verbindung **4S** wurde die gesamte Abfolge von Kupplungsschritten und Seitenkettenkonjugationen noch einmal wiederholt, um eine octavalente Struktur herzustellen. Die erhaltenen Glykooligomere sind in Abbildung 22B schematisch dargestellt.

Die Auszüge der ¹H-NMR-Spektren der unsulfatierten (**2**, **4**) und sulfatierten octavalenten (**2S**, **4S**) global und segmentweise sulfatierten Verbindungen sind in Abbildung 22 dargestellt. Der Vergleich von **2** und **2S** zeigt deutlich den Tieffeldshift der Signale der Ringprotonen der Kohlenhydrat-Einheiten durch die Sulfatierung. Auch die Acetylierung führt zu einem signifikanten Tieffeldshift der entsprechenden Kohlenhydrat-Ringprotonen (**2**), wodurch ein charakteristisches Signalmuster entsteht (siehe Abbildung 22C).

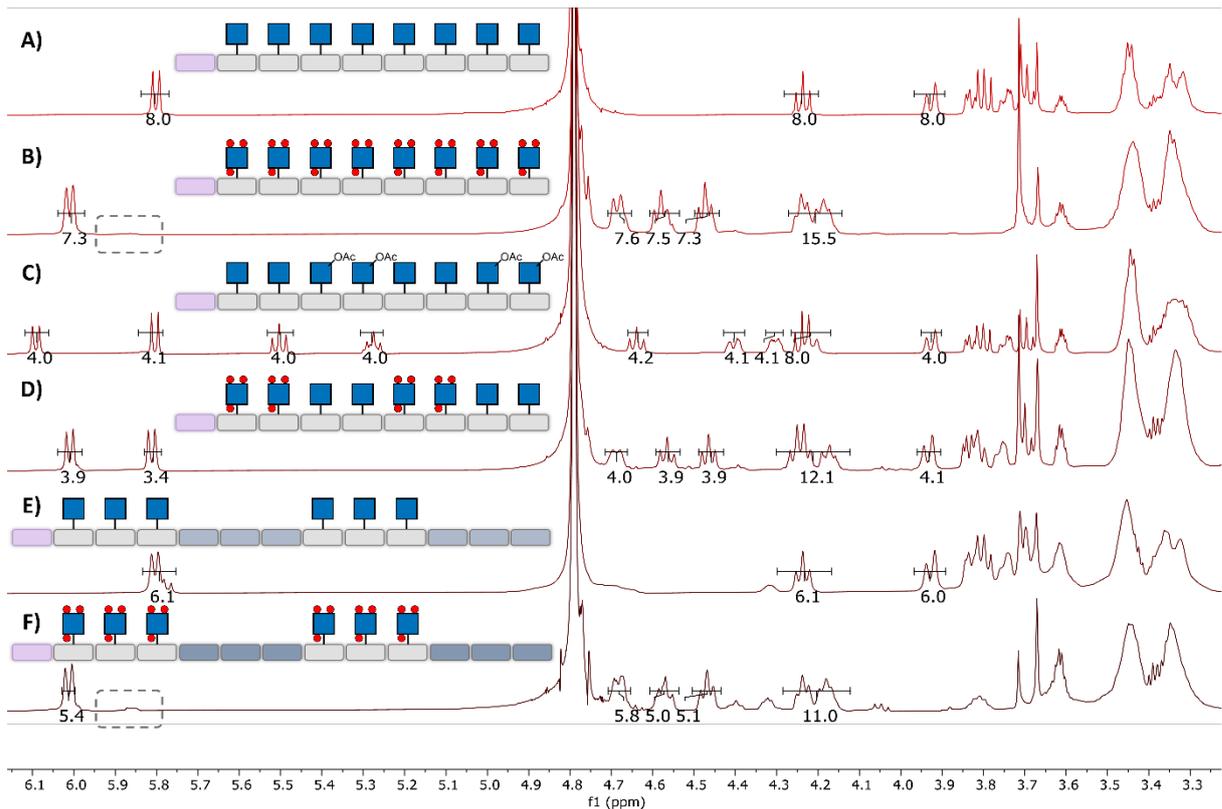


Abbildung 24: Auszüge der ^1H -NMR-Spektren von A) **2**; B) **2S**; C) **4**; D) **4S**; E) **5**; und F) **5S**; mit grauen Kästen sind die verbleibenden Signale der anomeren Protonen der unsulfatierten Kohlenhydrate markiert, alle integrierten Signale gehören zu Protonen der Kohlenhydrate. Das Spektrum zeigt deutlich die Verschiebung der Protonensignale der Kohlenhydrat-Einheiten durch Sulfatierung oder Acetylierung (die vollständigen Spektren sind im Anhang dargestellt).

Die vergleichbar hohen Sulfatierungsgrade der segmentweise sulfatierten Verbindungen von 89 bis 97% zeigen, dass die *O*-Deacetylierung nach der Sulfatierung keinen Einfluss auf die Sulfatierung hat. Somit konnten erfolgreich segmentweise sulfatierte Glykooligo(amidoamine) erhalten werden.

Synthese einer sulfatierten GlcNAc-funktionalisierten Oligoprolin-Hybrid Struktur

Um neben dem globalen Sulfatierungsmuster nun auch die Rückgrateigenschaften der Glykomakromoleküle zu variieren, wurde die Einbringung einer Oligo-L-Prolin-Einheit getestet. Oligo-L-Proline besitzen eine inhärente Rigidität, die zur Bildung von linksdrehenden Helices führt und somit zu einer hohen strukturellen Starrheit und Definition. Daher werden Oligo-L-Proline auch als sogenannte *molecular rulers* verwendet (siehe Abbildung 25).³²⁶⁻³²⁸ So wurden beispielsweise von Kroll *et al.* radioaktiv markierte Oligo-L-Proline als starre Gerüste genutzt, um in definierten Distanzen Antagonisten für den Gastrin freisetzenden Peptidrezeptor zu installieren, da solche Systeme Anwendung in der Tumorbildgebung und -therapie haben können.³²⁹

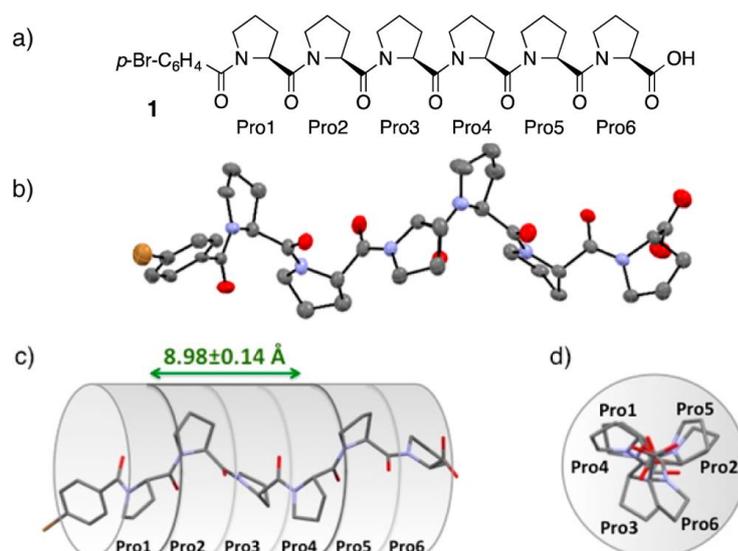


Abbildung 25: a) Hexaprolin $p\text{-Br-C}_6\text{H}_4\text{-Pro}_6\text{-OH}$ b) Kristallstruktur von Hexaprolin (ORTEP) c) Segmentweise Seitenansicht d) Sicht entlang der Achse (Nachgedruckt mit Erlaubnis von Wilhelm, P.; Lewandowski, B.; Trapp, N.; Wennemers, H. A Crystal Structure of an Oligoproline P π i-Helix, at Last. Journal of the American Chemical Society **2014**, 136 (45), 15829-15832. DOI: 10.1021/ja507405j. Copyright 2014 American Chemical Society).

Für die Modifizierung der sulfatierten Glykooligo(amidoamine) wurde Fmoc-L-Pro-OH (Pro) verwendet und als Trimer zwischen trivalenten TDS-Blöcken eingeführt, sodass sich in der Zielstruktur Oligoprolin und TDS-Segmente abwechseln (siehe Abbildung 22C). Die Analytik der unsulfatierten (**5**) und sulfatierten Struktur (**5S**) zeigt zufriedenstellende Reinheiten bzw. Sulfatierungsgrade sowie Ausbeuten (siehe Tabelle 1 und Anhang). Und der Vergleich der ^1H -NMR-Spektren zeigt erneut die charakteristische Tieffeldverschiebung der Kohlenhydrat-Ringprotonen aufgrund der Sulfatierung (siehe Abbildung 24) und somit die erfolgreiche Synthese der Zielstruktur.

3.1.3 Koagulationsstudien mit sulfatierten GlcNAc-funktionalisierten Oligo(amidoaminen)

Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 erläutert ist HP für seine antikoagulativen Eigenschaften bekannt und wird als Blutgerinnungshemmer verwendet.^{140,142} HS weist ebenso, wenn auch schwächere, antikoagulative Eigenschaften auf und es gibt zahlreiche Beispiele für das Design und die Synthese von sGAG-Mimetika, die diese biologische Aktivität besitzen.^{232,256,267,330-331} Die antikoagulative Wirkung von sGAGs und deren Mimetika basiert auf der Aktivierung von Antithrombin (AT). AT ist in der Lage die Gerinnungsfaktoren der Blutgerinnungskaskade, die zu den Serinproteasen gehören, zu binden und zu inhibieren und wird daher als Serinproteaseinhibitor (Serpine) bezeichnet.^{140,142} Durch diese Inhibition wird letztendlich die Verklumpung des Blutes verzögert (siehe auch Kapitel 1.1.2).¹⁴³ Um die Fähigkeit von sGAG-Mimetika zur Aktivierung von AT also zur Verzögerung der Blutgerinnung zu untersuchen, kann die aktivierte partielle Thromboplastin Zeit (englisch: *activated partial thromboplastin time*, APTT) gemessen werden. Für Anwendungen von sGAG Mimetika außerhalb der Blutgerinnungshemmung kann eine antikoagulative Eigenschaft zu Nebenwirkungen führen. In diesen Fällen ist eine minimale Beeinflussung der Blutgerinnung gewünscht. Während die

antiviralen Eigenschaften global sulfatierter GlcNAc-funktionalisierter Glykooligo(amidoamine) wie oben beschreiben bereits nachgewiesen wurden, ist deren antikoagulatives Verhalten bisher nicht untersucht worden und die hergestellten Strukturen sollten diesbezüglich charakterisiert werden. Die Studien wurden vom Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf unter Leitung von Dr. Hermsen durchgeführt.

Hierzu wurde für die global sulfatierten (GS) di- bzw. octavalenten Glykooligomere **1S** und **2S**, das segmentweise sulfatierte (SWS) octavalente Glykooligomer **4S** und das sulfatierte Oligoprolin-Hybrid Glykooligomer **5S** die APTT bei zwei verschiedenen Konzentrationen (150 und 250 µg/ml) bestimmt. Als Kontroll- bzw. Referenzmessungen wurden zudem eine Blutprobe, die nur mit Puffer versetzt wurde, sowie eine mit dem unsulfatierten (US) octavalenten Glykooligomer **2** und eine mit Heparin behandelte Probe untersucht (siehe Tabelle 2).

Die global sulfatierten Strukturen **2S** und **5S** zeigten einen deutlichen Einfluss auf die APTT, wobei der Einfluss von **2S** bei einer Konzentration von 250 µg/ml mit einer Verlängerung der APTT von 27 auf 56 s und somit ungefähr einer Verdopplung am höchsten war. Die octavalente segmentweise sulfatierte Struktur hingegen zeigte nur einen leichten Einfluss auf die APTT und die divalente global sulfatierte Verbindung **7S** hatte keinen Effekt. Auch für die Negativkontrolle mit dem unsulfatierten Glykooligomer **2** blieb die APTT unverändert im Vergleich zur Probe mit Pufferzusatz. Heparin hingegen verlängerte die APTT um mehr als 150 s, was den Messbereich überschreitet. In anderen Studien wurde für Heparin bei einer Konzentration von 100 µg/ml eine Verlängerung der APTT auf ungefähr 600 s gemessen.³³¹ Die antikoagulativen Wirkstoffe Arixtra® und niedermolekulares Heparin verlängern, wie Oh *et al.* gezeigt haben, die APTT um das 4 bzw. 2,5-fache.²⁶⁷ Der antikoagulative Effekt der synthetisierten Glykooligomere ist somit deutlich geringer und vergleichbar mit dem von HS, welches die APTT bei 100 µg/ml auf 54 s verlängert.³³⁰

Tabelle 2: Gemessene APTT für das unsulfatierte (US) octavalente Glykooligomer **2**, die global sulfatierten (GS) Glykooligomere **1S** und **2S**, das segmentweise sulfatierte (SWS) octavalente Glykooligomer **4S**, das global sulfatierte Oligoprolin-Hybrid-Oligomer, für Heparin und für einen Blank, bei dem lediglich Puffer zugesetzt wurde.

Glykooligomere	Nr.	APTT [s]	
		150 µg/ml	250 µg/ml
US Octa	2	-	27
GS Di	1S	28	27
GS Octa	2S	46	56
SWS Octa	4S	30	31
GS Hybrid	5S	36	39
Kontrolle - Heparin		> 150	-
Kontrolle - Puffer		28	

Ergebnisse und Diskussion

Ein sGAG-Mimetikum mit ähnlichen antikoagulativen Eigenschaften wie die der Glykooligomere ist PG545, ein Cholesterol-funktionalisiertes Tetrasaccharid mit einer APTT von 72 s bei einer Konzentration von 100 µg/ml. Dieser Vergleich ist besonders interessant, da für PG545 in klinischen Studien bereits die therapeutische Verträglichkeit nachgewiesen wurde.³³²⁻³³³ Die synthetisierten Glykooligomere besitzen also relativ geringe antikoagulative Eigenschaften, sodass bei einer Anwendung als antivirale Inhibitoren im getesteten Konzentrationsbereich nicht mit Nebenwirkungen durch die Beeinflussung der Blutgerinnung zu rechnen sein sollte.

Zusammenfassend zeigen die vorgestellten Ergebnisse, dass die Einführung eines photospaltbaren Linkers und die Etablierung eines entsprechenden Syntheseprotokolls erstmalig die Herstellung maßgeschneiderter sulfatierter Glykooligo(amidoamine) erlaubt. So wird die Variation des *globalen Sulfatierungsmusters* nach Segmenten und die Modifizierung der Rückgratzusammensetzung durch Einführung starrer Oligo-L-Prolin-Einheiten ermöglicht, wodurch strukturelle Eigenschaften der natürlichen Heparansulfate nachgeahmt werden können. Zum ersten Mal wurden zudem die antikoagulativen Eigenschaften solcher Verbindungen untersucht, wobei die antikoagulative Aktivität insgesamt als gering eingestuft werden kann.

3.2 Synthese Membrananker-tragender sGAG-Mimetika und deren Anwendung in ersten Studien zu Virus-Membran-Interaktionen

Seit Beginn der COVID-19-Pandemie ist die Bedeutung der Glykokalyx für die Infektion mit Viren verstärkt in den Fokus der Forschung gerückt. Zahlreiche Viren nutzen membranverankerte sGAGs zur Anbindung an die Zelle zu Beginn des Infektionsprozesses (siehe auch 1.1.2).¹⁷⁰ Die genauen Mechanismen dieser Interaktionen jedoch sind nicht vollständig entschlüsselt, was unter anderem an der limitierten Verfügbarkeit definierter Liganden liegt.^{164,202} Die Verwendung künstlicher Glykomimetika kann nun sowohl die Identifizierung von potenten Inhibitoren als auch, sofern strukturell definierte Liganden verwendet werden, die Entschlüsselung von Struktur-Wirkung-Beziehungen der Ligand-Protein-Interaktionen erlauben.²⁰⁷ Für die Studie von Viren ist dabei die Untersuchung der ablaufenden Prozesse im dynamischen Ensemble auf Membranen von großer Bedeutung. Verschiedene Studien zeigen bereits das Potenzial der Verwendung von Liposomen als Zellmimetika sowie der künstlichen Modifizierung natürlicher Membranen im Zuge des *de novo Glycocalyx Engineering* zur Betrachtung von Protein- und auch Virus-Membraninteraktionen (siehe auch 1.1.3).^{215,219} Die Ansteuerung von Viren mittels sGAG-Mimetika-funktionalisierter Membranen hingegen wurde bisher nicht untersucht. Aufbauend auf den Ergebnissen des vorherigen Kapitels zur Synthese von sequenz-definierten sGAG-Mimetika sollte daher nun eine synthetische Plattform entwickelt werden, die das Design einer Strukturbibliothek von sGAG-mimetischen Strukturen zur Funktionalisierung von Liposomen und Zellmembranen erlaubt. Durch den Einbau der erhaltenen Strukturen in Membranen sollte dann die Untersuchung der Interaktion der erhaltenen, spezifisch funktionalisierten Membranen mit Viren ermöglicht werden. Zunächst stand dabei die Etablierung der Liposomfunktionalisierung als Zellmimetika im Fokus. Dieses System kann zum einen dazu genutzt werden, den Erfolg der Membranfunktionalisierung zuverlässig zu evaluieren. Als simplifiziertes Zellmimetikum erlaubt es zudem die genaue Untersuchung von Struktur-Wirkung-Beziehungen bei der Studie von Virusinteraktionen. Finales Ziel bei der Entwicklung der Synthesepattform war es darüber hinaus die Dekoration natürlicher Membranen im Sinne des bereits vorgestellten *de novo Glycocalyx Engineering* (siehe Kapitel 1.1.3) zu ermöglichen.

Die im Folgenden vorgestellten Arbeiten zum Design membranverankerter sGAG-Mimetika umfassen vier Strukturklassen A bis D, die in Abbildung 26 schematisch dargestellt sind. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden insbesondere für die Anbringung des Membranankers an die sGAG-Mimetika verschiedene synthetische Strategien getestet. Als Membrananker wurden zum einen Cholesterol und zum anderen Lipide, die aus einer polaren Kopfgruppe und zwei unpolaren Alkylketten bestehen, verwendet. Liposomen, die mit dem Pentasaccharid Fondaparinux funktionalisiert sind, stellen die Strukturklasse A und den ersten Abschnitt der synthetischen Arbeiten dar (siehe 3.2.1). Im zweiten Abschnitt (siehe 3.2.2) werden zwei Klassen von Präzisionsglykomakromolekülen, die durch Festphasensynthese erhalten wurden,

zur Membrandekoration vorgestellt. Zum einen sind diese Strukturen Fondaparinux-funktionalisiert (B) und zum anderen tragen sie sulfatierte Mannose-Einheiten (C).

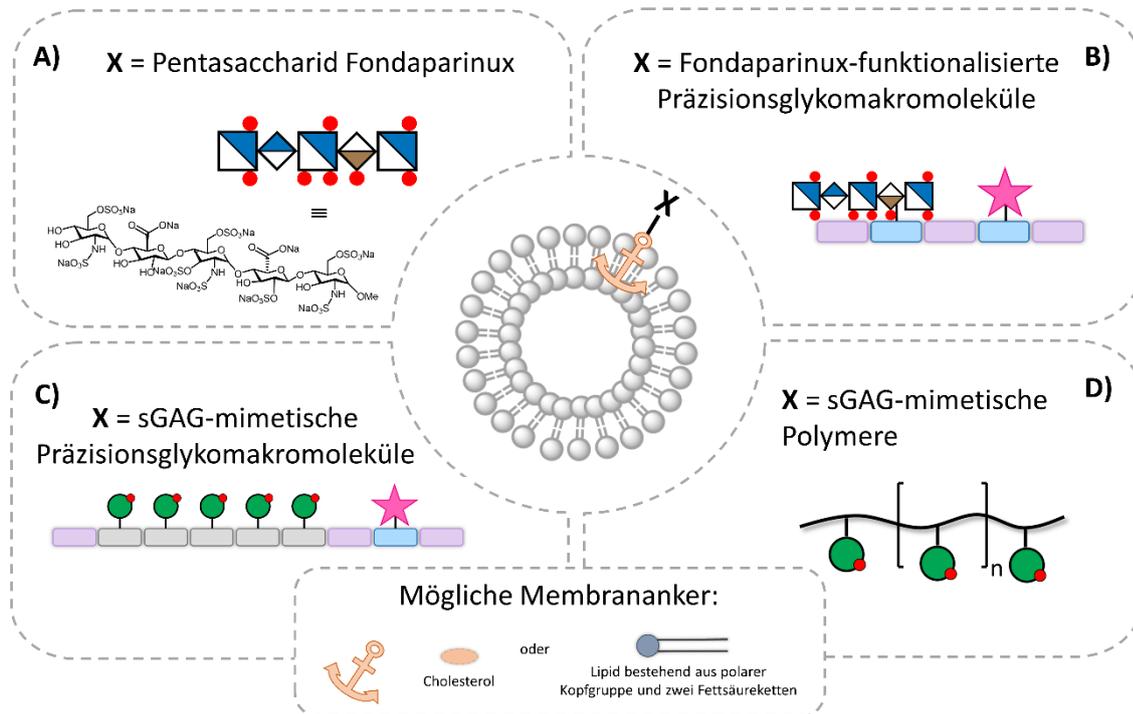


Abbildung 26: Vier verschiedenen Klassen von Strukturen zur Präsentation auf Liposomen: A) das Pentasaccharid Fondaparinux; B) Fondaparinux-funktionalisierte Präzisionsglykomakromoleküle; C) sGAG-mimetische sulfatierte Mannose-funktionalisierte Präzisionsglykomakromoleküle und D) sGAG-mimetische sulfatierte Mannose-funktionalisierte Polymere (Design und Synthese durch Lorand Bonda im Rahmen seiner Promotion).

Die Synthese der membranverankerten sGAG-mimetischen Polymere aus Strukturklasse D ist nicht Teil dieser Arbeit, sondern wurde von Lorand Bonda im Rahmen seiner Promotion durchgeführt. Da diese Strukturen aber ebenfalls einen wichtigen Bestandteil der Studie von Virusinteraktionen (siehe 3.2.3) darstellen, sollen sie hier kurz vorgestellt werden. Für die Synthese der Polymere wurden durch Festphasensynthese erhaltene Makroinitiatoren verwendet, die bereits vor der Polymerisation mit dem entsprechenden Membrananker funktionalisiert wurden. Nach der Polymerisation und Sulfatierung konnten sie so zur Dekoration von Membranen verwendet werden.

3.2.1 Funktionalisierung von Liposomen mit Fondaparinux

Wie in Kapitel 1.1.2 bereits vorgestellt ist Fondaparinux ein unter dem Markennamen Arixtra® erhältliches Pentasaccharid, welches die essenzielle Sequenz von Monosacchariden und Sulfatierungen zur Aktivierung von Antithrombin enthält und als Blutgerinnungshemmer Verwendung findet.¹⁴¹ Solch ein kommerziell erhältliches sGAG-Pentasaccharid ist auch zur Ansteuerung anderer biologischer Prozesse wie der Interaktion mit Viren von großem Interesse.

Um mit Fondaparinux oder allgemein mit sGAG-Mimetika und Glykanen funktionalisierte Liposomen zu erhalten, stehen verschiedene Strategien zur Verfügung, die in Abbildung 27

schematisch zusammengefasst sind.³³⁴⁻³³⁵ Zunächst einmal ist wie in A dargestellt eine Konjugation des Membranankers in Lösung möglich.³³⁴ Vorteil ist hier, dass das erhaltene Produkt durch analytische Methoden wie Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie charakterisiert werden kann. Dies wiederum ermöglicht eine Umsatzbestimmung und den Einsatz definierter Mengen Konjugat bei der Funktionalisierung von Membranen. Ein Nachteil ist, dass die Aufarbeitung durch Dialyse keine Entfernung des nicht umgesetzten Membranankers erlaubt, da dieser sich zusammen mit dem Konjugat in supramolekularen Aggregaten anordnet und so in der Dialysekammer verbleibt. Zudem kann die Wahl des Lösungsmittels entsprechend der Löslichkeit der Reaktanden, die sich in ihrer Hydrophilie teilweise stark unterscheiden, eine Herausforderung darstellen. Bei Synthesestrategie B wird daher die Konjugation nach einer im Folgenden als *Grafting-to*-Ansatz bezeichneten Strategie auf der Oberfläche bereits formulierter Liposomen durchgeführt.³³⁵ Dieser Ansatz umgeht insbesondere eventuelle Löslichkeitsprobleme. Die Reaktion wird in wässrigem Medium durchgeführt, in dem die hydrophilen Liganden auf die polaren Kopfgruppen der Lipide treffen. Es kann zudem eine verbesserte Zugänglichkeit und Reaktivität der funktionellen Gruppen der Lipide angenommen werden, da diese durch die Integration in die Liposommembran eine gewisse Fixierung erfahren. Nachteil dieser Methode ist, dass für gewöhnlich eine Lipidmischung zur Herstellung stabiler Liposomen nötig ist und somit ein Produktgemisch erhalten wird, bei dem sich nun weder Umsatz noch Menge des erhaltenen Konjugates über klassische analytische Methoden exakt bestimmen lassen. Es kommt hinzu, dass sich bei der Liposomherstellung ein Anteil der reaktiven Gruppen auch im Inneren der Liposomen anordnen wird, der somit nicht funktionalisiert werden kann.³³⁵

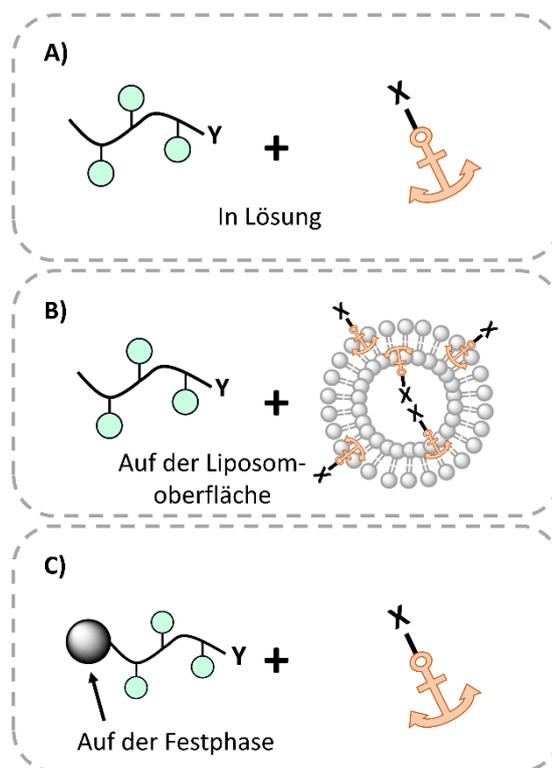


Abbildung 27: Synthetische Strategien zur Ligand-Lipid-Konjugation: A) Konjugation in Lösung; B) Konjugation auf der Liposomoberfläche; C) Konjugation auf der Festphase.

Als letzte hier vorgestellte Option ist eine Konjugation von Membranankern auf der Festphase wie in C gezeigt möglich.³³⁵ Dies ist allerdings nur anwendbar für Strukturen, die zuvor auf der Festphase aufgebaut wurden. Dann bietet diese Methode jedoch verschiedene Vorteile. Durch einfaches Waschen ist eine Abtrennung überschüssigen Membranankers möglich, sodass dieser nicht wie in A und B in der Produktmischung verbleibt. Nachdem das Produkt abgespalten wurde, können dann nicht umgesetzte Liganden durch Dialyse abgetrennt werden, wodurch ausschließlich das Konjugat erhalten werden sollte. Zudem können die erhaltenen Strukturen mittels Massen- und NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Durch die separat erfolgende Anbringung von Bindungsepitopen und Membrananker wird außerdem eine größere Flexibilität bei der Lösungsmittelwahl in Bezug auf den jeweiligen Reaktanden erhalten. Das Quellverhalten des Harzes und die Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen auf dem Harz müssen allerdings ebenfalls berücksichtigt werden.

Da es zunächst das Ziel war Fondaparinux direkt an ein Lipid zu konjugieren, um ein Glykolipid zu erhalten, und die Konjugation in Lösung für die Synthese von Ligand-Lipid-Konjugaten in Abschnitt 3.3.2 erfolgreich gewesen war, wurde als Erstes die Strategie A zur Synthese von Fondaparinux-Lipid-Konjugaten getestet. Fondaparinux präsentiert zwei Carboxylgruppen, die zur Konjugation an Hydroxylgruppen-tragende Lipide über eine Esterbindungsbildung oder an Amin-funktionalisierte Lipide via Amidbindungsbildung genutzt werden können und ist gut in Wasser nicht aber in organischen Lösungsmitteln löslich. Dies macht es nötig ein wässriges System zur Konjugation zu verwenden; zudem müssen Kupplungsreagenzien eingesetzt werden, um die Konjugationsreaktion zu fördern. Um passende Reaktionsbedingungen zu finden, muss also sowohl die Löslichkeit als auch die Stabilität der Reaktanden, insbesondere der Kupplungsreagenzien, berücksichtigt werden.

Als Erstes sollte die Konjugation des C18-Ceramids *N*-Stearoyl-D-erythro-sphingosin über eine Esterbindung über die Hydroxylgruppe der Lipidkopfgruppe getestet werden wie es in Abbildung 28A dargestellt ist. Ceramide stellen den Lipidteil von Glykosphingolipiden dar, zu denen z.B. die Ganglioside und Sulfatide gehören, die in der Glykokalyx eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Zell-Zell-Interaktionen einnehmen.³³⁶

Konjugationsversuche zur Konjugation von Fondaparinux in Lösung

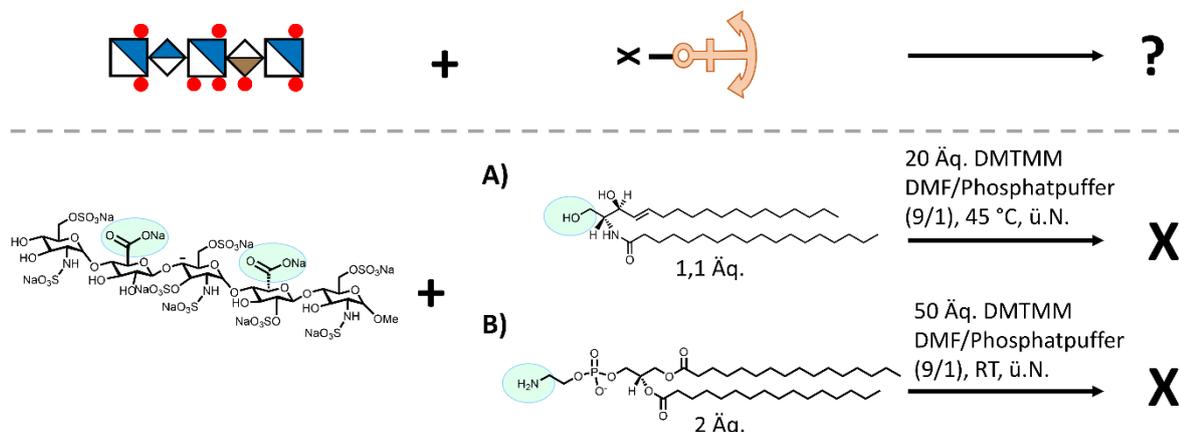


Abbildung 28: Versuche zur Fondaparinux-Lipid-Konjugation in Lösung: A) mit dem C18-Ceramid *N*-Stearoyl-D-erythro-sphingosin; B) mit dem Phospholipid DPPE; blau unterlegt sind die reaktiven Gruppen.

DMTMM (4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholiniumchlorid) ist ein wasserlösliches Kupplungsreagenz, welches sowohl zur Amidierung als auch zur Esterifizierung genutzt werden kann. Wie eine Studie von Alini *et al.* zur Kupplung von Aminen an Hyaluronsäure zeigt, ist das Kupplungsreagenz DMTMM dem häufig verwendeten EDC/NHS-System (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und *N*-Hydroxysuccinimid) in dieser Anwendung überlegen und insbesondere weniger pH-sensitiv.³³⁷ Es wurde zudem von Baier *et al.* bereits erfolgreich zur Konjugation von Glykomakromolekülen mit Fondaparinux in Lösung genutzt³³⁸, kann sich jedoch in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, DMF und DMSO selbst zersetzen.³³⁹⁻³⁴⁰ Die Testansätze wurden angelehnt an die Arbeiten von Baier *et al.* in einem Lösungsmittelgemisch von DMF und Phosphatpuffer (9/1) über Nacht durchgeführt. Zunächst wurde die Konjugation mit 2 mg Fondaparinux unter Einsatz von 20 Äq. DMTMM und 1,1 Äq. Ceramid getestet. Um die Löslichkeit des Ceramids in DMF zu verbessern, wurde dieses zunächst im Ultraschallbad bei 40 °C behandelt und die Reaktion bei 45°C unter Rühren über Nacht durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend gegen Wasser dialysiert. Die ¹H-NMR-Analytik zeigte jedoch keine Umsetzung zum Produkt.

Eine von vielen möglichen Erklärungen liegt in einer unzureichenden Reaktivität der Hydroxylgruppe des Ceramids. Daher wurde im nächsten Schritt die Lipidkomponente gewechselt und die Konjugation des Phospholipids DPPE (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin), welches ein Amin an seiner Kopfgruppe trägt und somit eine höhere Nukleophilie und Reaktivität aufweisen sollte, getestet (siehe Abbildung 28B). Zudem wurde mit 50 Äq. DMTMM und 2 Äq. Lipid gearbeitet. Die entstandene leicht trübe Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und das Gemisch dialysiert. Erneut konnte mittels ¹H-NMR-Analytik keine Umsetzung zum gewünschten Produkt nachgewiesen werden.

Mögliche Parameter, die das Ergebnis der Reaktion beeinflussen, sind insbesondere die Löslichkeit der Reaktanden, vor allem der Lipidkomponenten, die in beiden Ansätzen nicht optimal in Lösung gebracht werden konnten, sowie die Reaktivität der funktionellen Gruppen. Statt eine Optimierung der Reaktionsbedingungen durchzuführen, wurde daher nun die Synthesestrategie B, nach dem *Grafting to*-Ansatz (siehe Abbildung 27B), getestet. Diese umgeht, wie zuvor geschildert, das Problem der Löslichkeit, da sich die hydrophoben Lipidschwänze im Inneren der Liposommembran anordnen und die hydrophilen Kopfgruppen sowie Liganden im verwendeten wässrigen Puffer gut löslich sind. Es muss somit kein organisches Lösungsmittel verwendet werden, was zusätzlich einen positiven Effekt auf die Stabilität des eingesetzten DMTMM haben sollte. Zudem wird durch die strukturell stärker fixierte Präsentation der funktionellen Gruppen eine höhere Reaktivität erwartet.

Um diesen Ansatz verfolgen zu können, musste zunächst eine Lipidmischung gefunden werden, die ausreichend hohe Anteile an DPPE enthält und gleichzeitig die Bildung von stabilen Liposomen zulässt. Es wurde dafür nach einem von Rademacher *et al.* etablierten und auch in Arbeiten von Freichel *et al.* verwendeten Protokoll gearbeitet.^{90,341} Kurz gefasst

Ergebnisse und Diskussion

werden definierte Mengen von Stammlösungen der gewünschten Lipidkomponenten in ein Reagenzglas pipettiert, die organischen Lösungsmittel unter Hochvakuum entfernt und der gebildete Lipidfilm unter Einsatz von Ultraschall und Vortexen in PBS-Puffer resuspendiert. Mit Hilfe von Extrusion durch Membranen mit Porengrößen von 200 und 100 nm wird anschließend die Größe der gebildeten Vesikel vereinheitlicht. Mit dem Ziel das System möglichst simpel zu gestalten, wurde zunächst versucht aus ausschließlich DPPE und aus Mischungen von DPPE mit Cholesterol Liposomen zu formulieren. Cholesterol wurde eingesetzt, da es eine wichtige Komponente natürlicher Membranen ist und einen großen Einfluss auf die Stabilität bzw. auch Fluidität von Membranen hat.³⁴²⁻³⁴³ Die Ablösung des Lipidfilms und Bildung einer feinen Suspension war dabei in allen Fällen unvollständig und die Suspensionen ließen sich mit den verfügbaren Membranen nicht extrudieren. Es schien jedoch ein positiver Effekt des Cholesterols beobachtbar zu sein. Als weitere Membrankomponente wurde nun DSPC (1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) eingesetzt, da dieses auch in den verwendeten Protokollen zum Einsatz kommt. Für drei verschiedene verwendete Mischungsverhältnisse konnten nun erfolgreich Liposomen hergestellt und über DLS und Zetapotentialmessung charakterisiert werden (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Zusammensetzung und Ergebnisse der DLS- sowie Zetapotentialmessungen für drei getestete Liposomformulierungen unter Verwendung von DPPE sowie die Analyseergebnisse für die Liposomen mit einem Verhältnis von 60/30/10 nach der Funktionalisierung mit Fondaparinux.

Zusammensetzung [mol%]			Durchmesser ¹ (PDI) ³ [nm]	Zetapotential ² (SD) ⁴ [mV]	
DPPE	DSPC	Cholesterol			
Vor Funktionalisierung:					
20	60	20	150,4 (0,029)	-7,65 (0,60)	
40	50	10	164,6 (0,090)	-7,99 (1,05)	
60	30	10	156,7 (0,076)	-7,10 (0,24)	
Nach Funktionalisierung:					
60	30	10	168,6 (0,090)	-34,85 (0,85)	

¹ Bestimmt durch DLS-Messungen mit einem Zetasizer Nano ZS.

² Mittelwert aus der Messung in Duplikaten bestimmt über Zetapotentialmessungen mit einem Zetasizer Nano ZS.

³ Polydispersität der Liposomen bestimmt durch das Messprogramm des Zetasizer.

⁴ Standardabweichung bestimmt aus der Messung in Duplikaten.

Da der dritte getestete Ansatz den höchsten DPPE-Anteil aufweist, wurde dieser für die Reaktion zur Fondaparinux-Funktionalisierung genutzt wie sie in Abbildung 29 dargestellt ist.

Zur Liposomsuspension in PBS-Puffer (650 µl), bei deren Herstellung 1,8 µmol DPPE verwendet wurden, wurde eine Lösung von Fondaparinux (3 Äq. bezogen auf DPPE) und DMTMM (5 Äq. bezogen auf DPPE) ebenfalls in PBS-Puffer gelöst (250 µl) hinzugegeben. Die Liposomen wurden über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln mit der Reaktionslösung inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit den funktionalisierten Liposomen (**6**) durch Dialyse aufgearbeitet und mittels DLS- und Zetapotentialmessungen charakterisiert. Es wurde eine deutliche Steigerung des Zetapotentials von -7,33 auf -35,7 mV beobachtet, was auf eine

erfolgreiche Funktionalisierung hindeutet. Das eingebrachte Fondaparinux erhöht durch seine hohe Zahl an Ladungen das negative Potential der Liposomoberfläche.

Konjugation von Fondaparinux auf der Liposomoberfläche

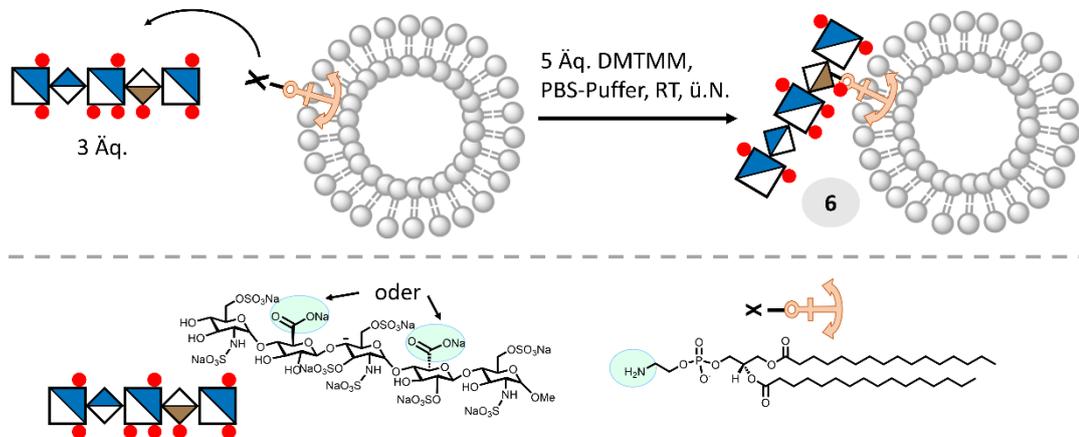


Abbildung 29: Schema der Reaktion zur Funktionalisierung von vorformulierten Liposomen mit Fondaparinux zur Synthese der funktionalisierten Liposomen (6).

Welche der beiden Carboxylgruppen des Pentasaccharids bei der Konjugation an DPPE reagiert hat, lässt sich anhand dieser Analysemethoden nicht bestimmen. Ebenso ist, wie bereits weiter oben für die Synthesestrategie B diskutiert wurde, keine direkte Quantifizierung der Fondaparinuxbeladung möglich. Die Umsetzung der Reaktion kann unvollständig sein. Auf jeden Fall aber wird sich ein Teil des eingebauten DPPE im Inneren der Liposomen befinden und somit unzugänglich für die Funktionalisierung sein. Die Messungen zur Partikelgrößenbestimmung zeigen, dass die Partikel leicht vergrößert sind aber weiterhin eine geringe Polydispersität aufweisen, was darauf schließen lässt, dass sie über den Verlauf der Reaktion und Aufreinigung stabil waren.

Da die erhaltene Lipidmischung nur im Ganzen in Liposomen oder Zellen eingebaut werden kann, ist keine Kontrolle über die final präsentierte Fondaparinuxmenge möglich. Dennoch bietet die Methode die Möglichkeit Fondaparinux-funktionalisierte Glykolipide zu erhalten, die zur Modifizierung von Membranen genutzt werden können. Die Änderung der Syntheseroute und die Verwendung des *Grafting-to*-Ansatzes erlaubt die erfolgreiche Funktionalisierung des DPPE mit Fondaparinux. Nach unserem besten Wissen ist dies die erste Arbeit zur Synthese einer solchen Lipidmischung mit einem Fondaparinux-funktionalisierten Glykolipid. Die Membranen können so mit einem sGAG-Pentasaccharid funktionalisiert werden, wodurch die natürliche Membrandekoration durch HSPGs nachgeahmt wird (siehe auch Abbildung 36). Daher wurde die Probe zur Untersuchung der Interaktion mit Virus-ähnlichen Partikeln (englisch: *virus-like particles*, VLP) des Humanen Papillomavirus 16 in Liposomen eingebaut. Hier zeigte sie positive Resultate, was die erfolgreiche Funktionalisierung der Lipide weiter untermauert. Zudem zeigte das durchgeführte Experiment, dass das konjugierte Fondaparinux seine biologische Funktion als Anbindungspunkt für Viren auch nach der Konjugation behält. Details dieser Experimente sind in Abschnitt 3.2.3 erläutert.

3.2.2 Etablierung einer Plattform zur Synthese verschiedener sGAG-mimetischer Glykomakromoleküle mit Membrananker

Auch wenn die im vorherigen Abschnitt präsentierte Funktionalisierung von Liposomen mit Fondaparinux erfolgreich war, sollte nun ein anderer Ansatz getestet werden, um die Funktionalisierung von Liganden mit Membranankern durchzuführen. Das übergeordnete Ziel der in diesem Kapitel vorgestellten Arbeiten war, wie bereits erwähnt, die Etablierung einer Plattform zur Synthese von sGAG-mimetischen Strukturen zur Dekoration von Membranen. Solch eine Plattform sollte die zuverlässige und leicht variierbare Herstellung der Zielstrukturen ermöglichen. Statt dem Erhalt von Produktgemischen, wie im vorherigen Abschnitt geschildert, ist zudem die Synthese von Produkten mit niedriger Dispersität wünschenswert. Daher sollte nun die Festphasensynthese nach Hartmann *et al.*^{91,250,308,338} als synthetisches Werkzeug eingesetzt werden, die mehrere Vorteile bietet. So ist eine einfache und zuverlässige Produktaufarbeitung inklusive der Entfernung von überschüssigem Membrananker und somit eine bessere Charakterisierung der erhaltenen Strukturen möglich (siehe auch Abbildung 27C). Außerdem bietet die Festphasensynthese die Möglichkeit, einfache Variationen des aufgebauten Rückgrats und der entsprechenden Funktionalisierung durchzuführen.

Um eine direkte Untersuchung von Virus-Liposom- bzw. Membraninteraktionen durch optische und Fluoreszenz-Mikroskopie zu ermöglichen, ist eine Markierung der Strukturen mit einem Farbstoff von großem Vorteil. Durch die Verwendung der Festphasensynthese konnte der Farbstoff, in diesem Fall wurde Rhodamin gewählt, wenn gewünscht, an das Rückgrat angebracht werden. Die Etablierung eines Syntheseprotokolls zur Synthese von Membrananker-tragenden Fondaparinux-funktionalisierten Oligo(amidoaminen) (siehe auch Abbildung 26B) sowie zur Synthese von sulfatierten Mannoseoligo(amidoaminen) mit Membranankern (siehe Abbildung 26C) soll im Folgenden vorgestellt werden. Die Synthesen wurden im Rahmen einer paritätischen Zusammenarbeit zusammen mit Luca-Cesare Blawitzki durchgeführt.

Synthese Fondaparinux-funktionalisierter Membrananker-tragender Präzisionsglykomakromoleküle

Die erste Syntheseroute, die zur Herstellung Fondaparinux-funktionalisierter Membrananker-tragender Präzisionsglykomakromoleküle getestet wurde, ist in Abbildung 31 dargestellt. Zunächst sollte nur die Konjugation des Fondaparinux an ein Festphasen-verankertes Oligo(amidoamin) getestet werden, weshalb die Anbringung des Membranankers in diesem Experiment noch nicht durchgeführt wurde, sondern die Struktur stattdessen *N*-terminal acetyliert wurde. Dadurch wurden die Syntheseroute und die Analytik der erhaltenen Strukturen vereinfacht.

Konjugationsversuch zur Fondaparinux-Konjugation auf der Festphase

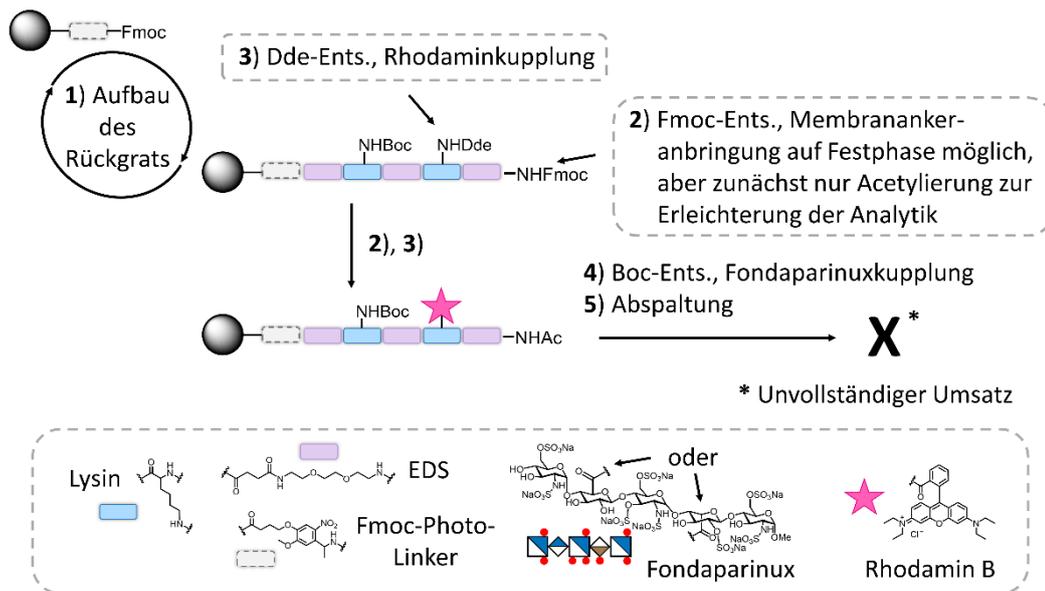


Abbildung 30: Syntheschema für den ersten Versuch zur Synthese von Fondaparinux-funktionalisierten Präzisionsglykomakromolekülen über folgende Schritte: 1) Aufbau des Oligo(amidoamin)-Rückgrats; 2) Fmoc-Entschützung und N-Acetylierung; 3) Dde-Entschützung und Rhodaminkupplung; 4) Boc-Entschützung und Fondaparinuxkupplung; 5) Abspaltung; die Syntheseroute bietet die Möglichkeit durch spätere Modifizierung auch einen Membrananker einzubringen.

Es wurde als Erstes das in Abbildung 31 gezeigte Rückgrat aufgebaut. Die Verwendung von orthogonal geschütztem Boc- und Dde-Lysin beim Aufbau der Struktur sollte die spezifische Funktionalisierung mit dem Farbstoff Rhodamin bzw. dem Fondaparinux-Bindungsmotiv ermöglichen. Der in Kapitel 3.1 eingeführte Fmoc-Photo-Linker wurde verwendet, um eine schonende Abspaltung Fondaparinux-funktionalisierter Oligo(amidoamine) zu erlauben. Die Fondaparinux-Konjugation an die aufgebaute Struktur wurde in zwei Ansätzen getestet. Generell wurde sich bei der Wahl der Reaktionsbedingungen an den Arbeiten aus dem vorherigen Abschnitt zur Funktionalisierung der Liposomoberfläche sowie an den Arbeiten von Baier *et al.* orientiert und erneut DMTMM als Kupplungsreagenz verwendet. Beim ersten Ansatz wurden 2 Äq. Fondaparinux, 20 Äq. DMTMM und 10 Äq. DIPEA verwendet und die Reaktion wurde in einem Gemisch von THF und Wasser über Nacht durchgeführt. THF als organisches Lösungsmittel wurde gewählt, da das Harz darin entsprechend der Herstellerangaben gut quillt und DMTMM in THF im Vergleich zu DMF eine höhere Stabilität aufweisen sollte.^{340,344} Nach der Abspaltung von der Festphase wurde allerdings nur unfunktionalisiertes Rückgrat erhalten. Daher wurden die Reaktionsbedingungen geändert und es wurden 3 Äq. Fondaparinux, 20 Äq. DMTMM und 10 Äq. DIPEA in einem Lösungsmittelgemisch aus DMF und Wasser verwendet. Bei dieser Reaktion wurde nach der Abspaltung ein teilweise Fondaparinux-funktionalisiertes Oligomer erhalten. Jedoch zeigte die ¹H-NMR-Analytik nur einen geringen Umsatz. Es scheint, dass die Erhöhung der Äquivalente oder die Änderung des Lösungsmittels einen positiven Einfluss auf die Reaktion hatte. Diese Änderungen waren jedoch nicht ausreichend, um einen hohen Reaktionsumsatz zu erhalten.

In der als Orientierung genutzten Arbeit von Baier *et al.* war, wie bereits erwähnt, ein anderer Ansatz erfolgreich verwendet worden. Hier wurde die Kupplungsreaktion in Lösung

durchgeführt und beide Carboxylgruppen des Fondaparinux wurden mit den Lysinseitenketten von Sialinsäure-funktionalisierten Oligo(amidoaminen) umgesetzt. Es konnte unter Einsatz von 1,5 Äq. Glykooligo(amidoamin) pro Carboxylgruppe eine Ausbeute von 74% erzielt werden. Es kann vermutet werden, dass die funktionellen Gruppen des Oligomers auf dem Harz in ihrer Zugänglichkeit beschränkt bzw. sterisch abgeschirmt sind. Die Zugänglichkeit für das selbst sterisch relativ anspruchsvolle Fondaparinux-Molekül kann somit unzureichend sein. Auch wenn eine vollständige Durchführung der Synthese inklusive Fondaparinux- und Membrananker-Konjugation auf der Festphase wünschenswert wäre, wurde daher als nächstes die in Abbildung 31 gezeigte Syntheseroute getestet, bei der die Konjugation des Fondaparinux in Lösung erfolgte. Da das säurelabile Fondaparinux-Motiv also erst im Anschluss an die Festphasensynthese eingebracht wurde, konnte nun das TentaGel® S RAM Harz für den Aufbau des Oligo(amidoamins) verwendet werden.

Fondaparinux-Konjugation in Lösung und Membrananker-Konjugation auf der Festphase

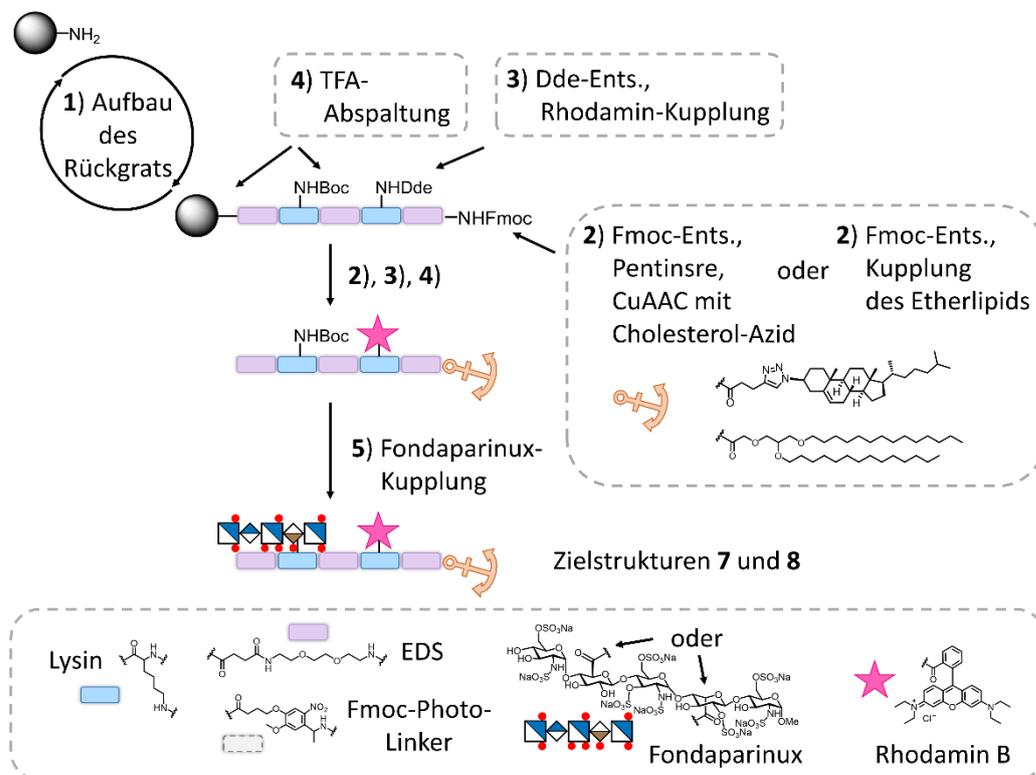


Abbildung 31: Syntheserouten zur Herstellung von Fondaparinux-funktionalisierten Glykomakromolekülen unter Verwendung der Festphasensynthese zur Membrankanker-Konjugation und der Durchführung der Fondaparinux-Konjugation in Lösung über folgende Schritte: 1) Aufbau des Oligo(amidoamin)-Rückgrats; 2) Fmoc-Entschützung und Membranankereinführung; 3) Dde-Entschützung und Rhodaminkupplung; 4) Abspaltung unter sauren Bedingungen und Boc-Entschützung; 5) Fondaparinuxkupplung in Lösung.

Außerdem wurde jetzt der Membrankanker auf der Festphase eingebracht, um die zuvor diskutierten Vorteile der in Abbildung 27C gezeigten Synthesestrategie nutzen zu können. Es wurde also zunächst das vollständige bereits Rhodamin-funktionalisierte Oligomerrückgrat inklusive des Membranankers aufgebaut. Dazu wurde nach dem Aufbau des Rückgrats, N-terminal Fmoc-entschützt und der Membrananker angebracht. Als Membrananker wurde zum einen Cholesterol verwendet. Dazu wurde zunächst Pentinsäure als letzter Baustein gekuppelt

und anschließend Cholesterol als Azid durch CuAAC konjugiert (siehe Abbildung 31).³⁴⁵ Alternativ wurde als Membrananker ein synthetisches Etherlipid basierend auf einem Glycerolkern verwendet, welches inspiriert von einer Arbeit von Delaveris *et al.* von Luca-Cesare Blawitzki hergestellt wurde (siehe ebenfalls Abbildung 31).³⁴⁶ Anschließend wurde die entsprechende Lysinseitenkette Dde-entschützt und Rhodamin B an das frei gewordenen Amin konjugiert. Die Abspaltung der Struktur von der Festphase durch TFA erlaubte die simultane Freisetzung der Boc-geschützten Lysinseitenkette. Die erhaltenen Zwischenstufen **ZS-7**, mit dem Etherlipid-Membrananker, und **ZS-8**, *N*-terminal Cholesterol-funktionalisiert, wurden über ¹H-NMR-Spektroskopie, ESI-MS und HR-ESI-MS charakterisiert (siehe Experimententeil). Anschließend wurden die Rhodamin- und Membrananker-funktionalisierten Oligo(amidoamine) in einer Konjugationsreaktion mit Fondaparinux in Analogie zu den Arbeiten von Baier *et al.* umgesetzt.^{338,347} Die erste Konjugation erfolgte in einem Gemisch aus DMF und Phosphatpuffer (pH = 6,5) unter Einsatz von 20 mg **ZS-7** und 2,7 Äq. Fondaparinux sowie 50 Äq. DMTMM über Nacht. Nach Aufreinigung durch Zentrifugation in Dialysezentrifugiereinheiten mit einem MWCO (englisch: *molecular weight cut-off*) von 10 000 g/mol zur Entfernung des überschüssigen Fondaparinux und DMTMM wurde das Etherlipid-funktionalisierte Produkt **7** über ¹H-NMR-Analytik und ESI-MS charakterisiert. Der hohe MWCO kann bei der Aufreinigung wie auch schon zuvor verwendet werden, da die Membrananker-funktionalisierten Systeme im wässrigen Dialysemedium supramolekulare Aggregate formen, die in der Kammer verbleiben. Für Verbindung **7** sind in Abbildung 32 die ¹H-NMR-Spektren der Verbindung **7** selbst (D), des verwendeten Ether-Lipids (A), der eingesetzten Zwischenstufe **ZS-7** vor der Fondaparinux-Funktionalisierung (B) sowie des zur Funktionalisierung eingesetzten Fondaparinux (C) dargestellt. In der Darstellung ist klar erkennbar, dass sowohl die Signale des Fondaparinux (blau umrahmt) als auch des Lipids (orange umrahmt) sowie des Oligomerrückgrats (grau umrahmt) im Spektrum des finalen Produkts wiederzufinden sind. Die vollständige Zuordnung findet sich im Experimententeil. Es kann beobachtet werden, dass für das Konjugat **7** und für **ZS-7** die Signale, die dem Rhodamin zugeordnet werden können, unterdrückt werden und die Signale des Lipidschwanzes stark verbreitert sind. Solche Beobachtungen wurden auch für die anderen hergestellten Strukturen (siehe nächster Abschnitt) sowie bereits in vorherigen Arbeiten in der Gruppe von Laura Hartmann zur Synthese von Membrananker-tragenden Oligo(amidoaminen) gemacht. Ein Wechsel des Lösungsmittels oder eine Erhöhung der Temperatur bei der Messung konnten diese Effekte nur teilweise vermindern.³⁴⁸⁻³⁴⁹ Auch in den Arbeiten von Purcell *et al.* wird eine Unterdrückung der Protonen des Membranankers, in diesem Fall Cholesterol, beobachtet.³⁵⁰ Es kann allgemein davon ausgegangen werden, dass die unpolaren Molekülteile im wässrigen Medium zur Verminderung des Kontakts zum Lösungsmittel Vesikel oder andere Formen von assemblierten Systemen bilden. Aufgrund der großen Kopfgruppe der Amphiphile scheint eine Bildung regelmäßiger Lipiddoppelschichten bzw. Vesikel unwahrscheinlich, im Gegenteil kann davon ausgegangen werden, dass die Assemblierungen in ihrer Form und Geometrie komplexer sind. Auch die unpolaren Rhodamin-Einheiten können an solchen Assemblierungsprozessen beteiligt sein. Generell können solche Zusammenlagerungen letztendlich zu einer erhöhten lokalen Viskosität bzw. einer Einschränkung des sogenannten *molecular tumbling* und somit zu einer schlechteren Sichtbarkeit dieser Molekülteile im NMR-Experiment führen.³⁵¹⁻³⁵² Der Vergleich der einzelnen ¹H-NMR-Spektren zusammen mit der

Ergebnisse und Diskussion

Verwendung des Kaisertests zur Reaktionsüberprüfung und den massenanalytischen Daten ermöglicht es dennoch die Struktur zu charakterisieren und die erfolgreiche Synthese nachzuweisen.

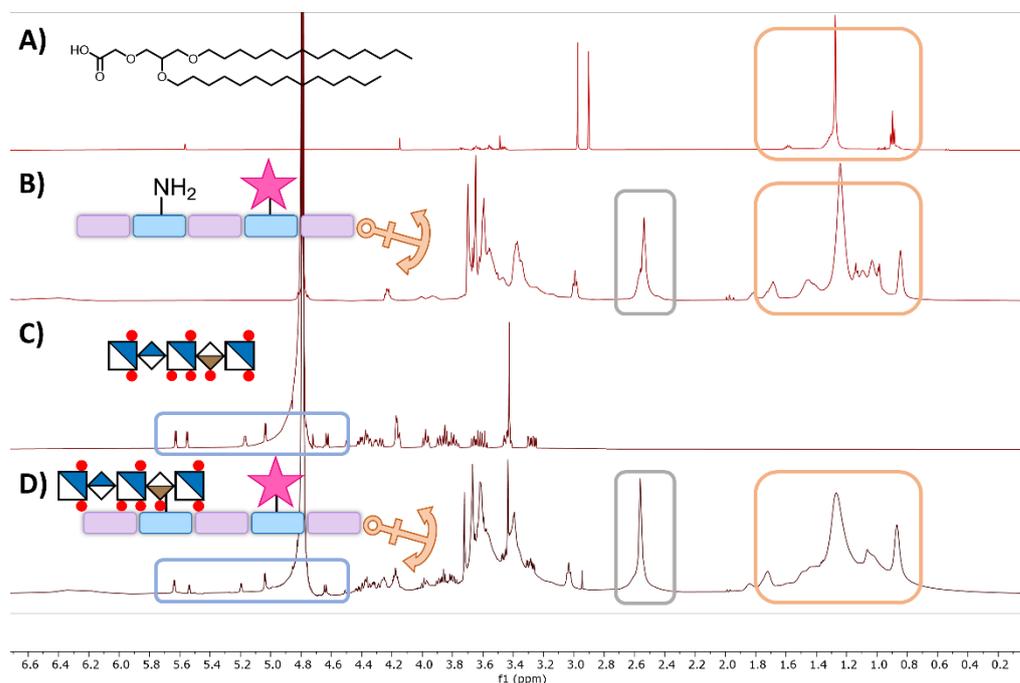


Abbildung 32: ^1H -NMR-Spektren A) des verwendeten Etherlipids; B) des Oligomers mit dem Etherlipid als Membrananker vor der Funktionalisierung; C) des Fondaparinux-Edukts; D) des Oligomers mit dem Etherlipid nach der Funktionalisierung mit Fondaparinux (**7**); mit blau umrandet die Kohlenhydratprotonen, in Grau die Bernsteinsäureprotonen und in Gelb die Lysin- und Lipidprotonen.

Anhand der ^1H -NMR-Analytik lässt sich nicht eindeutig sagen, ob ebenfalls Konjugate zweier Oligo(amidoamine) mit einem Fondaparinuxmolekül vorliegen. Da mit einem Überschuss an Fondaparinux gearbeitet wurde, ist der Anteil der Bildung des zweifach substituierten Produkts als gering zu erwarten. Durch die ESI-MS-Analytik kann jedoch ebenfalls das zweifach substituierte Produkt nachgewiesen werden, wobei keine Möglichkeit zu einer quantitativen Aussage besteht (siehe Anhang). Für das zweifach substituierte Produkt ist von einer geringeren Zugänglichkeit in späteren Membranstudien auszugehen. So konnten Blixt *et al.* zeigen, dass zweifach Cholesterolfunktionalisierte Lektinliganden nach dem Einbau in Vesikel zu einer verminderten Anbindung des Lektins im Vergleich zu einfach funktionalisierten Liganden führten. Da von einem Produktgemisch aus einfach und zweifach substituiertem Fondaparinux auszugehen ist und die Qualität der NMR-Analytik durch die amphiphilen Eigenschaften des Produkts vermindert wird, ist eine Umsatzbestimmung deutlich erschwert. Unter Verwendung der Dublettsignale der anomeren Protonen des Fondaparinux im Bereich zwischen 5,8 und 4,6 ppm und der Bernsteinsäureprotonen bei 2,6 ppm lässt sich jedoch ein Umsatz von ca. 76% errechnen, wobei jedoch wie bereits angemerkt auch zwei Oligomermoleküle an einem Fondaparinux angebracht sein können.

Für die Herstellung einer Verbindung mit einem Cholesterol-Membrananker wurde die Umsetzung unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Analytik der Struktur **8-1** jedoch ist weniger aussagekräftig, da die Protonen des Fondaparinux weniger gut aufgelöst sind, was auf einen geringeren Umsatz hindeutet (siehe Anhang). Durch ESI-MS konnte die

Masse des Produkts nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu **7** konnte das zweifach substituierte Fondaparinux nicht gefunden werden. Da die Reaktionsbedingungen weiterhin nicht ideal zu sein schienen, wurde ein weiterer Ansatz durchgeführt, bei dem als Lösungsmittel DMF und DMSO verwendet wurden. Dies erlaubt die Verwendung eines anderen Kupplungsreagenzes, in diesem Fall wurde PyBOP eingesetzt, und der Austausch von DMSO gegen Puffer sollte zudem die Bildung von Vesikeln im Reaktionsmedium minimieren und so die Zugänglichkeit der Oligo(amidoamine) verbessern. Die Löslichkeit des Fondaparinux in DMSO erschien nicht optimal, dennoch zeigt das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des nach Aufreinigung durch Dialyse erhaltenen Produkts **8** eine bessere Auflösung der Signale des Fondaparinux im Vergleich zu **8-1**. Insgesamt blieb die Auflösung der Signale jedoch, auch aufgrund der geringen Ansatzgröße und Ausbeute schlechter als für Verbindung **7**. Wie schon für **7** konnte auch für **8** sowohl die Masse des einfach- als auch die des zweifach-substituierten Fondaparinux detektiert werden. Die erhaltene Probe kann trotz der geringeren Reinheit somit testweise in ebenfalls zur Dekoration von Membranen in späteren Versuchen verwendet werden.

Die in diesem Kapitel bisher vorgestellten Arbeiten zeigen die Bandbreite der getesteten möglichen Synthesestrategien zur Dekoration von Membranen mit Fondaparinux, aber auch, dass die Konjugation des stark geladenen, hydrophilen, sterisch anspruchsvollen Pentasaccharids an amphiphile Moleküle sowie die analytische Charakterisierung der erhaltenen Produkte nicht trivial ist. Als Erstes wurde die Konjugation an Phospholipide in Lösung getestet und nach zwei erfolglosen Versuchen die Funktionalisierung stattdessen auf der Membran vorformulierter Liposomen durchgeführt, wobei die Dekoration erfolgreich war und die verwendete Lipidmischung zur Modifikation von Liposomen genutzt wurde, was die Anbindung von VLPs des Humanen Papillomavirus ermöglichte. Um die Anwendbarkeit für die Studie von Virus-Liposom-Interaktionen zu verbessern, ist eine genauere Definition der zu inkorporierenden Verbindungen von Vorteil. Auch die zusätzliche Funktionalisierung von Ligand-Lipid-Konjugaten beispielsweise durch Farbstoffe ist essenziell. Daher wurde die Festphasensynthese als weiteres synthetisches Werkzeug hinzugezogen. Die Funktionalisierung von Oligo(amidoaminen) mit Fondaparinux auf der Festphase war jedoch nicht erfolgreich, eventuell bedingt durch den großen sterischen Anspruch des Pentasaccharids und die dafür unzureichende Zugänglichkeit der Lysinseitenkette des Oligo(amidoamins). Es konnte stattdessen das Rückgrat in Lösung mit Fondaparinux funktionalisiert werden. So lässt sich das gewünschte Konjugat mit einem Etherlipid-Membrananker erhalten. Da jedoch ein Produktgemisch aus einfach und zweifach substituiertem Fondaparinux sowie dem unfunktionalisierten Oligo(amidoamin) entstanden ist und die Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ -Ergebnisse durch die amphiphilen Eigenschaften des Produkts weiter erschwert wird, ist wie schon beim Produkt des *Grafting-to*-Ansatzes keine exakte Bestimmung des Fondaparinux-Anteils möglich. Die Strukturen können dennoch wie angestrebt in Studien zur Virus-Membran-Interaktion verwendet werden. Insbesondere die vorgestellte modular variierbare Einbringung von Membrananker und Fluoreszenz-Markern zeigt die Vorteile und Möglichkeiten, die die Festphasensynthese beim Design von sGAG-Membrananker-Konjugaten bietet. Diese sollen dementsprechend auch im folgenden Abschnitt ausgenutzt werden.

Synthese sulfatierter Mannose-funktionalisierter Membrananker-tragender Präzisionsglykomakromoleküle

Im nächsten Abschnitt soll die Synthese von vier sulfatierten Mannose-funktionalisierten Membrananker-tragenden Präzisionsglykomakromolekülen geschildert werden. Auch wenn Mannose nicht als Monosaccharid in natürlichen sGAGs vorkommt, haben sich sulfatierte Mannose-Polymere in den Studien von Soria *et al.* als potente Virusinhibitoren erwiesen. Daher sollten auch im Rahmen der hier vorgestellten Studien sulfatierte Mannose-funktionalisierte Oligomere und Polymere zur Dekoration von Membranen und zur Studie von Virus-Membran-Interaktionen genutzt werden. Wie bereits erwähnt wird in dieser Arbeit jedoch lediglich die Synthese der Oligomere im Detail vorgestellt. Für alle vier Strukturen wurde dabei das gleiche Rückgrat mit der Sequenz EDS-[TDS]₅-EDS-Lys(Boc)-EDS aufgebaut.^{338,353} Die Funktionalisierungsschritte des Rückgrats sind für zwei der synthetisierten Strukturen schematisch in Abbildung 33 dargestellt. Die genauen Reaktionsbedingungen sind im Experimententeil geschildert.

Festphasensynthese von Membrananker-tragenden sulfatierten Oligo(amidoaminen)

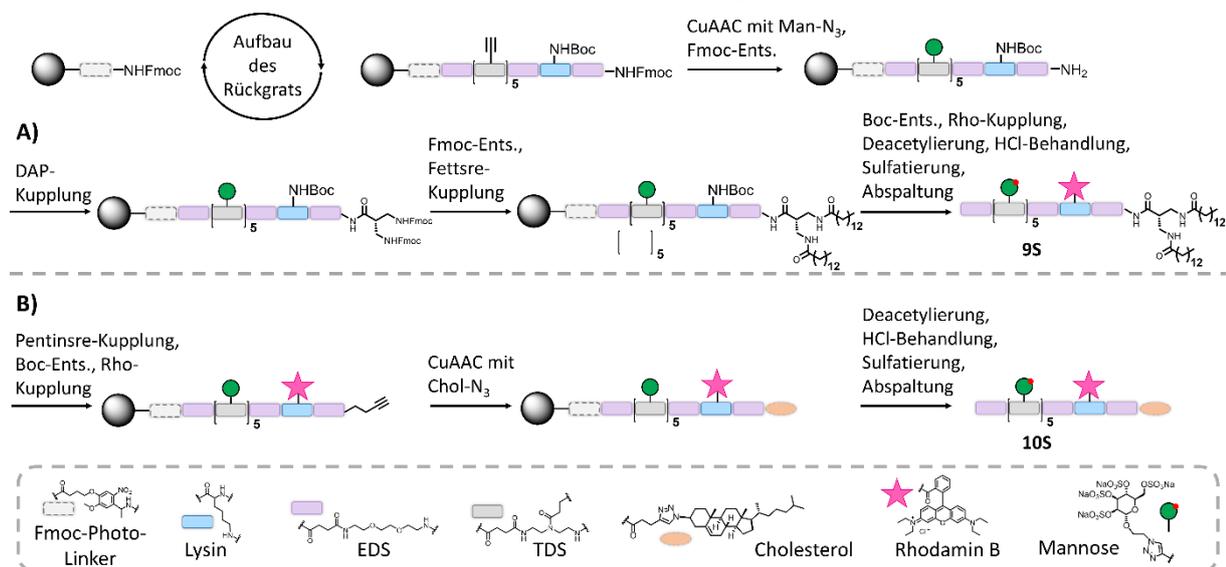


Abbildung 33: Schema der Synthese zweier sulfatierter Mannose-funktionalisierter Membrananker-tragender Präzisionsglykomakromoleküle: A) Sulfatiertes Mannose-funktionalisiertes Oligo(amidoamin) mit einem Membrananker aus N_{α},N_{β} -di-Fmoc-L-2,3-diaminopropionsäure (DAP) und zwei Myristinsäureketten (**9S**); B) Sulfatiertes Mannose-funktionalisiertes Oligo(amidoamin) mit Cholesterin als Membrananker (**10S**).

Zur Synthese aller in diesem Abschnitt vorgestellten Strukturen wurde der Fmoc-Photo-Linker verwendet, um die Sulfatierung auf der Festphase zu ermöglichen. Nach dem Aufbau des Rückgrats wurde dieses durch CuAAC mit Mannose-Azid ((2-Azidoethyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosid) funktionalisiert. Durch anschließende *N*-terminale Entschützung wurde ein freies Amin erhalten. Wie in Abbildung 33A für die Struktur **9S** gezeigt, wurde zur Einbringung eines Lipidmimetikums, bestehend aus polarem Kopf und unpolarem Schwanz, als nächstes die N_{α},N_{β} -di-Fmoc-L-2,3-diaminopropionsäure (DAP) gekuppelt. Nach erneuter Fmoc-Entschützung konnten dann als Alkylketten zwei Myristin-Fettsäureketten durch Kupplung eingeführt werden, sodass ein Lipidmimetikum erhalten wurde, welches zum Einbau

in Membranen genutzt werden kann.³⁵⁴ Diese Methode stellt eine Alternative zur Verwendung des Etherlipids aus dem vorherigen Abschnitt dar und zeigt die Variabilität der Synthesepattform. Durch Variation der Fettsäuren kann zudem einfach die Lipidschwanzlänge eingestellt werden. Die Reaktionsschritte zum Einbau des Membranankers wurden durch Kaiser-Tests überprüft. Anschließend wurde das Lysin Boc-entschützt und das frei gewordene Amin mit der Carboxylgruppe des Rhodamin B umgesetzt. Die Kohlenhydrate wurden unter Zemplén-Bedingungen *O*-deacetyliert, wobei aufgrund der basischen Bedingungen ein Ringschluss des Rhodamins erfolgt.³⁵⁵ Um diesen rückgängig zu machen, wurde das Harz mit Salzsäure behandelt. Anschließend wurde die Sulfatierung der Kohlenhydrat-Einheiten durchgeführt und das Produkt **9S** durch Bestrahlung von der Festphase abgespalten. Für die Synthese der Cholesterol-verankerten Struktur **10S** wurde, wie in Abbildung 33B dargestellt, nach Aufbau des Rückgrats, CuAAC und Fmoc-Entschützung als nächstes Pentinsäure gekuppelt. Anschließend konnte die Lysinseitenkette Boc-entschützt und Rhodamin-funktionalisiert werden. Im nächsten Schritt wurde das Cholesterol-Azid als Membrananker durch CuAAC an das Glykooligo(amidoamin) angebracht. Nach *O*-Deacetylierung und Behandlung mit HCl zur Rhodamin B-Ringöffnung konnte die Verbindung sulfatiert und durch Bestrahlung die Zielstruktur **10S** abgespalten werden. Neben den Verbindungen **9S** und **10S** wurden noch zwei weitere sulfatierte Strukturen hergestellt. Alle sulfatierten Glykooligomere sind in Abbildung 34 gezeigt. Verbindung **11S** wurde als potenzieller Kompetitor für spätere Virusassays in *N*-terminal acetylierter Form hergestellt. Bei **12S** handelt es sich um eine Kontrollstruktur ohne Rhodamin, die ebenfalls in späteren Virusassays genutzt werden kann, um einen Einfluss des Rhodamins auf die Virusinteraktion auszuschließen. Diese wurde durch Acetylierung der Lysinseitenkette erhalten.

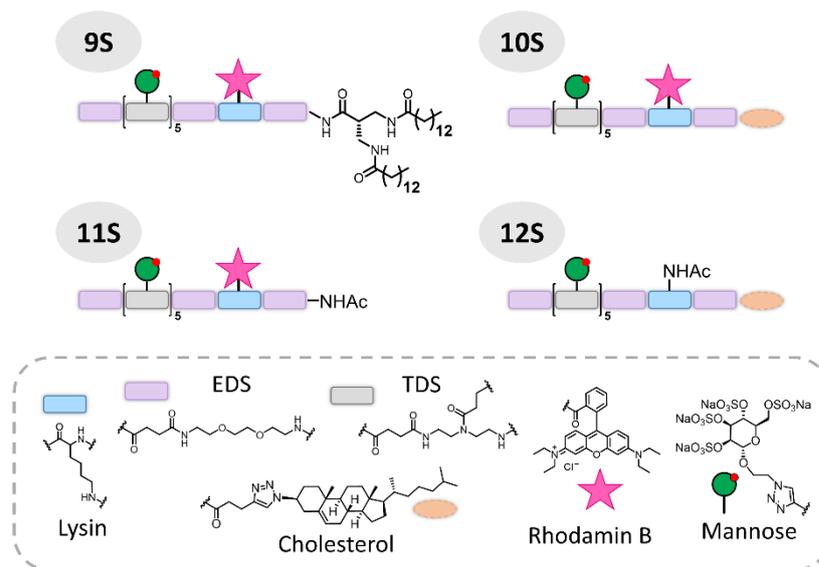


Abbildung 34: Übersicht über die synthetisierten sulfatierten Mannose-funktionalisierten Präzisionsglykomakromoleküle: Verbindung **9S** mit einem Membrananker bestehend aus polarem Kopf und unpolaren Alkylketten, Verbindung **10S** mit Cholesterolmembrananker, Verbindung **11S** ohne Membrananker und Verbindung **12S** ohne Rhodamin-Funktionalisierung.

Die hergestellten Strukturen wurden mittels Zentrifugation in Dialysezentrifugiereinheiten aufgereinigt und durch ¹H-NMR-Analytik, Elementaranalyse und ESI-MS charakterisiert. Die

Ergebnisse und Diskussion

erhaltenen Sulfatierungsgrade und Ausbeuten sind in Tabelle 4 dargestellt. Da das Signal des anomeren Protons der Mannose-Einheiten teilweise mit dem Peak des restlichen unvollständig deuterierten Lösungsmittel, also dem des H₂O, im ¹H-NMR-Spektrum überlappt, kann es nicht wie in Kapitel 3.1 zur Bestimmung des Sulfatierungsgrades genutzt werden. Es wurde hierfür nur die Elementaranalyse verwendet.

Tabelle 4: Sulfatierungsgrade bestimmt über Elementaranalyse und Ausbeuten für die hergestellten sulfatierten Mannoseoligo(amidoamine) **9S** bis **12S**.

Nr.	Sulfatierungsgrad [%]	Ausbeute [%]
9S	99	15
10S	98	12
11S	94	22
12S	94	4

Für die Mannoseoligo(amidoamine) **9S** und **10S** wurden zudem jeweils auch die entsprechenden nicht sulfatierten Kontrollstrukturen durch Bestrahlung eines Anteils des Harzes vor der Sulfatierung erhalten. Die hergestellten Strukturen **9** und **10** wurden ebenfalls durch Zentrifugation in Dialysezentrifugiereinheiten aufgereinigt und mittels ¹H-NMR-Analytik und HR-ESI-MS charakterisiert. Die Ergebnisse sind im Experimentalteil zusammengefasst.

Anhand von Struktur **10S** soll exemplarisch die Charakterisierung, wie sie für die Membrananker-tragenden Strukturen durchgeführt werden kann, diskutiert werden. Die Charakterisierung der Proben wird dadurch erschwert, dass die Verbindungen nach der Einführung des Membranankers nicht mehr mittels RP-HPLC-MS untersucht werden können und die ¹H-NMR-Analytik wie bereits zuvor gezeigt durch die Amphiphilie der erhaltenen Strukturen und deren Fähigkeit zur Assemblierung eingeschränkt wird. Um dennoch die erfolgreiche Synthese nachweisen zu können, wurden nicht nur die finalen Produkte charakterisiert. Es wurden zudem als Zwischenstufen das hergestellte Oligo(amidoamin)-Rückgrat **ZS-Oligomerrückgrat** vor der Funktionalisierung sowie für Struktur **10(S)** das Rhodamin-funktionalisierte Mannoseoligo(amidoamin) mit Pentinsäure als terminalem Baustein vor der CuAAC des Cholesterol-Azids als **ZS-10** durch sogenannte Mikroabspaltungen in kleinen Mengen isoliert und charakterisiert. Durch RP-HPLC-MS konnten die beiden Zwischenstufen mit relativen Reinheiten von 97% bzw. 92% nachgewiesen werden (siehe Anhang). Somit konnte gezeigt werden, dass das vorgestellte Protokoll zur erfolgreichen Herstellung des Rückgrats sowie zu dessen Funktionalisierung mit Rhodamin B und den Mannose-Aziden genutzt werden kann. Die ¹H-NMR-Spektren des **ZS-Oligomerrückgrat**, der unsulfatierten Verbindung **10** und der sulfatierten Verbindung **10S** sind in Abbildung 35 dargestellt.

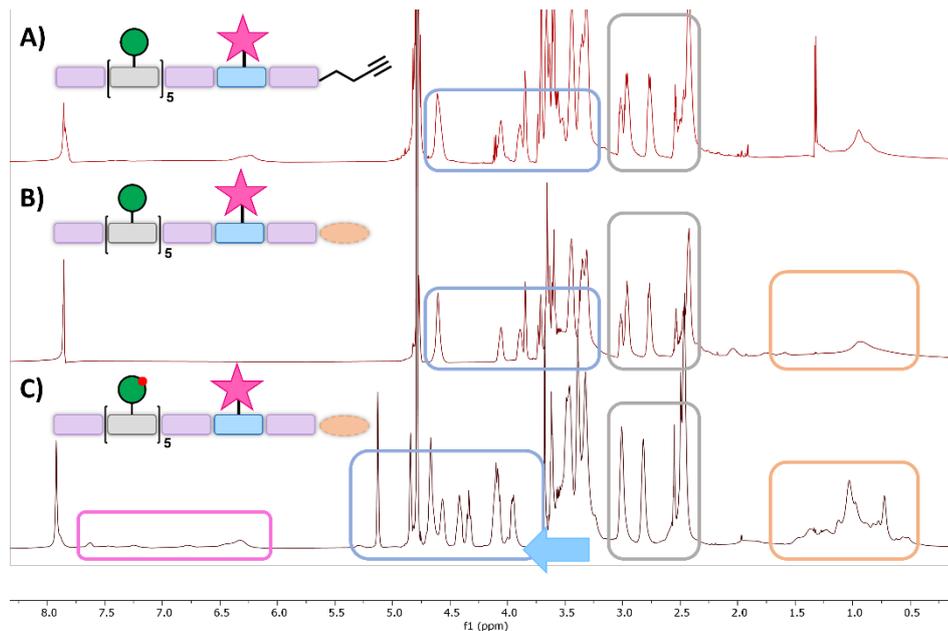


Abbildung 35: Auszüge der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von: A) **ZS-Oligomerrückgrat**; B) **Oligomer 10**; C) **Oligomer 10S**; mit rosa umrandet die aromatischen Rhodaminprotonen, mit blau umrandet die Kohlenhydratprotonen, in Graue die Bernsteinsäure- und Pentinsäureprotonen und in Gelb die Lysin- und Cholesterolprotonen.

Es ist klar zu erkennen, dass sich im Spektrum des finalen Produkts sowohl die Signale der Protonen des Rückgrats (grau), des Cholesterols (orange) als auch der Kohlenhydrate (blau) wiederfinden. Ebenfalls zu Teilen sichtbar sind die aromatischen Protonen des Rhoadmins (rosa). Eine vollständige Zuordnung der Protonen findet sich im Experimentalteil. Es kann jedoch wie bereits im vorherigen Abschnitt auch hier eine Verbreiterung bzw. Unterdrückung der Signale der Cholesterol- und Rhodamin-Protonen insbesondere für die Verbindung **10** beobachtet werden. Allein anhand der $^1\text{H-NMR}$ -Analytik kann also die erfolgreiche Funktionalisierung mit Rhodamin B bzw. Cholesterol für **10** nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es kann dennoch für die erhaltenen Strukturen von einer erfolgreichen und vollständigen Funktionalisierung mit Cholesterol ausgegangen werden. Zum einen sind die entsprechenden Protonen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **10S** besser aufgelöst. Zum anderen wird während der Festphasensynthese unumgesetzter Membrananker durch Waschen entfernt und nicht mit dem Membrananker funktionalisierte Glykooligo(amidoamine) während der abschließenden Aufreinigung abgetrennt, da diese nicht in der Dialysekammer verbleiben. Wie bereits erwähnt, zeigen die Daten der RP-HPLC-MS außerdem die erfolgreiche Einführung des Rhodamin B und das erhaltene Produkt hat eine pinke Farbe, weshalb auch hier trotz der uneindeutigen $^1\text{H-NMR}$ -Analytik von einer erfolgreichen Funktionalisierung ausgegangen werden kann. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **10S** ist zudem die Tieffeldverschiebung der Signale der Kohlenhydratprotonen durch die Sulfatierung deutlich zu sehen. Zusammen zeigen die präsentierten analytischen Daten somit die erfolgreiche Synthese der Zielstrukturen **10** und **10S**. Da für alle Strukturen, dasselbe Rückgrat aus dem gleichen Ansatz genutzt wurde und auch die restlichen Reaktionsbedingungen beispielsweise der Rhodamin-Kupplung gleichblieben, lässt sich anhand dieser Ergebnisse und der für die finalen Produkte erhaltenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (siehe Experimentalteil und Anhang) auch die erfolgreiche Synthese der anderen Strukturen untermauern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass insbesondere der Einsatz des Festphasensyntheseprotokolls aus Kapitel 3.1 zur Synthese sulfatierter Strukturen und dessen Weiterentwicklung die Entwicklung einer Synthesepattform ermöglicht hat, durch die Membrananker-tragende sGAG-mimetische Strukturen erhalten werden konnten. So konnten die Membrananker variiert werden und es wurde Cholesterol sowie zwei verschiedene Lipide bestehend aus polarem Kopf und unpolaren Alkylketten eingesetzt. Sowohl durch die Funktionalisierung mit Fondaparinux in Lösung als auch mit sulfatierter Mannose auf der Festphase konnten Kohlenhydratmotive in die Strukturen eingebracht werden, wobei die Einbringung des Fondaparinux erneut anspruchsvoll und letztendlich unvollständig war. Die Anbringung verschiedener Kohlenhydratazide, potenziell auch zur Synthese segmentweise sulfatierter Strukturen, ist jedoch mit der vorgestellten Route auch in zukünftigen Arbeiten einfach umsetzbar. Darüber hinaus wurde die Einführung von Rhodamin als Fluoreszenzmarker ermöglicht. Abseits der Festphasensynthese konnte ein *Grafting-to*-Ansatz zur Herstellung einer Lipidmischung genutzt werden, die Fondaparinux-funktionalisierte Glykolipide enthielt. Zusammenfassend ist in Abbildung 36 schematisch die Präsentation eines natürlichen HSPGs im Vergleich zu den hergestellten synthetischen Strukturen dargestellt, die für Studien zu Virus-Membran-Interaktionen genutzt werden können.

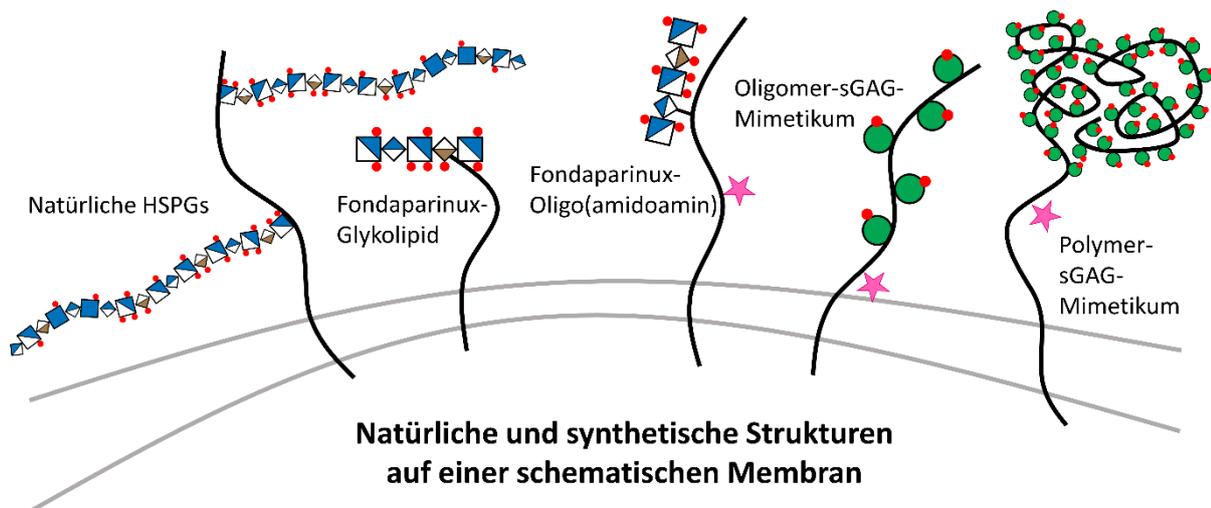


Abbildung 36: Schematische Darstellung der erhaltenen membranverankerten sGAG-Mimetika und eines natürlichen HSPGs auf einer exemplarischen Membran.

3.2.3 Erste Studien zur Interaktion von Virus-ähnlichen Partikeln mit membranverankerten sGAG-Mimetika

Um das Potenzial der im vorherigen Abschnitt (siehe Abbildung 36) hergestellten Strukturen aufzuzeigen, wurden zunächst die Lipidmischung mit dem Fondaparinux-Lipid und ein hergestelltes sGAG-mimetisches Polymer mit Cholesterol als Membrananker und einem Polymerisationsgrad von 76 zur Funktionalisierung von Liposommembranen genutzt, wobei die Synthese des Polymers nicht Teil dieser Arbeit war, sondern, wie bereits erwähnt, im Rahmen der Doktorarbeit von Lorand Bonda durchgeführt wurde. Es wurden Liposomen, die als *giant unilamellar vesicles* (GUVs) kategorisiert werden können, für diese Experimente

verwendet. Solche GUVs besitzen Größen oberhalb von 1 μm und eignen sich daher besonders gut als Zellmimetika, da ihre Membrankrümmung der von Zellen ähnelt.^{209,356} Zur Studie der erhaltenen Systeme in der Interaktion mit Viren wurden VLPs drei verschiedener Virusarten verwendet. Zum einen wurden VLPs des Humanen Papillomavirus 16 (HPV16) benutzt. HPV16 ist ein kleines, nicht-umhülltes DNA-Virus, das Haut und Schleimhäute infiziert, wobei HPV16 zu den Hochrisikotypen gehört, die für die Entstehung verschiedener Krebserkrankungen wie dem Gebärmutterhalskrebs, verantwortlich sind. HPV16 bindet über HSPGs an die Membran von Zellen, was zu einer konformativen Änderung des Hauptcapsidproteins führt, die wiederum den Transfer zu einem sekundären Membranrezeptor und schließlich die Internalisierung des Virus in die Zelle ermöglicht. Neben HPV16-VLPs wurden VLPs zwei verschiedener Polyomaviren verwendet, die beide wie HPV16 zu den Onkoviren gehören und zu den kleinen nicht-umhüllten Viren zählen. Zum einen wurden VLPs des Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) eingesetzt, welches in Verbindung mit der Entstehung des gleichnamigen höchst aggressiven Merkelzellkarzinoms steht, und zum anderen VLPs des Simian-Virus 40 (SV40). Das MCPyV bildet eine Ausnahme in der Familie der Polyomaviren, da es neben der Anbindung an Sialinsäure-tragende Ganglioside auch auf die Interaktionen mit sGAGs zur Infektion von Zellen angewiesen ist.³⁵⁷⁻³⁵⁸ Die Infektion von Zellen mit SV40 hingegen ist unabhängig von der Anwesenheit von sGAG-Proteoglykanen.³⁵⁸ In den durchgeführten Experimenten können die HPV16-VLPs somit als Positiv- und die SV40-VLPs als Negativkontrolle verwendet werden. Das Anbindungsverhalten der MCPyV-VLPs ist bisher weniger erforscht und sollte hier weiter untersucht werden.

Zunächst wurden mit Hilfe der Lipidmischung **6** zusammen mit einem Fluoreszenz-markierten Lipid Liposomen hergestellt. Die Verwendung des Membranfarbstoffs dient zur Lokalisierung der Liposomen während der Mikroskopie. Ein Nachweis der Dekoration der Membran mit Fondaparinux kann hierüber noch nicht erfolgen. Dieser konnte aber indirekt erbracht werden, wofür die Liposomen mit fluoreszenz-markierten VLPs des HPV16 inkubiert wurden. Die entsprechenden Aufnahmen sind in Abbildung 37 gezeigt.

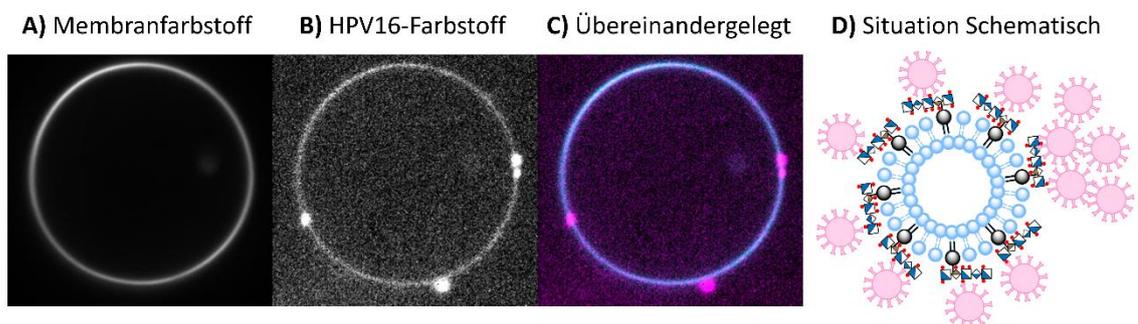


Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopiebilder für Fondaparinux-dekorierte Liposomen (**6**) inkubiert mit HPV16-VLPs: A) Aufgenommen im Kanal des Membranfarbstoffs; B) Aufgenommen im Kanal des zur VLP-Markierung verwendeten Farbstoffs und C) Bilder aus A und B übereinandergelegt; D) Schematische Darstellung der Interaktion der VLPs mit der Liposommembran.

Wie zu sehen ist, kann das untersuchte Vesikel in beiden Fluoreszenzkanälen beobachtet werden. In A) wird mit der Absorptionswellenlänge des Membranfarbstoffs angeregt und die Vesikelmembran ist sichtbar. In B) hingegen wird der Kanal des zur Markierung der HPV16-

Ergebnisse und Diskussion

VLPs verwendeten Farbstoffs angewählt. Die beobachtete Fluoreszenz entlang der Vesikelmembran entsteht somit ausschließlich durch die Kolo­kalisierung der HPV16-VLPs mit der Membran, die dadurch hervorgerufen wird, dass die VLPs an das präsen­tierte Fondaparinux binden. Die heller erscheinenden Punkte werden durch Cluster von VLPs hervorgerufen. In Abbildung 37C sind die beiden einzelnen Aufnahmen übereinandergelegt worden, um die Kolo­kalisierung zu verdeutlichen. Das Experiment zeigt also zum einen die erfolgreiche Präsentation der Fondaparinux-Einheiten auf der Liposommembran und zum anderen, dass die HPV16-VLPs die präsen­tierten Bindungsmotive zur Lokalisierung auf der Zellmembran nutzen können. Das gleiche Experiment wurde auch unter Verwendung der MCPyV-VLPs durchgeführt. Abbildung 38 zeigt Mikroskopieaufnahmen der hergestellten Liposomen nach der Inkubation mit den VLPs. Wird das Vesikel im Kanal des zur Markierung der VLPs genutzten Farbstoffs untersucht, so kann keine Fluoreszenz beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass das Virus nicht an das membranverankerte Fondaparinux anbindet.

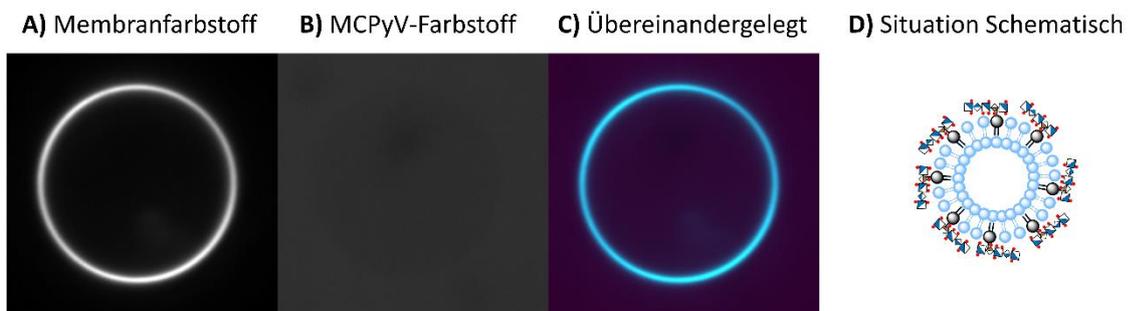


Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopiebilder für Fondaparinux-dekorierte Liposomen (6) inkubiert mit MCPyV-VLPs: A) Aufgenommen im Kanal des Membranfarbstoffs; B) Aufgenommen im Kanal des zur VLP-Markierung verwendeten Farbstoffs und C) Bilder aus A und B übereinandergelegt; D) Schematische Darstellung der funktionalisierten Liposomen ohne Interaktion der VLPs.

Ebenso wie für die Fondaparinux-funktionalisierten Vesikel sollte jetzt auch das Bindungsverhalten der VLPs gegenüber Liposomen, die mit sGAG-mimetischen Polymeren funktionalisiert wurden, untersucht werden. Nach der Inkubation mit HPV16-VLPs wurden die in Abbildung 39 dargestellten Bilder erhalten. Hier kann wie zuvor eine Kolo­kalisierung der VLPs mit der Vesikelmembran beobachtet werden (B+C), die VLPs binden somit an die präsen­tierten Polymere.

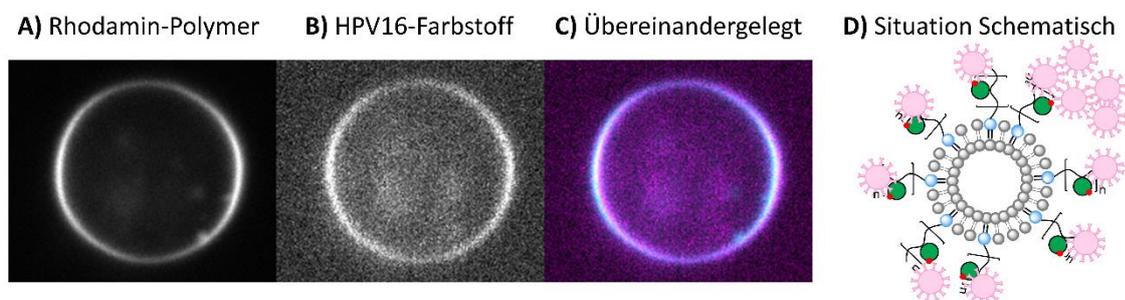


Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopiebilder für Polymer-dekorierte Liposomen inkubiert mit HPV16-VLPs: A) Aufgenommen im Kanal des zur Markierung des Polymers verwendeten Rhodamin B; B) Aufgenommen im Kanal des zur VLP-Markierung verwendeten Farbstoffs und C) Bilder aus A und B übereinandergelegt; D) Schematische Darstellung der Interaktion der VLPs mit der Liposommembran.

Anders als für die Fondaparinux-funktionalisierten Vesikel, kann für die Polymer-dekorierten GUVs jetzt auch eine Anbindung der MCPyV-VLPs beobachtet werden (siehe Abbildung 40B+C). Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten kann in der hohen Dichte und Zahl der Ladungen entlang der Polymerkette im Vergleich zum kurzkettigen Pentasaccharid liegen. Um dies weiter zu untermauern, müssten allerdings zusätzliche Experimente durchgeführt werden.

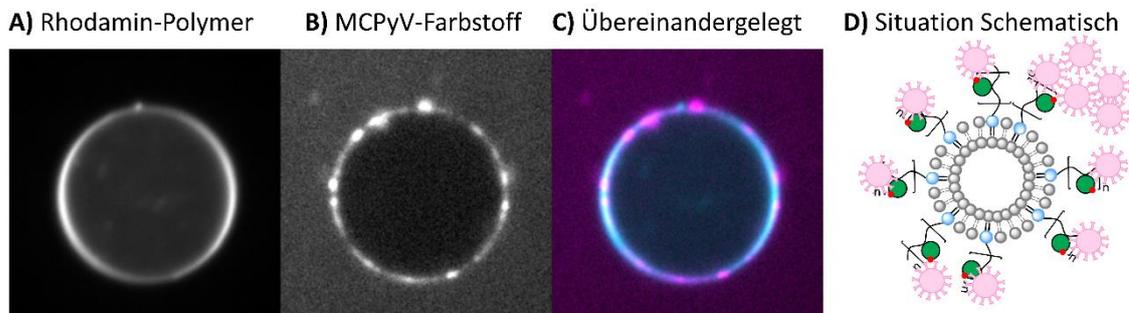


Abbildung 40: Fluoreszenzmikroskopiebilder für sGAG-Polymer-dekorierte Liposomen inkubiert mit MCPyV-VLPs: A) Aufgenommen im Kanal des zur Markierung des Polymers verwendeten Rhodamin B; B) Aufgenommen im Kanal des zur VLP-Markierung verwendeten Farbstoffs und C) Bilder aus A und B übereinandergelegt; D) Schematische Darstellung der Interaktion der VLPs mit der Liposommembran.

Beispielsweise die Verwendung der sGAG-mimetischen Oligomere aus dem vorherigen Abschnitt könnte hierbei einen Beitrag leisten. Auch wenn bisher keine Studien zur Virusinteraktion für diese Strukturen durchgeführt wurden, konnte in ersten Experimenten der erfolgreiche Einbau der Struktur **9S**, also des mit einem polaren Kopf und zwei unpolaren Fettsäureketten funktionalisierten sulfatierten Mannoseoligo(amidoamins) gezeigt werden (siehe Anhang). Auch diese Strukturen können also zukünftig zur Studie von Membran-Virus-Interaktionen verwendet werden.

Da ein Ziel der Arbeiten in diesem Kapitel auch die Anwendung der synthetisierten Strukturen im Rahmen des *de novo Glycocalyx Engineering* war, wurden als nächstes statt GUVs GM-95 Zellen verwendet und diese mit den Membrananker-tragenden sGAG-mimetischen Polymeren funktionalisiert. Die Zellen wurden verwendet, da sie kein Gangliosid GT1b aufweisen, welches als Anbindungspunkt für SV40 und McPyV-VLPs dienen würde. Zur Dekoration wurden die Zellen mit den Polymerstrukturen inkubiert, gewaschen und im nächsten Schritt auf Eis gekühlt, um die Endozytose zu unterbinden, um dann mit den MCPyV-VLPs inkubiert zu werden. Das Bild A) in Abbildung 41 deutet auf einen erfolgreichen Einbau der Polymere durch die durchgeführte Inkubation der Zellen hin. Außerdem kann wie schon für die GUVs eine Anbindung der MCPyV-VLPs (B) an die Zellen beobachtet werden. Im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Polymer inkubiert wurden, ist die Anbindung verstärkt, wie durch Messung der mittleren Fluoreszenz quantifiziert werden konnte (siehe Anhang). Dieses Experiment zeigt zunächst die Möglichkeit des Einbaus Membrananker-tragender sGAG-Mimetika in Zellmembranen und somit das Potenzial zur Nutzung der vorgestellten Strukturen in zukünftigen Studien zur Virusanbindung an Zellen.

Ergebnisse und Diskussion

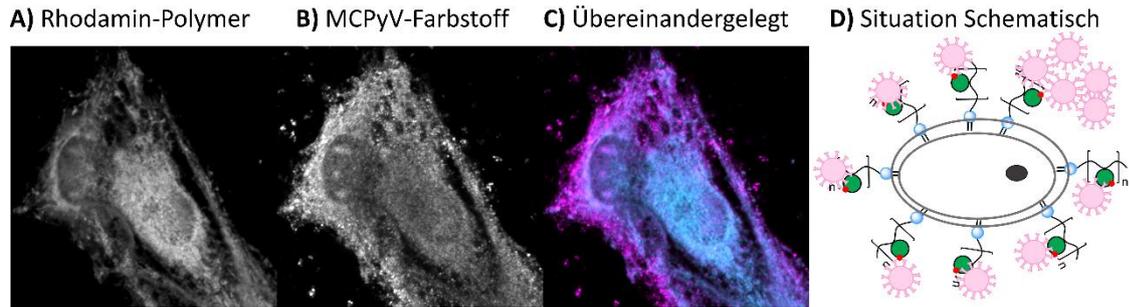


Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopiebilder für zuvor mit sGAG-Polymeren behandelte GM-95 Zellen inkubiert mit MCPyV-VLPs: A) Aufgenommen im Kanal des zur Markierung des Polymers verwendeten Rhodamin B; B) Aufgenommen im Kanal des zur VLP-Markierung verwendeten Farbstoffs und C) Bilder aus A und B übereinandergelegt; D) Schematische Darstellung der Interaktion der VLPs mit der Zellmembran.

Im Vergleich zur Inkubation der Zellen mit MCPyV-VLPs fand nach der Behandlung mit SV40-VLPs als Kontrollexperiment keine Bindung der VLPs an die Zelle statt, wie in Abbildung 42B zu sehen ist.

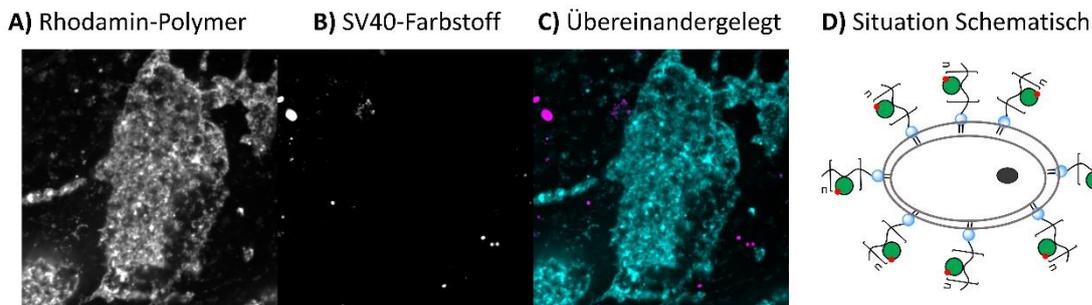


Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskopiebilder für zuvor mit sGAG-Polymeren behandelte GM-95 Zellen inkubiert mit SV40-VLPs: A) Aufgenommen im Kanal des zur Markierung des Polymers verwendeten Rhodamin B; B) Aufgenommen im Kanal des zur VLP-Markierung verwendeten Farbstoffs und C) Bilder aus A und B übereinandergelegt; D) Schematische Darstellung der dekorierten Zellmembran ohne Interaktion der VLPs.

Becker *et al.* konnten zeigen, dass die Infektion von Zellen mit dem MCPyV abhängig von der Interaktion mit sulfatierten Proteoglykanen ist, wohingegen die Infektion der Zellen mit dem SV40 weder durch Heparin inhibiert werden konnte noch durch die Desulfatierung der auf den Zellen vorhandenen Glykane vermindert wurde. Dies ist in Übereinstimmung damit, dass auch in den durchgeführten Zellversuchen nur für die MCPyV- nicht aber für die SV40-VLPs eine Anbindung an die Zelle beobachtet werden kann. In den Studien von Soria *et al.* wurde überraschenderweise nicht nur für HPV16 und im verminderten Maße für MCPyV, sondern auch für SV40 eine Inhibition der Virusinfektion durch das eingesetzte Heparin sowie durch die verwendeten sulfatierten Mannosepolymere beobachtet. Über die zugrundeliegende Wirkungsweise konnte jedoch keine genaue Aussage getroffen werden. Die hier vorgestellten Strukturen und Untersuchungsmethoden bieten das Potenzial zu einer Aufklärung beizutragen.

Um die Aussagekraft der durchgeführten Experimente zu erhöhen, sind weitere Untersuchungen nötig. Ein wichtiger Schritt dabei ist die Desulfatierung der Zellen vor der Einbringung der sGAG-Mimetika, da dann die Anbindung der VLPs noch eindeutiger auf die Einbringung der sGAG-Mimetika zurückgeführt werden kann. Zudem wäre es interessant die Experimente auch unter kompetitiven Bedingungen, bei denen sGAG-Mimetika ohne

Membrananker eingesetzt werden könnten, durchzuführen. Experimente mit den Oligomeren sGAG-Mimetika könnten zudem Rückschlüsse auf die Kettenlänge, die zur Anbindung der VLPs nötig ist, ermöglichen.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die ersten hier präsentierten Studien das Potenzial der synthetisierten Strukturen zur Dekoration von GUVs und Zellen aufzeigen. Auch konnte beobachtet werden, dass Viren an die so modifizierten Membranen anbinden können. Es konnte also eine synthetische Plattform entwickelt werden, die die Herstellung spezifisch funktionalisierter und Membrananker-tragender sGAG-Mimetika erlaubt. Außerdem konnten die Strukturen erfolgreich in ersten Testversuchen in Membranen eingebaut werden und erlaubten dort die Anbindung von VLPs. Solche Systeme können also erstmalig die Untersuchung von Virus-Membran-Interaktionen mittels sGAG-Mimetika ermöglichen. Perspektivisch ist auch die Kombination mehrerer künstlicher sowie natürlicher Membrananker umsetzbar. So könnten z.B. Ganglioside und synthetische sGAG-Mimetika auf Membranen präsentiert werden, was insbesondere für das MCPyV potenziell eine detaillierte Studie der Interaktionen mit den einzelnen Membranrezeptoren erlauben würde.

3.3 Synthese und Liposom-Inkorporation von heteromultivalenten Glykomakromolekül-Lipid-Konjugaten zur Ansteuerung von Interaktionen mit Gal-1 und Gal-3 und deren Studie mittels NMR

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erläutert, ist ein wichtiger Schauplatz multivalenter Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen die Glykokalyx. Da der Großteil der dort präsentierten Protein- oder Lipid-konjugierten Kohlenhydratliganden in der Membran verankert ist, ist ihre Wechselwirkung und ihr Bindungsverhalten stark auch von der umgebenden Membran und ihren Eigenschaften, etwa der Dynamik oder Phasenseparation, beeinflusst.^{42,209-210} Wie bereits in Kapitel 3.2 ausdrücklich aufgezeigt, können unter anderem Liposomen als Zellmimetika genutzt werden, um diese Parameter besser untersuchen und ihren Effekt auf das Bindungsverhalten verstehen zu können.^{209,212-213} Neben den sGAG-bindenden Virusproteinen gibt es viele weitere Proteine, deren Studie mit Hilfe von Liposomen als Glykokalyx-Mimetika großes Potenzial aufweist. Daher wurden nun die Prinzipien der vorherigen Abschnitte auf eine weitere Klasse von Proteinen, den β -Galaktosid-bindenden Galektinen übertragen. Deren Untersuchung mit solchen Systemen ist besonders interessant, da sie ihre biologische Funktion insbesondere darüber ausüben, dass sie die Fähigkeit besitzen zu oligomerisieren und nach Anbindung an mehrere Glykane der Glykokalyx so zur Bildung von Clustern und Verbänden führen können.^{43,47,50,53,359} Als neues Instrument zur Untersuchung der ablaufenden Prozesse wurden zudem insbesondere NMR-Experimente gewählt, da diese es erlauben die Situation im dynamischen Zustand zu untersuchen.

Durch Festphasensynthese erhaltene Glykooligo(amidoamine) wurden in Arbeiten von Freichel *et al.* (siehe auch 1.1.1) bereits als vielversprechende Galektinliganden vorgestellt, wobei zwei Strategien angewendet wurden, um Liganden mit hohen Aviditäten zu erhalten. Wie bereits in Abschnitt 1.1.1 dargestellt bietet die multivalente Präsentation von Liganden auf biologisch kompatiblen Gerüsten eine Möglichkeit zur Aviditätssteigerung. Zudem ist die Kombination von Kohlenhydratmotiven und sekundären Bindungsmotiven, wie beispielsweise Aromaten, eine wichtige Methode beim Design von potenten Galektinliganden, da über die sekundären Funktionalitäten zusätzliche Bereiche der Galektinbindungstasche adressiert werden können (siehe Abbildung 43).^{43,90,135,360} Entsprechend konnte für homomultivalente Laktose-funktionalisierte Oligo(amidoamine), die auf Liposomen multivalent präsentiert wurden, eine Steigerung der Avidität gegenüber Gal-3 im Vergleich zu den Liganden in Lösung gezeigt werden.⁹⁰ Zum anderen wurde ein positiver Einfluss von unterschiedlich substituierten Aromaten bei der Funktionalisierung von heteromultivalenten Laktose-tragenden Oligo(amidoaminen) festgestellt.⁹² Die Kombination von Heteromultivalenz und liposomaler Präsentation hingegen wurde noch nicht realisiert. Außerdem wurden die Ligand-Galektin-Interaktionen ausführlich quantitativ ausgewertet, die zugrundeliegenden Mechanismen, strukturellen Parameter der Wechselwirkungen und die Interaktion im dynamischen Zustand hingegen wurden bisher nicht genauer untersucht. Wie in Abschnitt 1.1.1 bereits erwähnt, kommt der Kombination von NMR-Spektroskopie und Molekulardynamik-Simulationen (MD)

bei der Studie von Galektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen eine besondere Rolle zu.^{42,99} Diese sollte somit nun zur Untersuchung von homo- und heteromultivalenten Liganden sowohl in Lösung als auch auf der Oberfläche von Liposomen genutzt werden wie dies schematisch für Gal-3 in Abbildung 43 dargestellt ist. Insbesondere für die Interaktion von Proteinen mit liposomalen Systemen ergeben sich im Vergleich zum freien Liganden neue Faktoren, die die Bindung beeinflussen können. So können große Liposom-Protein-Aggregate entstehen und die Beweglichkeit der Liganden auf den Membranen kann die Bildung von Ligand-Protein-Verbänden begünstigen. Um diese Prozesse untersuchen zu können sind NMR-Studien von großer Bedeutung.

NMR-Studien zu Galektin-Ligand-Interaktionen:

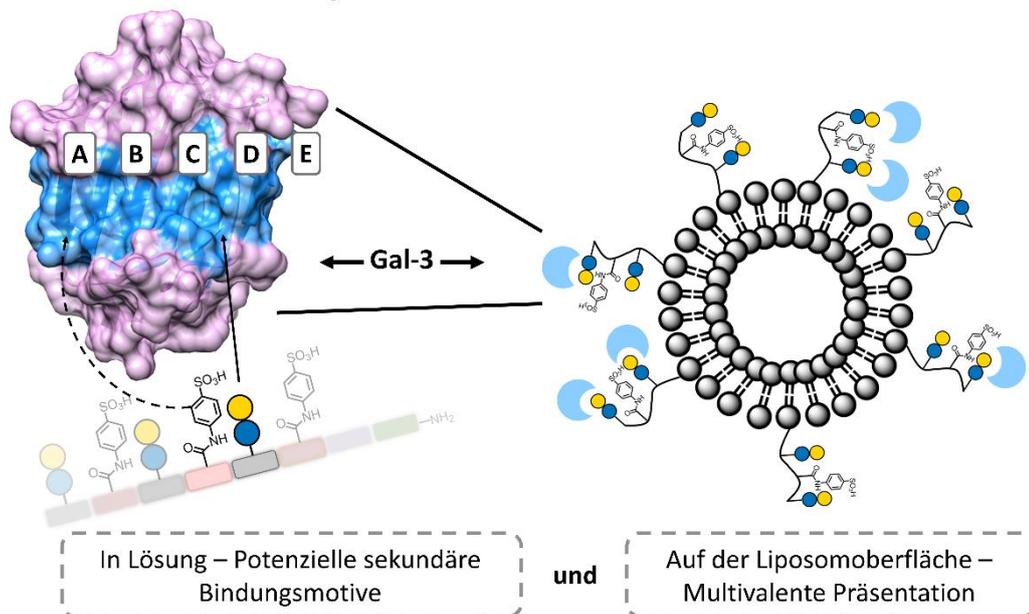


Abbildung 43: Designprinzip von Galektinliganden zur Studie von Interaktionen mittels ^1H -NMR-Analytik, beispielhaft gezeigt für die Interaktion mit Gal-3.

Dennoch ist die Anwendung von liposomalen Systemen für NMR-Studien zu Galektin-Ligand-Interaktionen bisher nur wenig erforscht und sollte hier nun systematisch untersucht werden. Zunächst wurden dafür homo- und heteromultivalente Liganden mittels Festphasensynthese hergestellt. Die Konjugation an Lipid-Membrananker ermöglichte zudem deren Einbringung in Liposomen. Anschließend konnten die Liganden selbst sowie Ligand-funktionalisierte Liposomen in Kooperation mit Partner*innen des CICbioGUNE in Derio (Spanien) unter der Leitung von Prof. Dr. Jesús Jiménez-Barbero mittels NMR-Spektroskopie, Cryo-Elektronenmikroskopie (EM) und MD untersucht werden. Die im Folgenden dargestellten Studien zeigen das Potenzial für synergistische Effekte durch die Kombination von liposomalen Liganden als Zellmimetika mit Methoden zur Strukturaufklärung dynamischer und statischer Prozesse.

3.3.1 Festphasensynthese von homo- und heteromultivalenten Oligo(amidoaminen) zur Adressierung von Galektinen

Zur Synthese homo- und heteromultivalenter Galektinliganden wurde die Festphasensynthese sequenz-definierter, monodisperser Kohlenhydrat-funktionalisierter Oligo(amidoamine) nach Hartmann *et al.* verwendet.^{92,241,250,309} Hierbei werden allgemein synthetische Bausteine, die eine freie Carboxylgruppe und ein Fmoc-geschütztes Amin tragen, über die Carboxylgruppe an die Festphase gekuppelt und anschließend *N*-terminal entschützt. Diese beiden Arbeitsschritte werden wiederholt, bis die gewünschte Sequenz erhalten wird, um im nächsten Schritt die Seitenkettenfunktionalitäten der Bausteine zur Funktionalisierung des aufgebauten Rückgrats zu nutzen (siehe Abbildung 44). Hierzu wurde im Rahmen dieses Projekts das TentaGel®-S-RAM-Harz als Festphase und die folgenden Bausteine ausgewählt: TDS, als Alkin-funktionalisierter Baustein, MDS, als Baustein mit einer Methyl-geschützten Bernsteinsäure-Seitenkette, EDS als *spacer* Baustein ohne Seitenkettenfunktionalität und die Boc-geschützte Aminosäure Alanin.⁹² Der Ablauf der Festphasensynthese ist in Abbildung 44 dargestellt. Die Kombination von Alkin und Carboxylgruppe der eingeführten Bausteinseitenketten ermöglichte eine orthogonale Konjugation verschiedener funktioneller Motive.

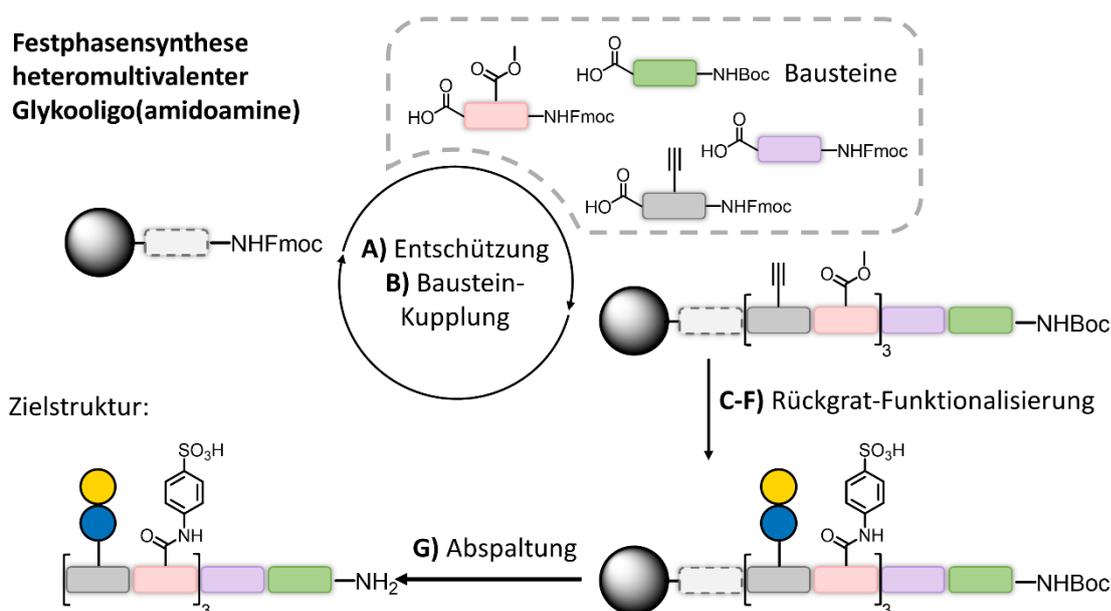


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Festphasensynthese homo- und heteromultivalenter Oligo(amidoamine): A) Fmoc-Entschützung; B) Bausteinakupplung; C) Entschützung der MDS-Seitenkette; D) Kupplung der *p*-Aminobenzolsulfonsäure; E) CuAAC mit dem Laktose-Azid; F) *O*-Deacetylierung der Kohlenhydrate; G) Abspaltung von der Festphase unter sauren Bedingungen.

Laktose-Azide wurden als primäre Bindungsmotive via CuAAC (englisch: *copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*) an TDS und *p*-Aminobenzolsulfonsäure als zusätzliche Funktionalisierung des Rückgrats über Bildung einer Amidbindung an MDS angebracht. Nach der Funktionalisierung wurden die eingeführten geschützten Laktose-Einheiten unter Zemplén Bedingungen *O*-deacetyliert.³¹⁹ Nach der Abspaltung der Oligo(amidoamine) von der Festphase unter sauren Bedingungen, wurden diese mit einem Anionenaustauscherharz und mittels präparativer RP-HPLC (englisch: *reverse phase high-performance liquid*

chromatography-mass spectrometry) aufgereinigt und nach Gefriertrocknung als weiße Feststoffe erhalten. Wichtig bei der Synthese der Liganden war es, ein freies terminales Amin zu erhalten. Dafür wurden zwei verschiedene Vorgehensweisen gewählt. Zum einen wurde EDS als letzter Baustein eingeführt und für die anschließende CuAAC in Fmoc-geschützter Form belassen, um erst anschließend entschützt zu werden. Alternativ wurde Boc-geschütztes Alanin als letzter Baustein verwendet, welches erst bei der sauren Abspaltung von der Festphase entschützt wurde. Dies war insbesondere für Strukturen nötig, bei denen der MDS-Baustein funktionalisiert wurde. Bei der Entschützung der MDS-Seitenkette würde eine terminale Fmoc-Schutzgruppe entfernt werden und es würden Nebenreaktionen des freiwerdenden terminalen Amins u.a. mit den Carboxylgruppen der MDS-Seitenketten auftreten.

Durch die Kombination der gewählten Bausteine konnte ein Satz verschieden dekorierte Strukturen erhalten werden (siehe Abbildung 45). Es wurden drei trivalente Laktose-Oligo(amidoamine) hergestellt (siehe Abbildung 45A), wobei durch Ersatz von EDS in Verbindung **13** (im Folgenden: 3-Lac) durch MDS eine heteromultivalente Struktur (**14**, im Folgenden: 3-Lac-3-SO₃H) erhalten wurde, die Laktose und *p*-Aminobenzolsulfonsäure-Funktionalitäten trägt. Als entsprechende Kontrollstruktur wurde Verbindung **15** (im Folgenden: 3-Lac-3-COOMe) mit noch geschützten MDS-Seitenketten synthetisiert. Zusätzlich wurden eine monovalente Struktur (**16**, im Folgenden: 1-Lac, siehe Abbildung 45B) sowie zwei Negativkontrollen synthetisiert **17** und **18**, im Folgenden 1-*p*SO₃HPh und 3-Glc, siehe Abbildung 45C). Verbindung 1-*p*SO₃HPh (**17**) ist lediglich mit einer *p*-Aminobenzolsulfonsäure-Einheit funktionalisiert, während die trivalente Struktur 3-Glc (**18**) mit Glukose funktionalisiert ist, welche von Galektinen nicht gebunden wird.¹

¹ Strukturen **13**, **16** und **18** wurden von Miriam Hoffmann im Rahmen dieser Doktorarbeit synthetisiert, Strukturen **14**, **15** und **17** wurden von Nils Schomann im Rahmen seiner Masterarbeit synthetisiert.

Ergebnisse und Diskussion

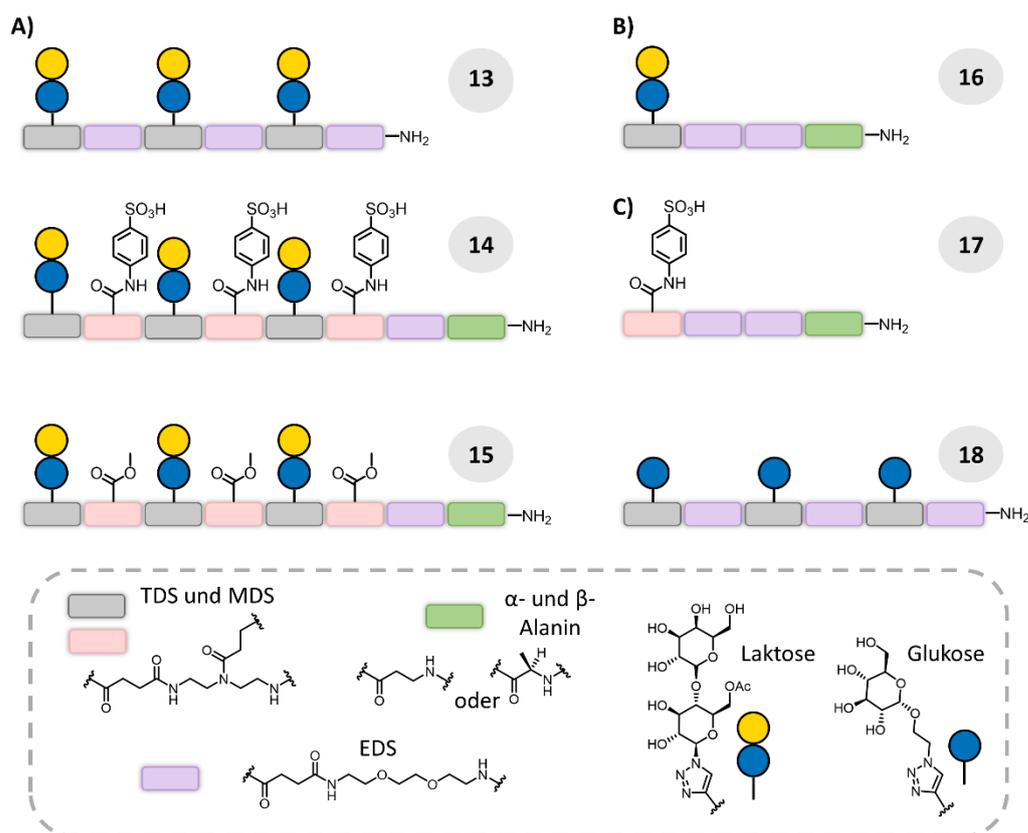


Abbildung 45: Schematische Darstellungen der synthetisierten homo- und heteromultivalenten Oligomere: A) trivalente homo- und heterofunktionalisierte Oligomere **13** (3-Lac), **14** (3-Lac-3-SO₃H), **15** (3-Lac-3-COOMe); B) monovalentes Oligomer **16** (1-Lac); C) Negativkontrollen: **17** (1-SO₃H) und trivalentes Glukose-funktionalisiertes Oligomer **18** (3-Glc).

Die Produkte wurden mittels analytischer RP-HPLC-Massenspektrometrie (MS), ¹H-NMR-Spektroskopie und HR-ESI (englisch: *high resolution electron spray ionization mass spectrometry*) charakterisiert (siehe Anhang). Tabelle 5 zeigt die Ausbeuten, relativen Reinheiten (bestimmt über Integration des UV-Signals bei λ = 214 nm) und HR-ESI-MS Ergebnisse der hergestellten unterschiedlich funktionalisierten Oligo(amidoamine) **13** bis **18**.

Tabelle 5: Relative Reinheiten (bestimmt über Integration des UV-Signals bei λ = 214 nm), Ausbeuten und HR-ESI-MS-Ergebnisse der synthetisierten Oligo(amidoamine) **13** bis **18** zur Studie von Galectin-Ligand-Wechselwirkungen.

Nr.	Relative Reinheit [%]	Ausbeute [%]	HR-ESI-MS		
			kalkuliert für	gemessen	
13	95	22	C ₁₀₅ H ₁₇₇ N ₂₅ O ₅₁ [M+4H] ⁴⁺	652,1	652,1
14	- ¹	37	C ₁₄₂ H ₂₁₈ N ₃₄ O ₆₅ S ₃ [M+4H] ⁴⁺	885,1	885,1
15	95	22	C ₁₂₇ H ₂₀₉ N ₃₁ O ₅₉ [M+4H] ⁴⁺	779,3	779,4
16	- ²	64	C ₄₈ H ₈₄ N ₁₂ O ₂₂ [M+2H] ²⁺	591,3	591,3
17	95	32	C ₄₁ H ₆₈ N ₁₀ O ₁₆ S [M+2H] ²⁺	495,2	495,2
18	99	18	C ₉₃ H ₁₅₉ N ₂₅ O ₃₉ [M+4H] ⁴⁺	563,5	563,5

¹Siehe Diskussion.

²Das Produkt eluiert mit dem Injektionspeak, eine Reinheitsbestimmung über Integration des UV-Signals ist nicht möglich.

Die Produkte wurden über die verwendete Analytik nachgewiesen und mit relativen Reinheiten $\geq 95\%$ erfolgreich synthetisiert und sollten im nächsten Schritt zur Konjugation an Lipide verwendet werden. Für Struktur 3-Lac-3-*p*SO₃HPh (**14**) konnte ein Nebenprodukt detektiert werden, bei dem eine *p*-Aminobenzolsulfonsäure-Einheit fehlt. Da Produkt- und Nebenproduktpeak sich in der RP-HPLC-Messung überschneiden, konnte keine Reinheit bestimmt werden. Es konnte zudem beobachtet werden, dass eine Peakverbreiterung in der Messung auftritt. Eine mögliche Erklärung ist, dass die drei Sulfonatgruppen des Moleküls in verschiedenen Zuständen also protoniert oder deprotoniert und dann mit einem Kation als Gegenion vorliegen können. Daher wurde dieselbe Probe mit Trifluoressigsäure behandelt. Das RP-HPLC-Spektrum der behandelten Probe zeigt zwei schmale, scharfe, jedoch weiterhin überlappende Signale (siehe Anhang). Die vollständige Deprotonierung der Sulfonate führte somit zu einem einheitlichen Laufverhalten des Produkts sowie des Nebenprodukts. Da somit der Grund für die Peakverbreiterung gefunden werden konnte und das Nebenprodukt im geringeren Anteil vorliegt und weiterhin zwei *p*-Aminobenzolsulfonsäure-Einheiten trägt, wurde das erhaltene Produktgemisch dennoch für die nächsten Schritte verwendet.

3.3.2 Ligand-Lipid-Konjugation zur Präsentation homo- und heteromultivalenter Galektinliganden auf der Oberfläche von Liposomen

Es stehen generell zwei Arten der Liposomfunktionalisierung zur Verfügung. Zum einen können Liposomen vorformuliert werden, die reaktive Gruppen auf ihrer Oberfläche tragen, an die anschließend Liganden konjugiert werden können. Zum anderen lassen sich zunächst Ligand-Lipid-Konjugate synthetisieren und diese anschließend in Liposomen einbringen.³³⁵ Letztere Methode bietet den Vorteil, dass die Konjugate zunächst mittels ¹H-NMR-Analytik und MALDI-TOF-MS charakterisiert werden können und die Menge der eingesetzten Konjugate zur Funktionalisierung der Liposomen genau festgelegt werden kann und wurde daher für die durchzuführende Liposomfunktionalisierung ausgewählt.

Im Rahmen meiner Masterarbeit, deren Ergebnisse als Teil der Arbeiten von Freichel *et al.* veröffentlicht wurden, wurde die Synthese von Glykooligo(amidoamin)-Lipid-Konjugaten für homomultivalente Liganden bereits basierend auf einem Protokoll von Wamhoff *et al.* etabliert, wobei DSPE-PEG-NHS (1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin-Polyethylenglykol-*N*-Hydroxysuccinimid) als Lipidanker verwendet wurde (siehe Abbildung 46).^{90,341} PE-Phospholipide sind eine wichtige Komponente biologischer und künstlicher Membranen.^{335,361} Die verbrückende PEG-Einheit verbessert zudem die Stabilität von Liposomen durch sogenannte *stealth* Effekte gegenüber dem Abbau im Organismus und der NHS-Aktivester erhöht die Reaktivität der terminalen Carboxylgruppe für die Reaktion mit Aminen.^{213,362-363}

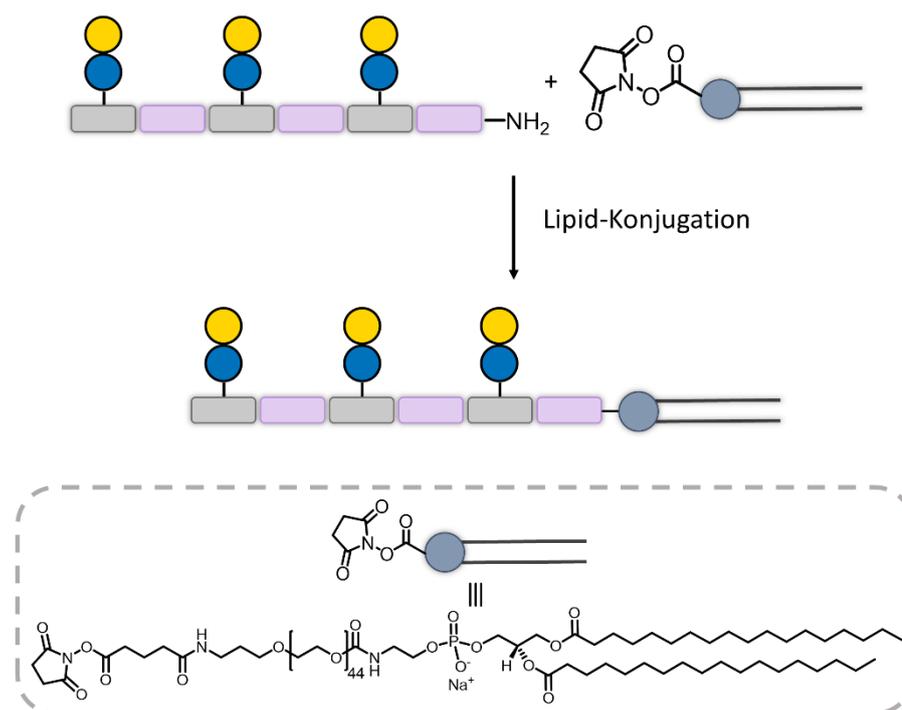


Abbildung 46: Schema der Ligand-Lipid-Konjugation unter Verwendung von DSPE-PEG-NHS und Ligand **13**.

Für Verbindungen 3-Lac (**13**), 1-Lac (**16**) und 3-Glc (**18**) wurde die Reaktion entsprechend des etablierten Protokolls in einem Lösungsmittelgemisch von Natriumhydrogencarbonatpuffer (pH = 8,4) und DMF (1/9) mit 8 Äquivalenten (Äq.) Ligand über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und die Produkte wurden durch Dialyse aufgereinigt. Die Umsätze der Konjugation lassen sich über die ¹H-NMR-Analytik bestimmen, wozu das Integral eines signifikanten Signals des Liganden, normalerweise das der anomeren Protonen, ins Verhältnis zum Integral der terminalen Methylgruppen der Alkylketten des Lipids gesetzt wird.

Tabelle 6: Umsätze, Ausbeuten und MALDI-TOF-MS-Ergebnisse für die Ligand-Lipid-Konjugation der Liganden **13** bis **18** mit DSPE-PEG-NHS.

Nr.	Umsatz ¹ [%]	Ausbeute ² [%]	MALDI-TOF-MS ³	
			kalkuliert für [M+H] ⁺	gemessen
L13	92	48	C ₂₄₃ H ₄₄₅ N ₂₇ NaO ₁₀₇ P	5512,3 / 5512,9
L14	96	29	C ₂₈₀ H ₄₈₆ N ₃₆ NaO ₁₂₁ PS ₃	6443,3 / -
L15	19	13	C ₂₆₅ H ₄₇₇ N ₃₃ NaO ₁₁₅ P	6020,8 / 6021,6
L16	34	33	C ₁₈₆ H ₃₅₂ N ₁₅ NaO ₇₈ P	4063,9 / 4064,0
L17	13	9	C ₁₇₉ H ₃₃₆ N ₁₂ NaO ₇₂ PS	3895,7 / 3895,4
L18	72	42	C ₂₃₁ H ₄₂₇ N ₂₇ NaO ₉₅ P	5158,0 / 5159,4

¹ Bestimmt über ¹H-NMR.

² Bezogen auf das Konjugat unter Berücksichtigung der Umsetzung, also unter Ausschluss des unkonjugierten Lipids.

³ Durchgeführt im positiven Ionenmodus; die angegebenen molekularen Massen wurden für eine PEG-Kette mit 44 Wiederholungseinheiten, entsprechend der beobachtet Hauptsignale berechnet.

Die Umsätze der entsprechenden Lipidkonjugate **L13**, **L16** und **L18** lagen zwischen 34 und 92% (siehe Tabelle 6). Auch in der zuvor veröffentlichten Arbeit von Freichel *et al.* waren die Reaktionsumsätze mit 56 bis 66% unvollständig. Dies lässt sich u.a. durch die Hydrolyse des NHS-Aktivesters erklären,^{90,364} hinzukommt der große Unterschied in der Hydrophilie bzw. Hydrophobie der eingesetzten Reaktanden und ihr großer sterischer Anspruch.

Um zu testen, ob sich die Umsätze optimieren lassen, führte Nils Schomann im Rahmen seiner Masterarbeit eine ausführliche Evaluation verschiedener Reaktionsbedingungen durch.³⁶⁵ Es wurden der Einfluss des Lösungsmittels, der Temperatur und Reaktionsdauer sowie der Einsatz verschiedener Aktivierungsreagenzien und der Zusatz von Guanidiniumchlorid als chaotropes Salz untersucht.³⁶⁵ Für den Einsatz von wasserfreiem DMSO als Lösungsmittel mit DIPEA als Base wurde im direkten Vergleich zu den Standardbedingungen bei einer Testreaktion mit 10% die größte Umsatzsteigerung festgestellt. DMSO bietet sich als Alternative zu dem zuvor verwendeten Natriumhydrogencarbonat-Puffer/DMF-Gemisch an, da hier keine Hydrolyse des NHS-Esters ablaufen sollte und die Reaktanden gut löslich sind. Die von Nils Schomann durchgeführte Konjugation der Liganden 3-Lac-3-*p*SO₃HPh (**14**), 3-Lac-3-COOMe (**15**) und 1-*p*SO₃HPh (**17**) wurde folglich unter diesen optimierten Bedingungen durchgeführt.³⁶⁵ Der Umsatz bei der Synthese von Ligand-Lipid-Konjugat **L14** war mit 96% am höchsten. Für **L15** und **L17** konnten jedoch auch unter den neuen Reaktionsbedingungen nur Umsätze von 19 bzw. 13% erhalten werden. Für Ligand **17** kann eine beobachtete schlechtere Löslichkeit als möglicher Umsatz-mindernder Faktor angeführt werden. Generell sind wie bereits erwähnt Unterschiede in der Hydrophilie und ein großer sterischer Anspruch Faktoren, die die Reaktion beeinflussen. Alle Konjugate konnten somit insgesamt in ausreichenden Ausbeuten zwischen 9 und 48% erhalten und über ¹H-NMR-Spektroskopie und MALDI-TOF-MS (englisch: *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry*) nachgewiesen werden. Lediglich für **L14** wurde die Masse des Produkts nicht über MALDI-TOF-MS detektiert. Da das NMR nach der Aufreinigung mittels Dialyse jedoch die zu erwartenden Signale des Liganden und des Lipids aufweist (siehe Anhang), kann von einer erfolgreichen Synthese ausgegangen werden. Wie im Folgenden dargestellt ließ sich **L14** zudem erfolgreich in Liposomen einbauen und wurde auf der Liposomoberfläche durch Galektine gebunden.

3.3.3 Studie von Galektin-Ligand-Wechselwirkungen – Interaktionen in Lösung und auf Modellmembranen – mittels NMR, Cryo-EM und Molekulardynamik-Simulationen

Untersuchung von Ligand-Galektin-Interaktionen in Lösung mittels NMR

Zunächst sollten die Interaktionen der Liganden mit der CRD von humanem Gal-3 (hGal-3-CRD), welches als Monomer vorliegt, und mit humanem Gal-1 (hGal1), bei dem es sich um ein Homo-Dimer handelt, in Lösung untersucht werden (siehe Abbildung 47). Die entsprechenden Studien wurden von Marta Gutierrez Lete am CICbioGUNE unter der Leitung von Prof. Dr. Jesús Jiménez-Barbero durchgeführt. Es wurde zunächst ¹H-STD-NMR-Spektroskopie verwendet. Mit dieser Methode lassen sich Interaktionen zwischen Ligand und Protein

nachweisen und darüber hinaus die Ligand-Bindungsepitope identifizieren (für Details siehe auch 1.1.2).^{95,97-98}

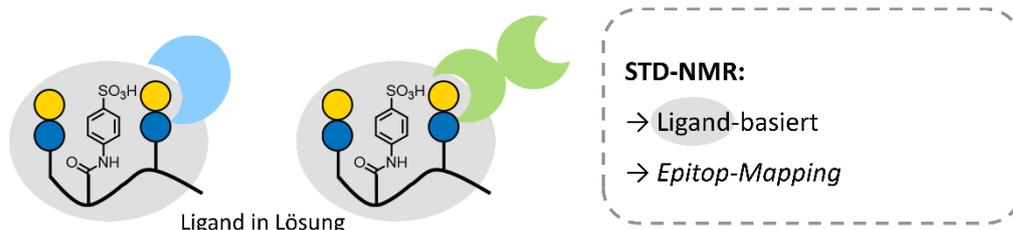


Abbildung 47: Schematische Darstellung und kurze Erläuterung zu den STD-NMR-Messungen.

Kurzgefasst wird eine Sättigung des Proteins im NMR-Experiment angeregt und diese auf Protonen eines anbindenden Liganden übertragen. Je stärker der Bereich eines Liganden an der Wechselwirkung mit der Protein-CRD beteiligt ist, desto größer ist die Übertragung der Sättigung. Final wird ein Spektrum erhalten, in dem lediglich die Ligandprotonen der an der Interaktion beteiligten Strukturelemente des Liganden zu sehen sind, wobei die Signalstärke mit dem Bindungsanteil korreliert.⁹⁸

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente sind in Abbildung 48 dargestellt und zeigen, dass die Interaktion mit beiden Galektinen lediglich über die Laktose-Einheit vermittelt wird. Für die beiden Negativkontrollen, das monovalente *p*-Aminobenzolsulfonsäure-funktionalisierte Oligomer 1-*p*SO₃HPh (**17**) und das trivalente Glukose-Oligomer 3-Glc (**18**) wurde dementsprechend keine Interaktion beobachtet. Für die multivalenten homo- und heterofunktionalisierten Liganden **13** bis **15**, also 3-Lac, 3-Lac-3-*p*SO₃HPh und 3-Lac-3-COOMe, sowie für den homovalenten Lactose-Liganden 1-Lac (**16**) wurden insbesondere große STD-NMR-Intensitäten für die Protonen H4, H5 und H6 der Galaktose-Einheit der Laktose erhalten. Für manche der Liganden wurden auch Interaktionen der Glukose-Einheit beobachtet. Solche leichten Schwankungen sind insbesondere aufgrund der Größe des Proteins nicht weiter ungewöhnlich und lassen daher keine weiteren Schlüsse beispielsweise auf die Bindungsstärke zu.³⁶⁶ Die Ergebnisse sind jedoch insofern überraschend, als dass die vorherigen Studien zu den Aviditäten der homo- und heteromultivalenten Liganden einen positiven, Aviditäts-steigernden Effekt der *p*-Aminobenzolsulfonsäure nachgewiesen haben.⁹⁰ Dieser lässt sich jedoch, wie die STD-Experimente zeigen, nicht durch die Interaktion mit der CRD der Galektine erklären. Auch eine Interaktion der aromatischen Motive mit dem Protein an einer anderen Stelle des Proteins wäre durch die durchgeführten STD-Experimente beobachtbar und kann somit ausgeschlossen werden. Auch wenn für andere Galektinliganden, häufig durch Kristallstrukturanalysen^{43,73}, solche sekundären Interaktionen beobachtet werden konnten, scheint die Aviditätssteigerung für die Glykooligo(amidoamine) nicht auf solchen Wechselwirkungen zu basieren. Die STD-NMR-Ergebnisse zeigen auch, dass die Interaktion der auf einem Oligo(amidoamin)-Rückgrat präsentierten Laktose ähnlich ist zu der von freier Laktose. Die Art der Präsentation auf dem Oligomerrückgrat beeinträchtigt also die Interaktion mit den Lektinrezeptoren nicht negativ und die Interaktion wird hauptsächlich durch den β -Galaktosering der Laktose vermittelt.

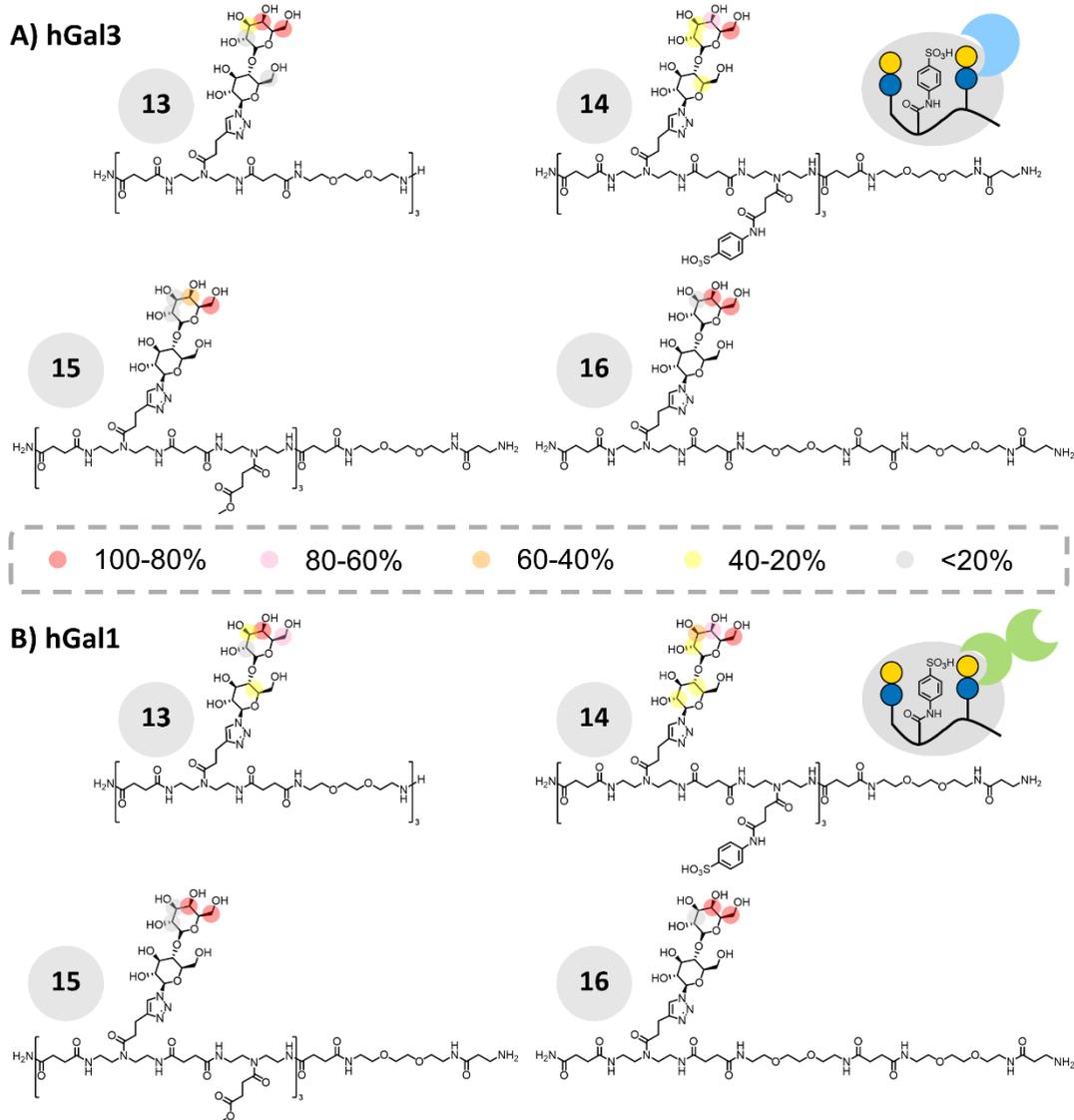


Abbildung 48: Bindungsepitop-Charakterisierung als Ergebnis der ^1H -STD-NMR-Studien für die synthetisierten Laktose-funktionalisierten Liganden in der Interaktion mit hGal3 (oben) und hGal1 (unten) bei einer Galektinkonzentration von $40\mu\text{M}$ und einem Molverhältnis von 8:1 für 3-Lac (**13**), 3-Lac-3- $p\text{SO}_3\text{HPh}$ (**14**) und 3-Lac-3-COOMe (**15**) sowie 30:1 für 1-Lac (**16**).

Die Interaktion der Liganden in Lösung mit den ausgewählten Lektinen wurde anschließend, nun über einen Rezeptor-basierten Ansatz, wie in Abbildung 49 schematisch dargestellt, noch weiter untersucht. Hierzu wurde das heteromultivalente 3-Lac-3- $p\text{SO}_3\text{HPh}$ -Oligomer **14** als Modellverbindung ausgewählt und die Lektine in ^{15}N -gelabelter Form verwendet, um zweidimensionale ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren aufzunehmen.

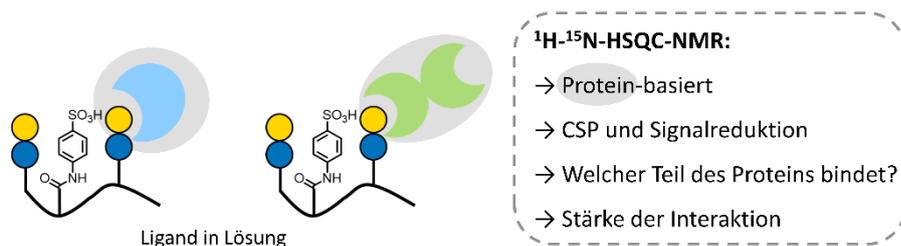


Abbildung 49: Schematische Darstellung und kurze Erläuterung zu den ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Experimenten mit den freien Liganden in Lösung.

Die Methode untersucht die Bildung eines Protein-Ligand-Komplexes¹⁰⁰:



Im Gleichgewicht kann die Komplexbildung über die Dissoziationskonstante K_D (Einheit: M) sowie die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation ($k_{on} [M^{-1}s^{-1}]$) und Dissoziation ($k_{off} [s^{-1}]$) mit der folgenden Gleichung beschrieben werden¹⁰⁰:

$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (5)$$

Im Vergleich mit anderen Methoden zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von Protein-Ligand-Interaktionen wie beispielsweise SPR- und ELISA-Assays, bei denen Ligand oder Protein immobilisiert werden muss, ist ein großer Vorteil, das die Interaktion im gelösten und dynamischen Zustand betrachtet werden kann.

Wie bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben (siehe 1.1.1) hat die Geschwindigkeit des Austauschs zwischen gebundenem und freiem Zustand und somit die Stärke der Bindung einen großen Einfluss auf das erhaltene NMR-Spektrum. Für einen schnellen Austausch wird eine Verschiebung der Signale, die sogenannte *chemical shift perturbation*, der Aminosäuren des Proteins im NMR-Spektrum beobachtet, wobei die Verschiebung stärker ist für die Signale der Aminosäuren, die einen größeren Anteil an der Interaktion haben und mit der Stärke der Bindung bzw. dem Molanteil des Protein-Ligand-Komplexes (AB) zunimmt.^{100,102} So können beispielsweise bei der Charakterisierung von Proteinen die Aminosäuren der CRD identifiziert werden, da für diese eine stärkere CSP auftritt. Außerdem kann durch Vergleich der für verschiedene Liganden beobachteten CSP auch die Bindungsstärke verglichen werden.^{100,102}

Dies wurde auch in den durchgeführten ¹H-¹⁵N-HSQC-Experimenten genutzt. Es wurde für die Untersuchung zunächst die Interaktion von Gal-3 mit 3-Lac-3-*p*SO₃HPh (**14**) beobachtet, wobei der Ligand in einem 1:1 Verhältnis eingesetzt wurde, was einem Verhältnis von drei Laktose-Einheiten zu einer Gal-3-CRD entspricht. Zudem wurden Spektren mit 3 bzw. 10 Äq. Laktose zum Vergleich aufgenommen. Es kann für Gal-3 von einem schnellen Austausch zwischen gebundenem und freiem Protein ausgegangen werden. Dementsprechend wird nach Zugabe des Liganden ein Signal für jedes Amidproton des Proteins detektiert, durch Vergleich mit dem Spektrum ohne Liganden wird die CSP erhalten. Die CSP bei einem Äquivalent von Struktur 3-Lac-3-*p*SO₃HPh (**14**), welches 3 Äq. Laktose entspricht, ähnelt der für 10 Äq. der freien Laktose gemessenen (siehe Abbildung 50). Es wird also bezogen auf die einzelne Kohlenhydrat-Einheit für 3-Lac-3-*p*SO₃HPh (**14**) ein größerer Anteil an Protein-Ligand-Komplex, also eine verstärkte Interaktion beobachtet. Dies kann durch das Auftreten multivalenter Effekte erklärt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass statistische Effekte wie *statistical rebinding* (deutsch: statistische Neubindung) auftreten, die durch die hohe lokale Konzentration an Bindungssepitopen die Bindungsavidität erhöhen.³⁶⁷ Zudem kann potenziell auch *receptor clustering* auftreten (siehe unten), wie dies allgemein für multivalente Liganden beschrieben wurde³⁹, über die CSP-Daten aus den NMR-Experimenten lässt sich dies jedoch nicht weiter untermauern.

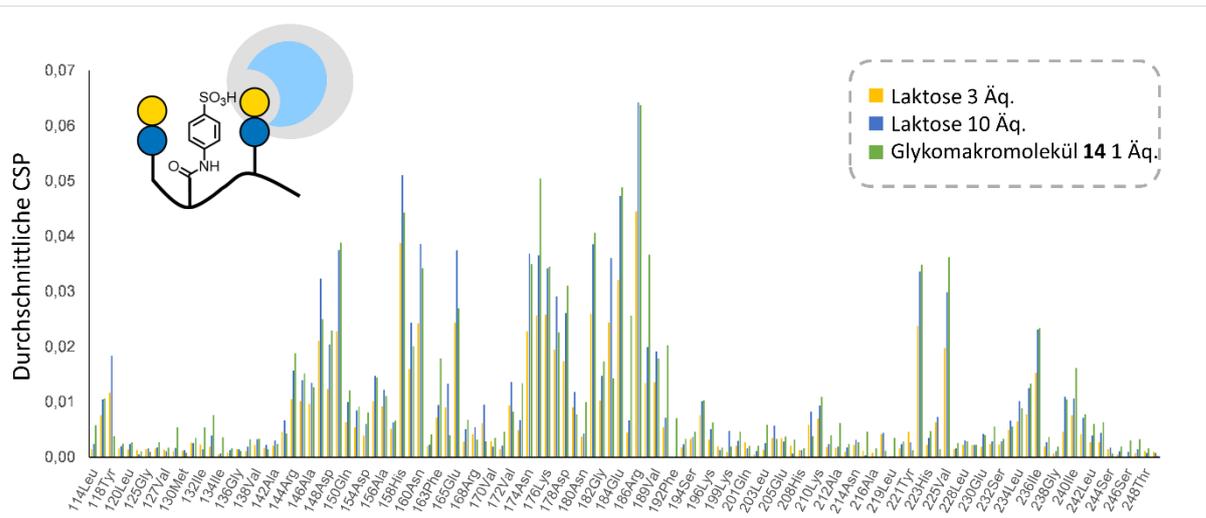


Abbildung 50: Gemessene CSP für die hGal3-CRD bei der Bindung von 3-Lac-3- pSO_3 HPH (**14**) (1:1 Verhältnis, grün) bzw. bei der Interaktion mit freier Laktose (1:3 und 1:10 Verhältnis, gelb bzw. blau).

Durch Vergleich der CSP für die Interaktion mit Laktose und dem Liganden 3-Lac-3- pSO_3 HPH (**14**), kann zudem gezeigt werden, dass die gleichen Aminosäuren zur Interaktion beitragen. Wie also auch schon die STD-Daten gezeigt haben, wird die Interaktion des Liganden mit Gal-3 über die Wechselwirkung der Laktose-Einheit mit den Aminosäuren der CRD vermittelt, die auch mit der freien Laktose interagieren, andere Teile des Proteins zeigen keine zusätzlichen Interaktionen.

Unter den gleichen Bedingungen wurde auch die Interaktion von Gal-1 mit 3-Lac-3- pSO_3 HPH (**14**) und Laktose untersucht. Für 3-Lac-3- pSO_3 HPH (**14**) wurde jedoch keine klassische CSP beobachtet, sondern eine deutliche Reduktion der Intensität der NMR-Signale.

Dies lässt sich durch einen Anstieg der Relaxationsraten der NMR Signale erklären, welche zu einer Verminderung der Signalintensitäten bis hin zu deren Verschwinden führen können. Zu diesem Anstieg der Relaxationsraten können zwei verschiedene Effekte beitragen. Zum einen kann ein Phänomen, das als chemischer Austausch (englisch: *chemical exchange*) bezeichnet wird, auftreten.¹⁰³ Da im durchgeführten Experiment das Protein im Wechsel zwischen freiem und gebundenem Zustand beobachtet wird, ändert sich die magnetische Umgebung. Abhängig von der Geschwindigkeit der Protein-Ligand-Komplexbildung kann dies wie oben bereits erwähnt die erhaltenen Spektren beeinflussen. Bei einer Interaktion im mittleren Bereich der Zeitskala ist die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation ähnlich der Differenz der chemischen Verschiebung und es treten verbreiterte Signale auf, die zudem an Intensität verlieren und dadurch sogar verschwinden können.^{103,368} Es ist möglich, dass für die Interaktion des Liganden mit Gal-1 der Austausch zwischen freiem und gebundenem Zustand des Proteins auf einer mittleren Zeitskala in Bezug auf die Zeitskala des NMR-Experiments stattfindet, also langsamer als zuvor für die Interaktion mit Gal-3 und daher die Signalreduktion auftritt. Eine Verlangsamung der Ligand-Protein-Komplexbildung bedeutet eine größere Stabilität des Komplexes also eine höhere Stärke der Bindung. Dies ließe sich beispielsweise durch die Bildung von Protein-Ligand-Clustern der multivalenten Liganden mit den Gal-1-Dimeren erklären.

Ergebnisse und Diskussion

Der zweite Effekt, der zu einer Erhöhung der Relaxationszeit und somit zum Verschwinden von NMR-Signalen führen kann, ist die Einschränkung bzw. Verlangsamung der Molekülbewegungen, im Englischen häufig auch als *molecular tumbling* bezeichnet. Bewegt sich ein Molekül zu langsam, so steigen die Relaxationszeiten und das Molekül wird unsichtbar für das NMR.³⁶⁹ Für das Gal-1 alleine wäre so ein Verhalten nicht zu erwarten. Bilden sich jedoch größere Cluster und Komplexe der Proteine mit den multivalenten Liganden, so können die Proteine in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt werden und die Signale im NMR-Spektrum vermindert werden oder verschwinden. Es lässt sich hier nicht weiter differenzieren, welchen Beitrag die beiden Effekte zur beobachteten Signalintensitätsreduktion leisten. In beiden Fällen jedoch deutet die Signalreduktion auf eine Erhöhung der Bindungsstärke hin, die durch die Bildung von Protein-Ligand-Komplexen begründet werden kann. Die Entstehung solcher Komplexe ist im Gegensatz zu dem Experiment mit der Gal-3-CRD dadurch begünstigt, dass Gal-1 als Homodimer vorliegt. Übereinstimmend mit dieser Vermutung, konnte die Bildung einer leichten Trübung bzw. eines Niederschlags im NMR-Röhrchen beobachtet werden, die ebenfalls auf die Entstehung von Clustern hindeutet. Ähnliche Beobachtungen konnten beispielsweise auch von Bertuzzi *et al.* für multivalente Liganden und Gal-1 bzw. Gal-3 in vergleichbaren NMR-Studien gemacht werden.³⁶⁶

Untersuchung von Ligand-Galektin-Interaktionen auf der Oberfläche von Liposomen mittels NMR

Neben den Interaktionen in Lösung sollten auch die Protein-Ligand-Wechselwirkungen von Membran-verankerten Liganden auf der Oberfläche von Liposomen zur besseren Nachahmung der natürlichen Situation untersucht werden (siehe Abbildung 51). Die entsprechenden NMR-Messungen wurden ebenfalls in Kooperation mit dem Institut CICbioGUNE durch Marta G. Lete und weitere Kooperationspartner*innen unter Leitung von Prof. Dr. Jesús Jiménez-Barbero durchgeführt.

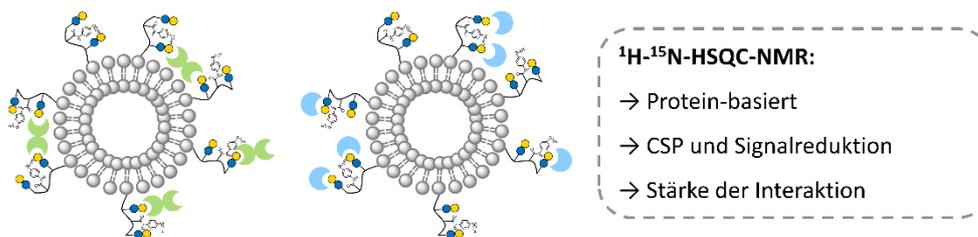


Abbildung 51: Schematische Darstellung und kurze Erläuterung zu den ¹H-¹⁵N-HSQC-NMR-Experimenten mit Liposomen.

Dazu wurden die Konjugate mit L- α -Phosphatidylcholin (Hauptbestandteil: POPC, 1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholin) gemischt und aus der Lipidmischung Liposomen hergestellt. Wie bereits erwähnt können Einschränkungen der Molekülbewegungen, des *molecular tumbling*, dazu führen, dass große Aggregate im NMR-Experiment nicht beobachtet werden können. Dies gilt auch für die funktionalisierten Liposomen, die deutlich größer als die Liganden allein oder auch die Proteine sind, und für die daher keine Ligand-basierten Methoden verwendet werden konnten. Stattdessen wurden erneut Protein-basierte ¹H-¹⁵N-HSQC-NMR-Messungen genutzt, um die Wechselwirkung zu charakterisieren. Für die

Messungen wurden alle Lipid-Konjugate (**L13** bis **L18**) für die Funktionalisierung von Liposomen verwendet. Zudem wurde eine Probe mit unfunktionalisierten Liposomen untersucht.

In den Experimenten mit hGal3-CRD konnte für die Laktose-funktionalisierten Liganden eine Signalreduktion sowie eine CSP beobachtet werden. Die Signalreduktion kommt durch die Anbindung des Proteins an die Liposomoberfläche zustande, wodurch die Beweglichkeit, also das *molecular tumbling*, des Proteins eingeschränkt und die Intensität der entsprechenden Signale vermindert wird. Zur Auswertung werden die Intensitätsreduktionen aller Signale im NMR-Spektrum gemittelt und aufgetragen, wobei eine stärkere Signalreduktion einer höheren Bindungsstärke beziehungsweise Verweildauer im gebundenen Zustand entspricht.

Die erhaltenen Werte lagen für die mit den trivalenten Lipidkonjugaten, 3-Lac-Lipid (**L13**), 3-Lac-3-*p*SO₃HPh-Lipid (**L14**) und 3-Lac-3-COOME-Lipid (**L15**) funktionalisierten Liposomen bei ungefähr 50% der ursprünglichen Intensitäten (siehe Abbildung 52). Für die monovalente Struktur 1-Lac (**L16**) wird, erneut entsprechend der Erwartung, eine geringere Reduktion beobachtet. Für die Liposomen, die mit den Negativkontrollen funktionalisiert wurden, also bei der Verwendung von 1-*p*SO₃HPh-Lipid (**L17**) und 3-Glc-Lipid (**L18**), sowie für die unfunktionalisierten Liposomen wird keine Änderung der chemischen Verschiebung und Signalintensitäten registriert. Dies zeigt, dass die Interaktion spezifisch und durch die Laktose-Einheiten vermittelt abläuft. Um diese Beobachtung weiter zu untermauern, wurden Messungen unter kompetitiven Bedingungen – Zugabe von 20 Äq. Laktose – durchgeführt. Die Zugabe von Laktose zeigte in den anschließend wiederholten ¹H-¹⁵N-HSQC-NMR-Messungen eine vollständige Wiederherstellung der Signalintensitäten für 3-Lac-Lipid (**L13**) und 1-Lac-Lipid (**L16**). Für 3-Lac-3-COOME-Lipid (**L15**) wurden 90% und für 3-Lac-3-*p*SO₃HPh-Lipid (**L14**) 70% der ursprünglichen Signalintensität wiederhergestellt. Bei unvollständiger Signalwiederherstellung ist die Bindung an Gal-3 am schwierigsten zu inhibieren und dementsprechend am stärksten. Die Trends bei der Peakwiederherstellung deuten somit an, dass die Interaktion von 3-Lac-3-*p*SO₃HPh (**L14**)-funktionalisierten Liposomen mit der hGal3-CRD am stärksten ist.

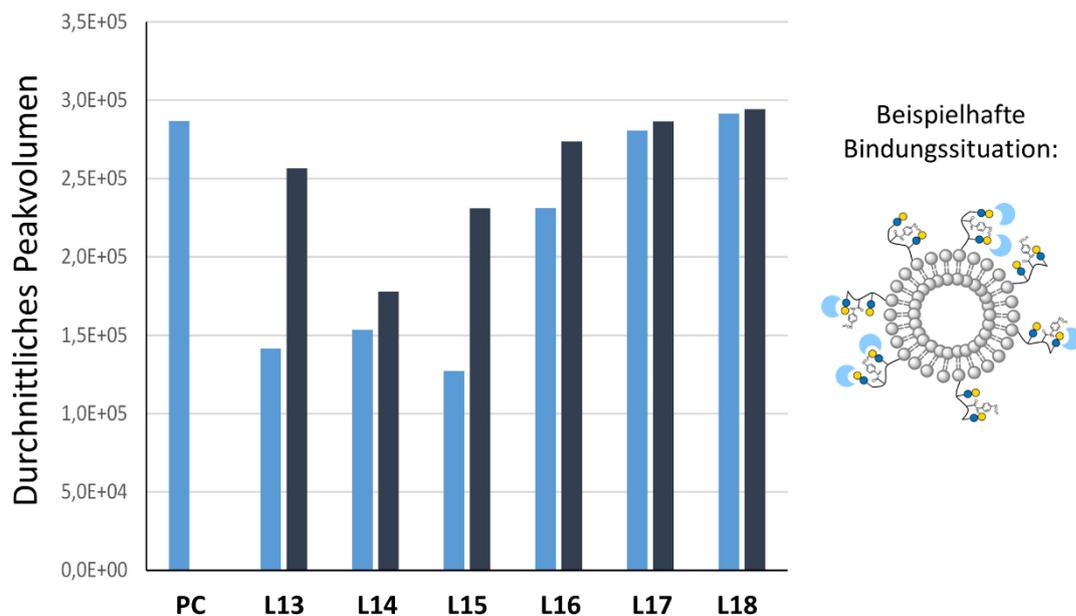


Abbildung 52: Bestimmung der Peakvolumenreduktion für die hGal-3 CRD durch Anbindung an Ligand-funktionalisierte Liposomen (hellblau) sowie die Wiederherstellung der Signalintensitäten durch Zugabe von 20 μ g Laktose (dunkelblau). Als Kontrolle wurde zudem das Protein zusammen mit unfunctionalisierten Liposomen (PC) vermessen.

Diese Beobachtung deckt sich mit den bereits diskutierten Ergebnissen aus den von Freichel *et al.* veröffentlichten Arbeiten. Und es kann nun erstmalig nicht nur für die heteromultivalenten Liganden in Lösung, sondern auch auf Liposomen, ein solch bindungsverstärkender Effekt durch die *p*-Aminobenzolsulfonsäure-Einheiten nachgewiesen werden. Da die STD-NMR-Studien aber keine Interaktion der CRD bzw. des Proteins mit den zusätzlich auf dem Ligandrückgrat aufgebrauchten Funktionen zeigen, lässt sich über die Gründe dieser Intensitätssteigerung keine klare Aussage treffen. Eine mögliche Hypothese basiert auf einer Betrachtung der konformativen Eigenschaften der Liganden. Basierend auf vorherigen Studien kann davon ausgegangen werden, dass das Oligomer als Knäuel vorliegt. Es ist nun vorstellbar, dass sich die sekundären aromatischen Einheiten innerhalb dieses Knäuels durch Interaktionen der π -Elektronen zusammenlagern. Ebenso können Interaktionen der aromatischen Ringe mit den anionischen Sulfonatgruppen benachbarter sekundärer Einheiten auftreten. Solche Interaktionen tragen beispielsweise auch zu der Faltung von Proteinen bei.³⁷⁰ Das Oligomerknäuel wird durch diese Interaktionen enger, wobei andere Teile des Moleküls wie die Laktose-Einheiten nach außen gedrängt werden. Es kann angenommen werden, dass durch die veränderte Präsentation die Kohlenhydrate für die Proteine besser zugänglich werden. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für andere Glykooligo(amidoamine) mit aromatischen Einheiten aus der Gruppe von Hartmann *et al.* gemacht.²³¹

Bei der Untersuchung der Liposominteraktion mit Gal-1 wurde für 1-*p*SO₃HPh-Lipid (**L17**) und 3-Glc-Lipid () wie erwartet erneut keine Veränderung der aufgenommenen NMR-Spektren beobachtet. Die Experimente mit Laktose-enthaltenden Liposomen (funktionalisiert mit **L13** bis **L16**) hingegen zeigten erneut drastisch verschiedene Ergebnisse im Vergleich zu den Experimenten mit Gal-3. Die Signale in den aufgenommenen Spektren verschwanden

vollständig und auch die Zugabe von 20 Äq. Laktose führte nicht zu einer Wiederherstellung der Signalintensitäten. Ebenso konnte eine starke Sedimentation im NMR-Röhrchen beobachtet werden. Wie schon die Ergebnisse der ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Studien des Liganden 3-Lac-3-*p*SO₃HPh (**14**) in Lösung deutet dies auf eine deutliche Steigerung der Stärke der ablaufenden Interaktionen mit Gal-1 im Vergleich zu Gal-3 hin. Das vollständige Verschwinden der Signale kann durch die Bildung großer und stabiler Protein-Ligand bzw. Liposom-Komplexe erklärt werden, die aufgrund ihrer eingeschränkten Beweglichkeit nicht über die verwendeten NMR-Methoden detektiert werden können. Eine Beobachtung, die auch schon für andere multivalente Glykomimetika zur Ansteuerung von Gal-3 und Gal-1 gemacht werden konnte.³⁶⁶ Ein Vergleich mit den Ergebnissen für die freien Liganden in Lösung ist nicht direkt möglich, da für die Anbindung des Proteins an Liposomen inhärent eine stärkere Einschränkung der Beweglichkeit des Proteins zu erwarten ist als für die Anbindung an die freien Liganden. Es lässt sich aber festhalten, dass Gal-1 in Kombination mit den hier verwendeten multivalenten Systemen die Bildung von stabilen Clustern zu ermöglichen scheint.

Es sollte daher weiter untersucht werden, ob sich die zugrundeliegenden Mechanismen und strukturellen Parameter der Interaktion aufklären lassen. Der große Unterschied zwischen Gal-1 und Gal-3 ist, dass Gal-1 als Homodimer und für Gal-3 lediglich die CRD in den NMR-Studien verwendet wurde. Dies lässt die Vermutung zu, dass die hGal1-Homodimere im Gegensatz zur hGal3-CRD Liganden verbrücken können. Gal-1 kann dabei theoretisch an zwei Liganden desselben Liposoms oder an Liganden unterschiedlicher Liposomen binden. Diese verschiedenen Interaktionsmodi können als *trans* und *cis* bezeichnet werden und sind schematisch in Abbildung 53 skizziert. Theoretisch ebenfalls denkbar wäre eine Anbindung des Galektindimers an zwei Laktose-Einheiten desselben Liganden. Eine solche Interaktion ist aber aufgrund der Tatsache, dass die beiden Bindungsstellen des Gal-1-Homodimers in entgegengesetzte Richtungen zeigen, sehr unwahrscheinlich und wird im Weiteren daher nicht betrachtet.³⁷¹

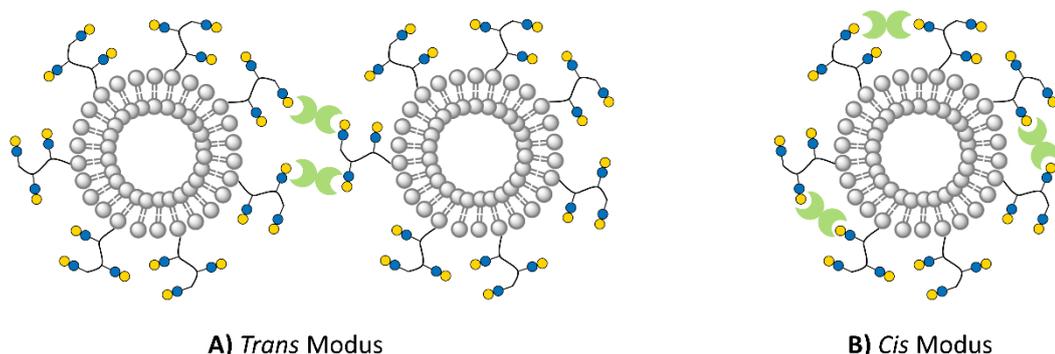


Abbildung 53: Schematische Darstellung der möglichen *cis*- und *trans*-Interaktionen von hGal1 mit den Liganden auf der Liposomoberfläche.

Für beide Prozesse ist davon auszugehen, dass sie zu einer verstärkten Interaktion führen. Die Verbrückung von Liganden auf verschiedenen Liposomen kann aber zusätzlich eine Formierung größerer Komplexe aus Proteinen und Liposomen bewirken.

Untersuchung von Ligand-Galektin-Interaktionen auf der Oberfläche von Liposomen mittels Cryo-EM und Molekulardynamik (MD)-Simulationen

Um die These zu unterstützen, dass die Gal-1-Homodimere zu einer Verbrückung von Liganden führen, wurden als nächstes Cryo-EM-Aufnahmen der funktionalisierten Liposomen mit und ohne Galektinzusatz erstellt, wobei die gleichen Bedingungen wie für die NMR-Experimente verwendet wurden (siehe Abbildung 54). Die Cryo-EM- und MD-Experimente wurden ebenfalls am CICbioGUNE unter der Leitung von Prof. Dr. Jesús Jiménez-Barbero durchgeführt.

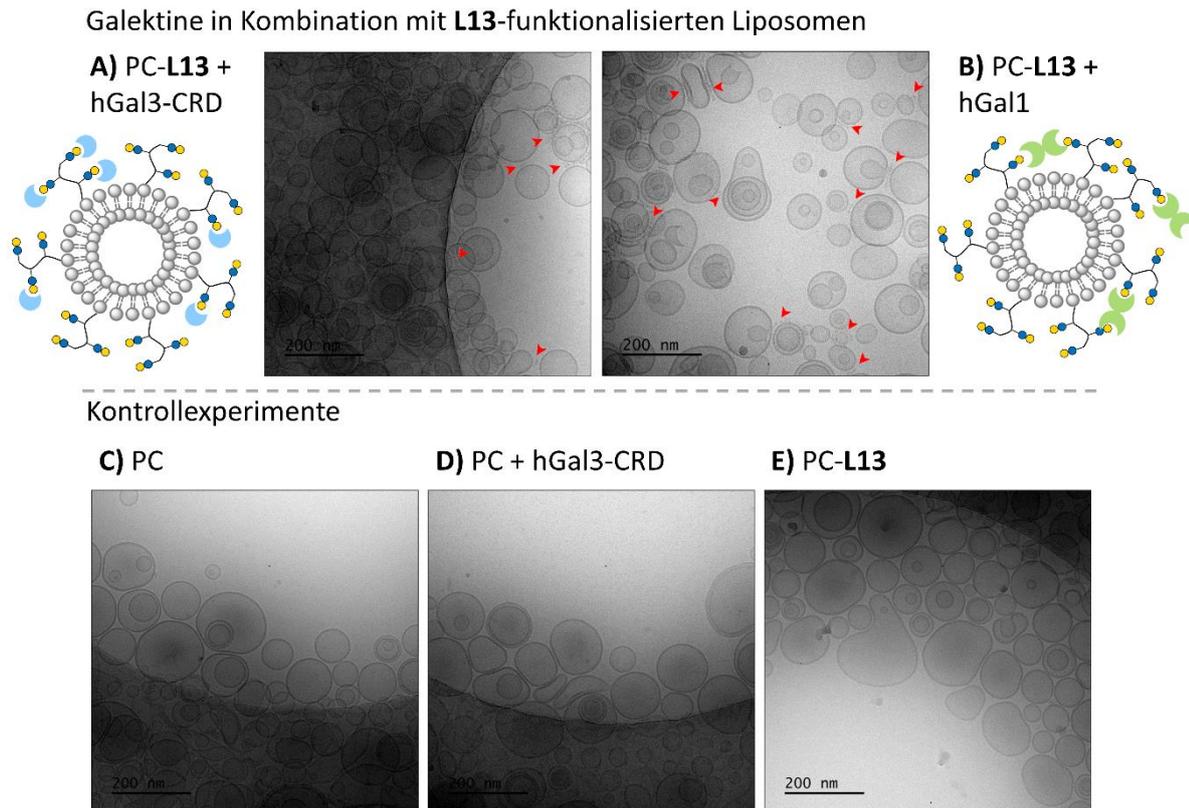


Abbildung 54: Cryo-EM-Aufnahmen für folgende Probenzusammensetzungen: A) 3-Lac-Lipid (**L13**)-funktionalisierte Liposomen mit hGal3-CRD mit schematischer Darstellung der möglichen Interaktionen; B) 3-Lac-Lipid (**L13**)-funktionalisierte Liposomen mit hGal1 mit schematischer Darstellung der möglichen Interaktionen; C) unfunktionalisierte Liposomen; D) unfunktionalisierte Liposomen mit hGal3-CRD und E) 3-Lac-Lipid (**L13**)-funktionalisierte Liposomen.

Die Bilder A und B in Abbildung 54 zeigen die Situation, wenn Liposomen funktionalisiert mit 3-Lac-Lipid (**L13**) in Kombination mit jeweils einem der beiden verschiedenen Galektine vorliegen. Im unteren Abschnitt sind Aufnahmen unter Kontrollbedingungen gezeigt, bei denen nackte Liposomen allein (C), mit hGal-3CRD (D) und Liposomen funktionalisiert mit 3-Lac-Lipid (**L13**) aber ohne Zusatz von Protein erstellt wurden. Für die Kontrollbedingungen sind kaum ausgedehnteren Kontaktflächen zwischen den Liposomen zu beobachten und es kann ein unabhängiges Verhalten der Liposomen angenommen werden. Im Gegensatz dazu zeigen die Bilder A und B ein vermehrtes Auftreten von elektronendichten Bereichen an Kontaktflächen von Liposomen, wobei für Gal-1 deutlich mehr solcher Bereiche gefunden werden können. Elektronendichte Bereiche können sowohl für A als auch B auf die Akkumulation von Proteinen hindeuten. Eine mögliche Erklärung, dass solche Bereiche

deutlich häufiger in B) beobachtet werden, ist die Verbrückung von Liganden auf der Liposomoberfläche durch Gal-1 via eines *trans* Modus.

Um diese mögliche Erklärung durch Berechnungen zu unterstützen, wurden zwei verschiedene Situationen durch *full-atom* MD-Simulationen modelliert; einmal die Anbindung von drei Gal-3-Molekülen an die drei Kohlenhydratepitope eines einzelnen membranverankerten 3-Lac-Lipid-(**L13**)-Moleküls und einmal die Anbindung eines Gal-1-Homodimers an die äußere bzw. die mittlere Laktose-Einheit zwei verschiedener 3-Lac-(**L13**)-Moleküle, in beiden Fällen auf einer kleinen Doppelschicht aus POPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholin). Somit wird in der Modellierung die Membransituation auf der Liposomoberfläche nachgeahmt (siehe Abbildung 55).

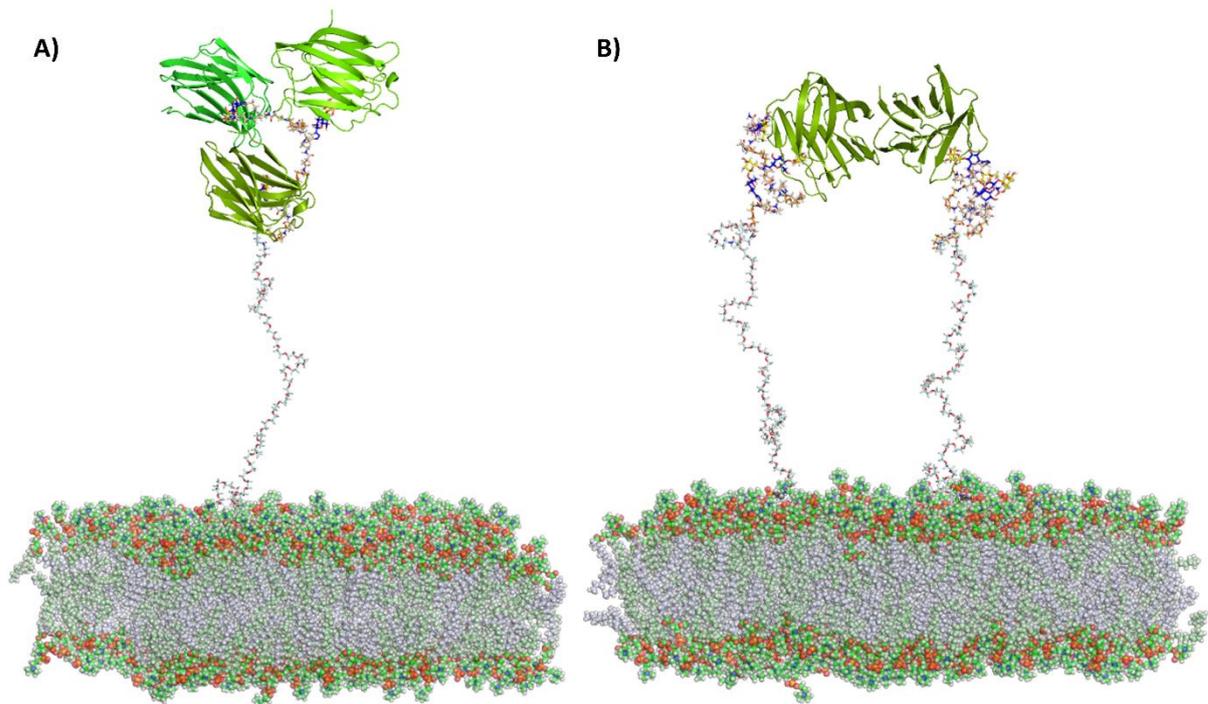


Abbildung 55: Repräsentative Momentaufnahmen einer 100 ns dauernden MD-Simulation in wässriger Lösung für die folgenden Situationen auf einer POPC Doppelschicht: A) drei Gal-3-Moleküle binden simultan an die drei Laktose-Einheiten von einem 3-Lac-Lipid (**L13**)-Molekül und B) ein Gal-1-Homodimer bindet an die äußere und die mittlere Laktose-Einheit zwei verschiedener 3-Lac-Lipid (**L13**)-Moleküle.

In den durchgeführten Simulationen konnte beobachtet werden, dass sich die PEG-Ketten, die Ligand und Lipid miteinander verknüpfen, zusammenziehen, was durch ihre große Flexibilität und den hydrophoben Effekt zu erklären ist. So kann PEG sowohl hydrophile als auch hydrophobe Charakteristika im wässrigen Medium ausbilden.³⁷² Dennoch erhalten sie einen gewissen Abstand zwischen Liganden und Membran über den kompletten simulierten Zeitraum (100 ns). Während der Simulation weisen die Laktose-Einheiten gleichbleibende geometrische Parameter auf, was darauf hinweist, dass die Bindung beider Lektine über deren kanonische, also klassischen, Bindungsmodi, wie sie auch in Kristallographiestudien charakterisiert wurden, erfolgt.³⁷³⁻³⁷⁴ Die Simulationen zeigen, dass multivalente Interaktionen zwischen Ligand 3-Lac (**13**) auf der Oberfläche von Liposomen und Gal-3 wie auch Gal-1 stattfinden können. Beide modellierten Situationen können eine Erklärung für das

Ergebnisse und Diskussion

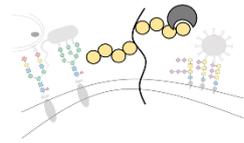
Auftreten elektronendichter Bereiche in den gezeigten Cryo-EM-Aufnahmen liefern, da über multivalente Interaktionen eine Akkumulation von Liganden und Galektinen stattfindet wird. Die Fähigkeit von Gal-1 zur Verbrückung von Liganden, wenn auch für den *trans*-Modus nicht über Simulationen untermauert, kann zudem als eine Erklärung dafür dienen, dass diese Bereiche für Gal-1 häufiger auftreten.

Insgesamt zeigen die erhaltenen Ergebnisse den Einfluss der Ligand-Präsentation auf die Interaktion mit Proteinen. Da NMR-Studien zu Protein-Ligand-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen, besitzt insbesondere die vorgestellte Verwendung der Liposomen in solchen Untersuchungen und die dadurch ermöglichte Betrachtung von dynamischen Protein-Membran-Interaktionen, die die natürlichen Protein-Glykokalyx-Interaktionen nachahmen, ein großes Potenzial auch für zukünftige Studien zu Protein-Ligand-Interaktionen. Zudem war es insbesondere durch die Kombination von NMR-, Cryo-EM- und MD-Experimenten zur Untersuchung liposomaler Systeme und multivalenter Liganden möglich die ablaufenden Interaktionen weiter zu entschlüsseln. Der Nachweis einer ausgesprochen stabilen Interaktion von Gal-1 mit multivalenten Liganden in Lösung und bei der Interaktion mit funktionalisierten Liposomen, bei denen die gebildeten Komplexe durch die Zugabe von Laktose nicht aufgebrochen werden können, ist besonders für die Galektine, die ihre biologische Funktion häufig durch Ausbildung von Clustern auf der Zellmembran ausführen, von großem Interesse.

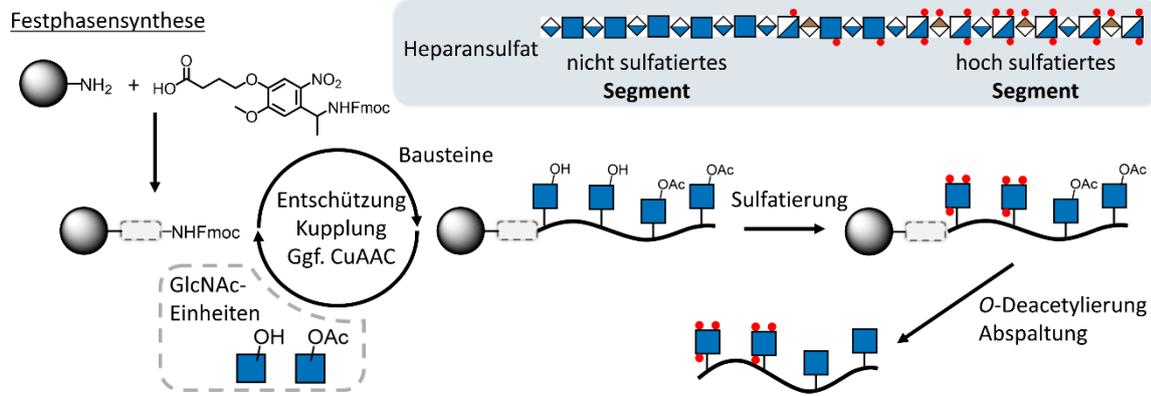
4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Synthese spezifisch modifizierter, durch Festphasensynthese erhaltener Glykomimetika und insbesondere deren Präsentation auf Membranen realisiert. Die erhaltenen Strukturen wurden dann zur Studie von Protein-Ligand-Interaktionen in Lösung und auf der Oberfläche verschiedener Membransysteme genutzt. Es wurde die Synthese global und segmentweise sulfatierter Glykooligo(amidoamine) mittels Festphasensynthese etabliert und durch eine Weiterentwicklung der Festphasensyntheseplattform die Präsentation sulfatierter Glykomakromoleküle auf Membranen zur Ansteuerung von Virus-Membran-Interaktionen ermöglicht. Darüber hinaus wurde die Membranpräsentation heteromultivalenter Galektinliganden durch Ligand-Lipid-Konjugation ermöglicht, und die erhaltenen Ligand-funktionalisierten Liposomen wurden als Zellmodellsysteme in NMR-, Cryo-EM- und Molekulardynamik-Simulation-Studien (MD-Simulationen) verwendet.

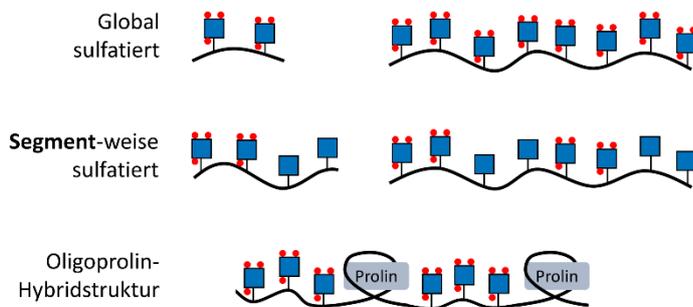
Im ersten Teil der Arbeit wurde die Etablierung einer Festphasensynthesemethode zur Herstellung global und insbesondere segmentweise funktionalisierter Glykooligo(amidoamine) als sGAG-Mimetika vorgestellt (Abbildung 56). Solche Strukturen bieten die Möglichkeit, mit großer Definition die in natürlichem Heparansulfat auftretenden Sequenzen stark und nicht sulfatierter Regionen nachzuahmen. Um erstmalig die Sulfatierung von Glykooligo(amidoaminen) als Teil der Festphasensyntheseroute durchführen zu können, wurde ein photospaltbarer Linker eingeführt, der die schonende Abspaltung der sulfatierten Strukturen erlaubt. Es wurden die Kompatibilität des verwendeten Fmoc-Photo-Linkers mit den Reaktionsbedingungen der Festphasensynthese überprüft und über Fmoc-Ladungsbestimmungen die Kupplungseffizienzen quantifiziert und das Protokoll entsprechend angepasst. Anschließend wurden passende Reaktionsbedingungen zur vollständigen Sulfatierung der aufgebauten Glykooligo(amidoamine) auf der Festphase gefunden. Die Syntheseroute wurde dann zur Herstellung von drei Klassen von sGAG-Mimetika genutzt. Zur Herstellung zweier global sulfatierter di- bzw. octavalenter Strukturen wurde ein Rückgrat aus funktionalen und *spacer* Bausteinen aufgebaut, die Alkin-Seitenketten der funktionalen Bausteine anschließend über CuAAC mit Acetyl-geschütztem GlcNAc-Azid umgesetzt und die Kohlenhydrate nach Deacetylierung sulfatiert. Zur Synthese zweier segmentweise sulfatierter Strukturen, die im Wechsel zwei unsulfatierte und zwei sulfatierte GlcNAc-Einheiten tragen, wurde die Abfolge der Syntheseschritte variiert, sodass nach Einführung zwei Alkin-funktionalisierter Bausteine jeweils die CuAAC mit Acetyl-geschütztem oder ungeschütztem GlcNAc-Azid durchgeführt wurde. Bei der anschließenden Sulfatierung wurden so nur die freien Hydroxylgruppen umgesetzt. Nach anschließender Deacetylierung konnten nun durch Bestrahlung Strukturen mit Segmenten sulfatierter und unsulfatierter Kohlenhydrate erhalten werden. Eine weitere Variation der strukturellen Parameter der Glykooligo(amidoamine) wurde durch die Einführung rigider Oligoprolin-Einheiten beim Aufbau des Rückgrats realisiert, wodurch eine global sulfatierte Oligoprolin-Hybrid-Struktur erhalten wurde.



Synthese segmentweise-sulfatierter Präzisions-Glykomakromolekülen als sGAG-Mimetika mittels Festphasensynthese



sGAG-mimetische Zielstrukturen



Koagulationsassay

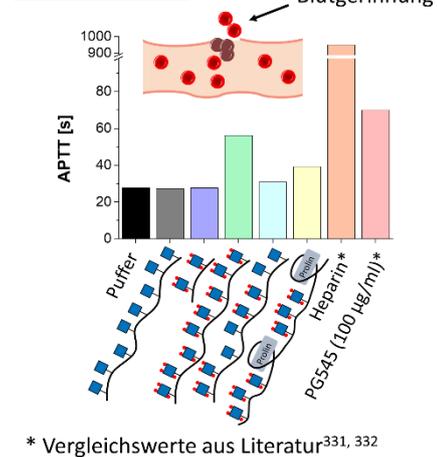


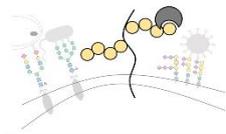
Abbildung 56: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 1: Etablierung eines Protokolls zur Festphasensynthese global und segmentweise sulfatierter Glykooligo(amidoamine); Übersicht über die hergestellten Zielstrukturen; Ergebnisse der Koagulationsassays unter Verwendung der synthetisierten Verbindungen.

Wie Arbeiten von Soria *et al.* gezeigt haben, können sulfatierte Glykooligo(amidoamine) die Inhibition von Virusinfektionen ermöglichen. Ein elementarer Faktor bei solchen Untersuchungen stellt die Spezifität dar. Nebenwirkungen durch Kreuzreaktivitäten, wie die ungewollte Beeinflussung der Blutgerinnung, spielen hier eine wichtige Rolle. Daher wurden die hergestellten Strukturen zum ersten Mal auch auf ihre antikoagulativen Eigenschaften untersucht. Generell können sGAG-Mimetika Antithrombin aktivieren, welches wiederum Gerinnungsfaktoren inhibiert und somit die Blutgerinnung verzögert. Daher wurde der Einfluss der Strukturen auf die APTT (englisch: *activated partial thromboplastin time*) untersucht, wobei die Aktivität der Strukturen hierbei gering war und mit der Zahl der Sulfatgruppen anstieg. Insbesondere für die global sulfatierte octavalente Struktur konnte dementsprechend eine Verdopplung der APTT bei einer Konzentration von 250 µg/ml gemessen werden. Im Vergleich zu Heparin und dem Pentasaccharid Arixtra® war die Beeinflussung der APTT jedoch gering und lag zudem in einem ähnlichen Bereich wie für das bereits in klinischen Studien als gut verträglich eingestufte sGAG-Mimetikum PG545. Es ist somit davon auszugehen, dass es bei einer Anwendung der präsentierten Strukturen im

getesteten Konzentrationsbereich nicht zu einer antikoagulativen Kreuzreaktivität käme. Die Entschlüsselung des sogenannten *sulfation code* und die Studie des Einflusses spezifischer struktureller Parameter auf die Interaktionen von natürlichen und synthetischen sGAGs und sGAG-Mimetika mit Proteinen können die Grundlage für die Entwicklung von therapeutisch anwendbaren Strukturen bilden. Die Einführung der Sulfatierung auf der Festphase erlaubt in diesem Kontext die Synthese sequenz-definiert variierbarer Strukturen und somit einer neuen Klasse von sGAG-Mimetika, die es ermöglichen kann, Erkenntnisse zur Struktur-Wirkungs-Beziehung in der Interaktion beispielsweise mit Viren zu erhalten. Die Etablierung der Sulfatierung auf der Festphase bietet zudem die Möglichkeit, weitere Variationen der hergestellten Strukturen durchzuführen, da die Festphasensynthese als modularer Ansatz um weitere Reaktionsschritte ergänzt werden kann.

Dies wurde im zweiten Teil der Arbeit ausgenutzt, um die Präsentation von sGAG-Mimetika auf liposomalen Vesikeln und natürlichen Membranen zu ermöglichen (Abbildung 57). Viren nutzen sGAGs als Ankerpunkte auf der Zellmembran während des Infektionsprozesses, daher ist die Betrachtung solcher Interaktionen auf dynamischen Membransystemen von großem Interesse, und die hergestellten Strukturen wurden zur Ansteuerung von Virus-Membran-Interaktionen genutzt. Zunächst wurde die Funktionalisierung von Vesikelmembranen mit Fondaparinux-tragenden Glykolipiden untersucht. Die Anbringung des sGAG-Pentasaccharid Fondaparinux an Lipide stellte eine große Herausforderung dar. Gründe liegen vermutlich in der großen Polarität und dem hohen sterischen Anspruch des Liganden, da dies die Lösungsmittelwahl erschwert bzw. eine optimale Zugänglichkeit der reaktiven Gruppen der zu konjugierenden Lipide erfordert. Durch die direkte Konjugation der Carboxylgruppen des Fondaparinux an die Amin-Funktionalitäten von Lipiden auf der Membran von vorformulierten Liposomen konnten diese Voraussetzungen letztendlich erfüllt und Fondaparinux-funktionalisierte Liposomen erhalten werden. Nachteil dieser Methode war es, dass eine Lipidmischung erhalten wurde, für die der Anteil des Fondaparinux-Lipid-Konjugates unbekannt war. Um einen weiteren Ansatz zur Ligand-Lipid-Konjugation zu testen, wurde im nächsten Schritt, in Zusammenarbeit mit Luca-Cesare Blawitzki, die Verwendung der Festphasensynthese zur Herstellung zwei verschiedener Klassen von Glykooligo(amidoaminen) getestet. Der Einsatz der Festphasensynthese zur Anbringung von Membranankern bot den großen Vorteil, dass unumgesetzter Membrananker direkt durch Waschen abgetrennt werden konnte. Durch Aufreinigung der Strukturen, nach deren Abspaltung mittels Dialyse, konnten zudem auch die Oligomere ohne Membrananker entfernt werden, da bei einem ausreichend hohen MWCO nur die funktionalisierten Strukturen in Form von Aggregaten in der Dialysekammer verbleiben. Für die Synthese sulfatierter Mannose-funktionalisierter Oligo(amidoamine) wurde das im vorherigen Kapitel etablierte Protokoll weiterentwickelt. Nach Aufbau des Rückgrats konnten dessen Seitenketten durch CuAAC mit Mannoseazid und der N-Terminus durch Anbringung eines Membranankers, in diesem Fall Cholesterol oder auch ein Lipidmimetikum bestehend aus einem polaren Kopf und zwei unpolaren Alkylketten, dekoriert werden. Zudem wurde eine orthogonale Funktionalisierung des Rückgrats mit Fluoreszenzmarkern durchgeführt, wobei die Reihenfolge der Funktionalisierungsschritte je nach Anspruch der Reaktanden variiert werden konnte. Nach Sulfatierung, Abspaltung durch Bestrahlung und Aufreinigung durch Dialyse wurden so vier

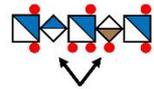
sulfatierte Mannose-funktionalisierte Glykomakromoleküle erhalten, die zur Studie von Protein-Membran-Interaktionen genutzt werden können.



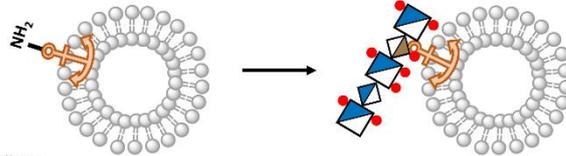
Synthese und Studie von membranverankerten sGAG-Mimetika

Grafting-to mit Fondaparinux

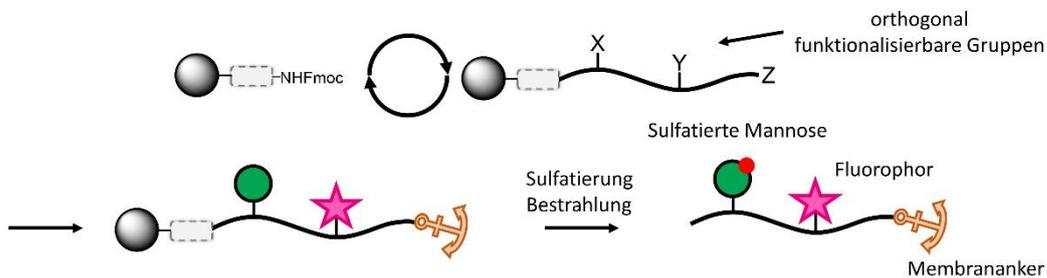
sGAG-Pentasaccharid: Fondaparinux



Carbonsäuren von Glucuron- und Iduronsäure



Festphasensynthese zur Herstellung Membrananker-tragender Glykomakromoleküle



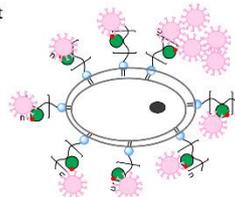
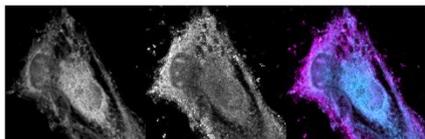
Erste Studien zu Virus-Membran-Interaktionen

A) Membranfarbstoff B) HPV16-Farbstoff C) Übereinandergelegt



→ Durch *Grafting to*-Ansatz
Fondaparinux-funktionalisierte **GUVs**
→ HPV-VLPs binden

A) Rhodamin-Polymer B) MCPyV-Farbstoff C) Übereinandergelegt



→ erste Versuche mit sGAG-Polymeren, die
strukturell analog zu sGAG-Oligomeren via
Festphasensynthese erhalten wurden
→ Zellmembrandekoration
→ MCPyV-VLPs binden

Abbildung 57: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 2: Fondaparinux-Funktionalisierung von Liposomen durch *Grafting-to*-Ansatz; Entwicklung einer Festphasensyntheseplattform zur Herstellung von Membrananker-tragenden sGAG-Oligo(amidoaminen); Erste Studien zur Verwendung Membrananker-tragender sGAGs- und sGAG-Mimetika zur Dekoration von GUVs und Zellen sowie die Untersuchungen der VLP-Anbindung an die funktionalisierten Membranen.

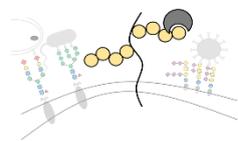
Für die Synthese Fondaparinux-funktionalisierter Oligo(amidoamine) musste die Synthesestrategie modifiziert werden, da die Anbringung des Fondaparinux auf der Festphase nicht erfolgreich war. Stattdessen wurden Membrananker-tragende, Fluoreszenz-markierte Strukturen in Lösung mit Fondaparinux funktionalisiert. Wie schon zuvor, stellte die Konjugation des Fondaparinux auch hier eine anspruchsvolle Reaktion dar, und die Analytik der erhaltenen Strukturen wurde durch deren amphiphile Eigenschaften erschwert. Da die Umsetzung der Fondaparinux-Funktionalisierung unvollständig war, konnten über diese Syntheseroute Produktgemische, die Cholesterol bzw. ein Etherlipid als Membrananker tragen, erhalten werden, die dennoch testweise für die Dekoration von Membranen mit Fondaparinux in Virus-Membran-Studien eingesetzt werden können. Insbesondere bei der Verwendung von Kohlenhydrataziden bietet die Festphasensynthese den Vorteil der

einfachen Isolation Membrananker-tragender Glykooligo(amidoamine) sowie die Möglichkeit zur Variation des Membranankers und der Rückgrat-Funktionalisierung. Die vorgestellten Synthesemethoden können somit auch in Zukunft als Synthesepattform für Membrananker-tragende Glykooligo(amidoamine) dienen. Die mögliche Anwendung der erhaltenen Strukturen wurde mit Hilfe der Fondaparinux-funktionalisierten Lipidmischung sowie durch Verwendung von sulfatierten Membrananker-tragenden Mannosepolymeren, deren Synthese nicht Teil dieser Arbeit war, die jedoch analog zu den vorgestellten Glykooligo(amidoaminen) synthetisiert und funktionalisiert wurden, in ersten Studien aufgezeigt. Hier konnten die verwendeten Verbindungen zur Funktionalisierung von GUVs (englisch: *giant unilamellar vesicles*) und Zellen genutzt werden. Es wurde die Anbindung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) des HPV16 an Fondaparinux- sowie Polymer-funktionalisierte GUVs gezeigt. Im Gegensatz dazu banden MCPyV-VLPs lediglich an die Polymer-tragenden Vesikel. Als erste Studie zu möglichen *de novo Glycocalyx Engineering* Experimenten konnte eine Polymer-Dekoration von Zellen erzielt werden, die zu einer vermehrten Anbindung von MCPyV-VLPs führte. Testweise wurde zudem für ein Membrananker-tragendes Glykooligo(amidoamin) der erfolgreiche Einbau in GUVs nachgewiesen. Die präsentierten Ergebnisse zeigen somit eindrücklich die Möglichkeiten dieses Systems zur Studie von Virus-Membran-Interaktionen auf. In weiteren Arbeiten werden nun auch die anderen synthetisierten Strukturen, sowohl inkorporiert in GUVs als auch in Zellmembranen, untersucht werden, um Einblicke in Struktur-Wirkung-Beziehungen zu erzielen. Auch eine Verwendung segmentweise sulfatierter Strukturen, die mit der neu etablierten Syntheseroute aus Kapitel 1 erhalten werden können, ist dabei möglich.

Im letzten Teil der Arbeit wurde nun das Prinzip der Ligand-Membranpräsentation zur Ansteuerung von Proteinen auf ein weiteres System übertragen. Es wurden heteromultivalente Glykooligo(amidoamine) mittels Festphasensynthese synthetisiert und zum ersten Mal deren Konjugation an Lipide realisiert. Die Inkorporation der erhaltenen Strukturen in Liposomen und die Verwendung verschiedener NMR-Methoden ermöglichte die Untersuchung der erhaltenen Liganden in der Interaktion mit Galektin-1 (Gal-1) und Galektin-3 (Gal-3) im dynamischen, membranverankerten Zustand (siehe Abbildung 58). Dies war so zuvor für die verwendeten Liganden nicht möglich und ist insbesondere für Galektine, die einen wichtigen Teil ihrer biologischen Funktion durch multivalente Prozesse auf der Glykokalyx unter Einbeziehung mehrerer Proteine und Glykane ausüben, von großem Interesse. Die Studien hierzu wurden in Zusammenarbeit mit Kooperationspartner*innen am Institut CICbioGUNE in Derio (Spanien) unter der Leitung von Prof. Dr. Jesús Jiménez-Barbero durchgeführt. Durch die Wahl der NMR-Methoden konnten zudem zuvor unaufgeklärte strukturelle Parameter der Interaktion entschlüsselt werden. In vorangegangenen Studien von Freichel *et al.* zu Gal-1 und Gal-3 war ein bindungsverstärkender Effekt sowohl durch die multivalente Präsentation homomultivalenter Liganden auf Liposomen als auch durch die Einführung zusätzlicher aromatischer Rückgratfunktionalisierungen an Laktose-tragende Oligo(amidoamine) zum Erhalt heteromultivalenter Strukturen beobachtet worden. Diese beiden Strategien wurden nun kombiniert. Es wurden insgesamt sechs homo- und heteromultivalente Oligo(amidoamine) mit einem freien *N*-Terminus hergestellt, wobei als zusätzliches Motiv zur Funktionalisierung *p*-Aminobenzolsulfonsäure verwendet wurde. Anschließend wurden die erhaltenen Strukturen an NHS-aktivierte PEG-DSPE-Lipide

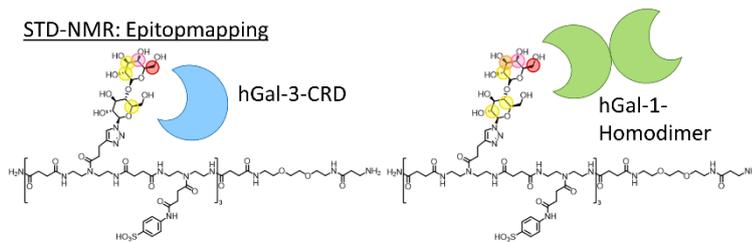
Zusammenfassung und Ausblick

konjugiert. Die erhaltenen Konjugate wurden zur Herstellung Ligand-funktionalisierter Liposomen genutzt, die als Zellmimetika in ihrer Interaktion mit Gal-1 und Gal-3 untersucht werden konnten. Es wurden zunächst NMR-Studien von Gal-3 (hGal-3-CRD) und Gal-1 (hGal1) mit den Oligo(amidoaminen) ohne Lipid-Membrananker in Lösung durchgeführt. Die STD-NMR-Experimente lieferten bisher fehlende Informationen zu den strukturellen Parametern der Interaktion und zeigten überraschenderweise keine Beteiligung der *p*-Aminobenzolsulfonsäure an der Interaktion mit der Bindungstasche der beiden Galektine. Die über ^1H - ^{15}N -HSQC-Experimente beobachtete CSP (englisch: *chemical shift perturbation*) für einen heteromultivalenten Liganden in Lösung mit Gal-3 zeigte eine verstärkte Interaktion im Vergleich zu freier Laktose, was auf das Auftreten multivalenter Effekte bei der Bindung des Galektins hinweist. Für die Interaktion des heteromultivalenten Liganden mit Gal-1 wurde unerwarteterweise eine Verminderung der Signale beobachtet, was sich durch die Entstehung supramolekularer Komplexe erklären lässt.



Homo- und heteromultivalente Liganden und deren Präsentation auf Liposomen zur Ansteuerung von Galektinen

STD-NMR: Epitopmapping



Zusätzlich: Cryo-EM und Molekuldynamik-Simulationen
→ mögliche Interaktionsmechanismen

^1H - ^{15}N -2D-HSQC-NMR mit Ligand-funktionalisierten Liposomen

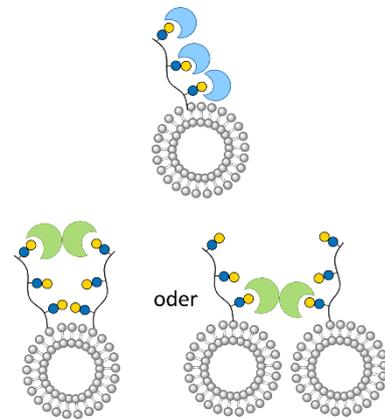
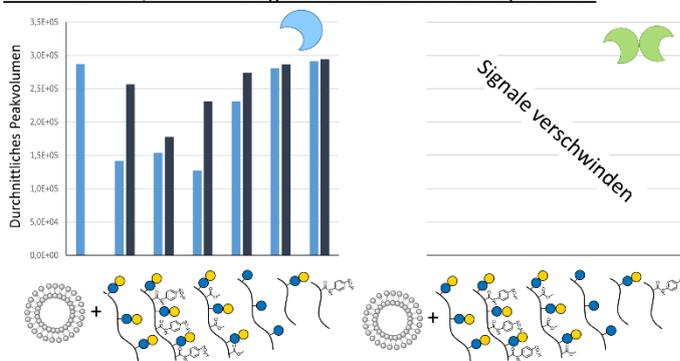


Abbildung 58: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 3: Epitopmapping durch STD-NMR; Signalreduktion beobachtet in ^1H - ^{15}N -2D-HSQC-NMR-Experimenten; Cryo-EM- und MD-Simulationen zur weiteren Entschlüsselung intermolekularer Wechselwirkungen.

Um darüber hinaus auch die Ligand-funktionalisierten Liposomen untersuchen zu können, wurden erneut ^1H - ^{15}N -HSQC-Studien durchgeführt. Für Gal-3 wurde hierbei eine Signalreduktion sowie das Auftreten einer CSP beobachtet. Beides zeigt die starke Interaktion des Proteins mit den Liganden auf der Liposomoberfläche, wobei die Spezifität der Bindung über Kontrollexperimente sowie durch Messungen unter kompetitiven Bedingungen nachgewiesen werden konnte. Vergleiche der verschiedenen Liganden zeigten eine stärkere Interaktion des trivalenten im Vergleich zum homovalenten Laktose-funktionalisierten Oligo(amidoamin), und zudem konnte für den heteromultivalenten Liganden die insgesamt stärkste Interaktion beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Ergebnissen

von Freichel *et al.*, lässt sich aber, wie die STD-Messungen zeigten, nicht wie vermutet durch eine Interaktion der *p*-Aminobenzolsulfonsäure mit der CRD des Lektins begründen. Eine mögliche Erklärung ist, dass die aromatischen Funktionalitäten die konformativen Eigenschaften des Liganden beeinflussen. Es ist möglich, dass die aromatischen Einheiten der Struktur über π - π - sowie π -Anion-Interaktionen miteinander interagieren und sich zusammenlagern, wodurch wiederum die Laktose-Einheiten des Liganden nach außen gedrängt werden und somit deren Zugänglichkeit für das Protein verbessert wird. Für die Ligand-funktionalisierten Liposomen bei der Interaktion mit Gal-1 konnte keine klassische CSP beobachtet werden, da die Signale vollständig verschwanden, was auf eine starke Interaktion und erneut auf das Auftreten supramolekularer Komplexe hindeutet. Der Effekt ist somit noch einmal drastischer als für die Liganden in Lösung. Allgemein kann die Entstehung solcher Aggregate durch die dynamische Präsentation der Liganden auf der Liposommembran begünstigt werden, was erneut die Bedeutung des verwendeten liposomalen Systems unterstreicht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der NMR-Experimente konnten in Cryo-EM-Aufnahmen für Ligand-funktionalisierte Liposomen mit Gal-3 bzw. Gal-1 elektronendichte Bereiche zwischen einzelnen Liposomen beobachtet werden, wobei diese für Gal-1 vermehrt auftraten. Sowohl die beobachtete Signalreduktion für Gal-3 bzw. das Verschwinden der Signale für Gal-1 als auch die Cryo-EM-Aufnahmen lassen sich dadurch erklären, dass simultane Anbindungen mehrerer Proteine an einen oder benachbarte Liganden auftreten. Hierbei unterscheidet sich Gal-1 von der verwendeten Gal-3-CRD, da es als Homodimer vorliegt und somit eine Verbrückung von verschiedenen Liganden oder sogar Liposomen und so die Entstehung supramolekularer Komplexe ermöglichen kann. Es wurden die entsprechenden Situationen mittels *full atom* Molekulardynamik-Simulationen untersucht. Dazu wurden die Anbindung von drei Gal-3-CRDs an einen einzelnen trivalenten membranverankerten Liganden und die Anbindung eines Gal-1-Homodimers an zwei benachbarte Liganden auf derselben Membran simuliert. Die Berechnungen zeigten, dass solche Interaktionen möglich sind, und untermauern somit die vorgestellten Erklärungen zu den ablaufenden Protein-Ligand-Interaktionen. Die Kombination verschiedener Methoden konnte zur Aufschlüsselung der ablaufenden Interaktionen von Gal-1 und Gal-3 mit Ligand-funktionalisierten Liposomen als Zellmimetika genutzt werden. Insbesondere für die Durchführung von NMR-Studien, die eine wichtige Methode zur Untersuchung von Ligand-Protein-Interaktionen darstellen, ist die Verwendung von Liposomen und somit die Betrachtung einer Situation, die der auf der Glykokalyx in höherem Maße ähnelt, von großer Bedeutung und konnte durch das verwendete System realisiert werden.

Insgesamt zeigen die vorgestellten Arbeiten die Herausforderungen und entsprechenden Lösungswege bei der Synthese definierter Liganden und bei deren Präsentation auf Membranen. Zunächst konnte ein Festphasensyntheseprotokoll erarbeitet werden, das es erlaubt, sequenz-definiert sulfatierte Glykooligo(amidoamine) als sGAG-Mimetika herzustellen. Das entsprechende Protokoll wurde dann weiterentwickelt und so die Dekoration von Membranen mit sGAG-Mimetika und die Studie von Virus-Membran-Interaktionen ermöglicht. Das Prinzip, definierte Liganden auf Membranen zur Ansteuerung von Proteinen zu nutzen, wurde dann im letzten Kapitel auf heteromultivalente Liganden zur Ansteuerung von Galektinen übertragen, wobei, durch die Verwendung von NMR-Methoden, neue Aspekte bei der Studie von Protein-Membran-Interaktionen betrachtet werden konnten.

5 Experimentaltteil

5.1 Materialien

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. 4-(4-[1-(9-Fuorenylmethyloxycarbonylamino)ethyl]-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butansäure (Fmoc-Photo-Linker), Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) und Boc-L-Alanin-OH wurden von Iris Biotech erworben. Dioxan und Pyridin wurden von VWR erworben. CuSO₄ Pentahydrat, Piperidin, Natriummethoxid, *p*-Anisaldehyd und Triisopropylsilan (TIPS) wurden von Acros Organics erworben. Natriumdiethyldithiocarbamat wurde von Alfa Aesar erworben. *N,N*-Dimethylformamid (DMF, für die Peptidsynthese) wurde von Biosolve erworben. *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) wurde von Carl Roth erworben. Acetonitril (ACN), Ethylacetat, Hexan und Dichlormethan (DCM) wurden von Fischer Scientific erworben. Diethylether wurde von Honeywell erworben. Rhodamin B wurde von TCI Chemicals erworben. DMTMM (4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid) wurde von Fluorochem erworben. Fmoc-Lys(Boc)-OH und *N*_α,*N*_β-di-Fmoc-L-2,3-diaminopropionsäure (DAP) wurden von BLD Pharma erworben. Fmoc-Lys(Dde)-OH wurde von Carbosynth erworben. Amberlite™ IR120 H-Form, Boc-β-Alanin-OH, Cholesterol, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Hydrazinhydrat, Methanol (MeOH), Myristinsäure, Natriumascorbat, PBS-Puffer-Tabletten, Schwefeltrioxid Trimethylaminkomplex (TMA*SO₃) und Tetrahydrofuran wurden von Sigma-Aldrich erworben. *N*-[*N'*-(Succinimidylxyglutaryl)aminopropylpolyoxyethylenoxycarbonyl]-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin Natriumsalz = SUNBRIGHT DSPE-020GS (DSPE-PEG-NHS) und DSPC (1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, COATSOME MC-0808®) wurden von NOF Europe erworben. 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DPPE) wurde von Avanti Polar Lipids erworben. 4-Aminobenzolsulfonsäure wurde von J&K erworben. Lithiumhydroxid wurde von PanReac AppliChem erworben. *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) wurde von Abcr erworben. TentaGel® S NH₂ Harz und TentaGel® S Rinkamid (RAM) Harz wurde von Rapp Polymere erworben. Macrosep® Advance Zentrifugaleinheiten mit einer Omega™ Membran von Pall wurden über VWR erworben. Reaktionen wurden mittels analytischer Dünnschichtchromatographie (DC) auf Merck Silicagel 60 F254 Platten verfolgt und mit Anisaldehyd- oder Ninhydrinlösungen angefärbt. Slyde-A-Lyzer™ Dialysekassetten wurden von Thermo Scientific erworben. Spectra/Por Float-a-Lyzer G2 Einheiten mit einem MWCO von 100-500 g/mol und einem Volumen von 10 ml wurden von Spectrum Labs erworben. Vivaspin 20-Maximum Spin Einheiten mit einem MWCO von 10 000 g/mol wurden von Sartorius erworben. Anionenaustauschharz AG1-X8 als Acetatform wurde von BioRad erworben. Fondaparinux-Natrium wurde in Form von Fertigspritzen mit Arixtra®-Injektionslösung mit einer Konzentration von 10 mg/0,8 ml von Aspen Pharma Trading Limited

erworben. (2-Azidoethyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid und Hepta-*O*-acetyl- β -laktosylazid wurden nach etablierten Protokollen synthetisiert und von Sophia Boden bzw. Patrick Konietzny dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.³⁷⁵ Ebenso wurden (2-Azidoethyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosid nach etablierten Protokollen bereits in Rahmen meiner Masterarbeit hergestellt und hier verwendet.^{241,376-377} Cholesterol-Azid und Etherlipid wurden nach einem veröffentlichten Protokoll synthetisiert und dankenswerterweise von Luca-Cesare Blawitzki zur Verfügung gestellt.³⁴⁶

Die Festphasensynthese wurde in Polypropylen-Spritzenreaktoren ausgestattet mit Polyethylenfritten und verschlossen mit Luer-Stoppfern von MultiSynthech GmbH durchgeführt. Die Sulfatierung wurde in Festphasen-Glasreaktoren (50 ml) ausgestattet mit einem PTFE-Absperrhahn mit T-Bohrung und einer Glasfritte mittlerer Porosität (CG-1866) von Chemglass Life Sciences erworben über Dunn Labortechnik durchgeführt.

5.2 Analytische Methoden und verwendete Geräte

Kernspinresonanzspektroskopie (englisch: Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR))

¹H-NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance III 600 gemessen. Die chemischen Verschiebungen wurden für alle NMR-Spektren in Delta (δ) in *parts per million* (ppm) angegeben. Das restliche, nicht deuterierte Lösungsmittel wurde als interner Standard mit $\delta = 4,79$ für H₂O verwendet. Multiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt: Singulett, s; Dublett, d; Triplett, t; Multiplett, m.

Umkehrphasen Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (englisch: reversed phase - high performance liquid chromatography (RP-HPLC-MS))

Analytische RP-HPLC-MS-Messungen wurden mit der Agilent Technologies 6120 Serie gekoppelt mit einem Agilent Quadrupol-Massenspektrometer mit einer Elektrospray-Ionisationsquelle (ESI), die in einem *m/z*-Bereich von 200 bis 2000 arbeitet, durchgeführt. Alle Messungen wurden mit den Lösungsmitteln A: 95% H₂O, 5% ACN, +0,1% Ameisensäure und B: 5% H₂O, 95% ACN, +0,1% Ameisensäure gemessen. Die angezeigten relativen Reinheiten wurden durch Integration des UV-Signals mit der OpenLab ChemStation-Software für LC/MS von Agilent Technologies bestimmt. Das UV-Signal wurde durch einen auf 214 nm eingestellten Wellenlängendetektor detektiert.

High resolution ESI Massenspektrometrie (HR-ESI/MS)

HR-ESI/MS-Spektren wurden auf einem UHR-QTOF maXis 4G (Bruker Daltonics) gemessen.

Elementaranalyse

Das Verhältnis von Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel wurde mit Hilfe eines Vario Micro Cube (Analysensysteme GmbH) bestimmt.

Matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight - mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)

Experimentaltteil

MALDI-TOF-MS Messungen wurden mit einem Bruker MALDI-TOF Ultraflex I System unter Verwendung, der jeweils angegebenen Matrix, durchgeführt.

UV-Vis Spektroskopie

UV-Vis Spektroskopie wurde mit einem mit Zweistrahltechnik ausgestattetem Specord® 210 Plus Spektrometer von Analytik Jena AG mit Quartzglasküvetten durchgeführt. Das Instrument wurde durch die Win ASPECT PLUS Software gesteuert.

UV-Bestrahlung

Die UV-Bestrahlung der Proben erfolgte mit einem UV-LED-Spot mit einer Wellenlänge von 365 nm und einer maximalen Bestrahlungsstärke von 950 mW/cm², betrieben mit einer LEDControl, beides von Opsytec Dr. Gröbel.

Gefriertrocknung

Die Lyophilisierung wurde mit einem Alpha 1-4 LD plus Instrument von Martin Christ Freeze Dryers GmbH bei -42 °C und 0.1 mbar durchgeführt.

5.3 Generelle Methoden

Methoden zur Bestimmung des Sulfatierungsgrades

Zur Bestimmung des Sulfatierungsgrads (DS) wurden zwei verschiedene Methoden angewandt.

a) DS über ¹H-NMR

Das dem Triazol-Proton zugeordnete Signal wurde als Referenz verwendet und auf den erwarteten Wert gesetzt. Dann wurden die Signale, die den anomeren Protonen für den sulfatierten (downfield) bzw. den unsulfatierten (upfield) Zucker zugeordnet werden können, integriert und das Verhältnis wurde zur Berechnung des Sulfatierungsgrades verwendet.

b) DS über Elementaranalyse

Der Sulfatierungsgrad wurde durch Verhältnisberechnungen für die experimentellen und theoretischen Werte bestimmt. Kurz zusammengefasst, wurde das S/C-Verhältnis für die experimentell gemessenen Werte und für die theoretischen Werte für ein Molekül mit einem Sulfatierungsgrad von 100 % berechnet. Die erhaltenen Werte wurden dann als Verhältnisse von experimentellem zu theoretischem S/C ausgedrückt. Das Gleiche wurde für die S/N-Verhältnisse gemacht. Beide erhaltenen Werte wurden gemittelt, um den Sulfatierungsgrad zu erhalten. Diese Methode wurde angewandt, da die Proben sehr hygroskopisch waren, was zu verringerten Werten für C/N/S und erhöhten Werten für H/O führte.

Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (englisch: *activated partial thromboplastin time* (APTT))

Glykooligomere bzw. Heparin als Standard wurden in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH = 7,4) in einer Konzentration von 1650 µg/l bzw. 2750 µg/ml gelöst, und 270 µl der

Lösungen wurden zu 2,7 ml Citrat-stabilisiertem venösem menschlichem Blut hinzugefügt, um Endkonzentrationen von 150 bzw. 250 µg/ml zu erreichen. Zur Herstellung einer Negativkontrolle wurden 270 µl PBS zugegeben. Die Proben wurden zentrifugiert und die APTT wurde für das erhaltene Humanplasma bestimmt. Die Proben wurden vom Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf mit einem Sysmex CS 5100 System (Siemens Healthineers, Deutschland) analysiert.

DLS- und Zetapotentialmessung

Die Messung der DLS und des Zetapotentials wurden an einem Zetasizer Nano ZS von Malvern Pananalytical durchgeführt. Die DLS-Proben wurden in Polystyrolküvetten von Sarstedt vermessen. Für die Zetapotentialmessungen wurden als Küvette die Kapillarzellen DTS 1070 verwendet und zur Datenverarbeitung die Zetasizer-Software.

Messeinstellungen Zetapotential: Lösungsmittel: T = 25,0 °C, Viskosität: 0,8872 cP, Brechungsindex 1,330, Dielektrizitätskonstante 78,5; Model: Smoluchowski, Zelltyp: DTS 1070; Messung Minimum runs: 10, Maximum runs: 100; Analysis Model: General purpose

Messeinstellungen DLS: T 25,0 °C, Viskosität: 0,8872, Brechungsindex: 1,330; Zelle: ZEN0040; Messwinkel: 173° Backscatter, Zahl der Messungen: automatisch.

Mini-Extruder Set

Zur Extrusion der Liposomen wurde das Mini-Extruder Set von Avanti Polar Lipids verwendet zusammen mit Hamilton-1000 µl-Spritzen und Polycarbonatmembranen (Porengröße 0,1 und 0,2 µm) ebenfalls von Avanti Polar Lipids.

Untersuchung der Anbindung von Virus-VLPs und GUVs und Zellen

Für die Formulierung der GUVs mit Fondaparinux wurde Lipidmischung **6** (DPPE: 1,799 µmol, DSPC: 0,901 µmol, Cholesterol: 0,300 µmol; Molverhältnis 60/30/10) in 60 µl Chloroform/Methanol (3/1) gelöst und mit 4 µl einer Lösung (1 mg/ml) des β-BODIPY FL C12-HPC Membranfarbstoffs (entspricht 4 µg bzw. 0,000446 µmol Lipid) gemischt. 5 µl der Mischung wurden zur Herstellung der GUVs auf einem Platindraht verdampft und die Mischung wurde in 300 mM Sucrose-Puffer durch Elektroformierung behandelt.

Für die Formulierung der GUVs mit Polymer wurde folgende Zusammensetzung verwendet: 97/2/1 Molprozent DOPC/Polymer/ β-BODIPY FL C12-HPC Membranfarbstoffs. Die GUVs wurden ebenso durch Elektroformierung hergestellt.

Für die Zellexperimente wurden GM-95 Zellen über Nacht auf 18-mm-Deckgläser in serumfreiem Medium aufgebracht. Am nächsten Tag wurden die Zellen über Nacht mit 5 µl (1 mg/ml) Polymerlösung in serumfreiem Medium behandelt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10 min auf Eis inkubiert, um die Endozytose zu stoppen, bevor Virus-ähnliche Partikel (5 µl, 0,2 mg/ml) zugegeben wurden, gefolgt von einem weiteren Inkubationsschritt für 20 min auf Eis. Die Zellen wurden fixiert und mit einem Spinning-Disk-Mikroskop untersucht.

Galektin-Proteinexpression und Aufreinigung

Die Expression und Aufreinigung der Galektine (hGal3-CRD und hGal1) wurde nach veröffentlichten Protokollen durchgeführt.³⁷⁸⁻³⁷⁹ In kurz zusammengefasst wurden um markiertes Protein zu erhalten 5 ml einer Übernacht-Kultur in einen Liter M9-Medium mit Antibiotikum und ¹⁵N-NH₄Cl (1 g) als Stickstoffquelle gegeben. Sobald die Kultur eine optische Dichte von 0,7 - 1,2 erreicht hatte, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-1-thio-galactopyranosid (IPTG) induziert und das Wachstum für 3 Stunden bei 37 °C fortgesetzt. Danach wurden die Zellen geerntet und in Säulenpuffer (PBS 1x, pH 7,2, 2 mM EDTA, 2 mM β-Mercaptoethanol /DTT, 0,1% NaN₃) resuspendiert und 1 mM PMSF wurde hinzugefügt, um die Spaltung durch Proteasen zu hemmen. Die Suspension wurde mit Ultraschall behandelt und der Rohextrakt durch Zentrifugation bei 35000 rpm für 30 min bei 4°C geklärt. Die lösliche Fraktion wurde auf eine voräquibrierte α-Lactose-Agarose-Harzsäule (Sigma-Aldrich) geladen und mit 50 ml Säulenpuffer gewaschen. Zur Elution der rekombinanten Proteine wurden 7 ml Elutionspuffer (150 mM α-Laktose in Säulenpuffer) benutzt. Die Proteinreinheit wurde durch SDS-PAGE überprüft und anschließend durch LC-MS bestätigt. Beide Galektine wurden vor ihrer Verwendung gründlich gegen PBS (pH 7,4) dialysiert, bis keine Laktose mehr vorhanden war.

Liposomherstellung für Galektinstudien

Phosphatidylcholin und konjugierte Glykomakromoleküle in Pulverform wurden jeweils in einer organischen Lösung (2/1 Chloroform/Methanol) gelöst. Die gewünschten Mengen Stammlösung wurden in ein Glasfläschchen überführt und das Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom verdampft und die Probe anschließend 2 Stunden lang unter Vakuum getrocknet. Der erhaltene Lipidfilm wurde dann mit dem gewünschten Puffer (PBS, pH 7,4) mittels Vortexen resuspendiert, um multilamellare Vesikel zu erhalten. Anschließend wurden die Proben 10 Gefrier- und Auftauzyklen unterzogen und mit einem Mini-Extruder durch Nucleopore-Filter mit einer Porengröße von 0,1 μm extrudiert. Es wurden unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser von 100 nm erhalten.

NMR-Studien zur Untersuchung von Galektinen

Alle Spektren wurden bei 298 K mit einem Bruker AVANCE 2 600 MHz-Spektrometer mit Standard-Dreikanalsonde (600 MHz) durchgeführt. Die ¹H-NMR-Resonanzen der Liganden wurden durch TOCSY (60 und 90 ms Mischzeit), NOESY (500 oder 600 ms Mischzeit) und HSQC-Experimente bestimmt. Die Liganden wurden in deuterierter phosphatgepufferter Kochsalzlösung bei einer Konzentration von 1 mM gelöst.

Für Sättigungstransfer-Differenz (STD)-Experimente wurden 40 μM hGal3-CRD oder Gal-1 (*full length*) in deuteriertem PBS vorgelegt und etwa 70 Äq. des Liganden hinzugefügt. Die *On-Resonance*-Frequenz wurde auf den aliphatischen Bereich (ca. 0,77 ppm) und die *Off-Resonance*-Frequenz auf -25 ppm eingestellt. Um die Sättigung des Proteins zu erreichen, wurde eine Serie von PC9-Pulsen einer Dauer von 25-50 ms mit einer Gesamtsättigungszeit

des Proteins von 2 s in einem 600-MHz-Spektrometer verwendet. Ein Spin-Lock-Filter (100 ms) wurde verwendet, um die NMR-Signale des Makromoleküls zu entfernen.

Zur Analyse der Bindung der Galektine an die Glykomakromoleküle auf den Liposomen wurden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren mit $50\ \mu\text{M}$ ^{15}N -hGal3-CRD und ^{15}N -hGal1 bei 298 K auf einem Bruker AVANCE 2 600 MHz mit einer Standard-Dreikanalsonde aufgenommen. Die CSP (englisch: *chemical shift perturbation*) und das Kreuzpeakvolumen wurden mit der Software CcpNmr Analysis 2.4.2 verfolgt.³⁸⁰

Berechnungsmethoden

Modellbildung

Eine POPC-Doppelschicht mit 422 Einheiten (ca. $120\ \text{Å}$ mal $120\ \text{Å}$) wurde mit dem CHARMM-GUI45-Membran-Builder erstellt. Ein einzelnes Glykolipid für die Galektin-3-Simulation und zwei Glykolipide für die Galektin-1-Simulation wurden manuell in die Membran eingebettet. Dies entspricht dem 29,8:0,2 mM-Verhältnis zwischen PC und Lac(1,3,5)-6-PEG-DSPE (**L1**), das bei der experimentellen Formulierung der Liposomen verwendet wurde. Der PEG-Linker ist 44 Einheiten lang und sorgt für einen Abstand von etwa $200\ \text{Å}$ zwischen den Laktosegruppen und der Membran. Die Galektine wurden an die Laktosegruppen angedockt. Die Ausgangskordinaten für Gal-3 und Gal-1 wurden aus veröffentlichten kristallographischen Strukturen (PDB ID 4R9C bzw. 1W6O) gewonnen.^{374,381}

Molekulardynamik-Simulationen

Die *all-atom* MD-Simulationen wurden mit AMBER 20³⁸² unter Verwendung des Kraftfelds ff14SB³⁸³ für Proteine, GLYCAM 06j-1³⁸⁴ für Glykane, Lipid14³⁸⁵ für Lipide und gaff2³⁸⁶ für die Linker und unter Verwendung periodischer Randbedingungen (PBC) durchgeführt. Die Membran-Glykolipid-Galektin-Modelle wurden in eine Wasserbox aus TIP3P³⁸⁷ Wassermolekülen abgesenkt und durch Zugabe von expliziten Na^+/Cl^- Gegenionen neutralisiert. Das System wurde 5.000 steilsten Abstiegs- und 5.000 konjugierten Gradienten-Geometrie-Optimierungsschritten unterzogen und dann entlang einer 100 ps-Simulation im NVT-Ensemble unter Verwendung des Langevin-Thermostats von 0 auf 300 K erhitzt.³⁸⁸ Es folgte eine 1-ns-Molekulardynamik-Simulation im NPT-Ensemble zur Anpassung der Wasserdichte. In beiden Simulationen wurde für alle Atome außer Wasser und Gegenionen eine harmonische Beschränkung von $10\ \text{kcal}/(\text{mol}\cdot\text{Å}^2)$ erzwungen. In einem weiteren Schritt wurden die Beschränkungen für die Lipiddoppelschicht entfernt, während die Beschränkungen für das Protein und das Glykolipid beibehalten wurden. Schließlich wurden alle Beschränkungen entfernt, damit sich das System 1 ns lang vollständig ausbalancieren konnte. Die Produktionssimulationen wurden für 100 ns im NPT-Ensemble mit anisotroper Skalierung und dem Berendsen-Barostat durchgeführt.³⁸⁹ Der Algorithmus SHAKE³⁹⁰ wurde für die Produktion mit einem Zeitschritt von 2 fs verwendet. Elektrostatische Fernwirkungen wurden mit der *particle mesh*-Ewald-Methode modelliert, wobei die Breite der nicht gebundenen "Haut" auf $5,0\ \text{Å}$ in Kombination mit einem *Cut-off* für nicht gebundene Wechselwirkungen von $10\ \text{Å}$ festgelegt wurde. Diese Option definiert die Mitglieder der Liste der Nichtgebundenen in den *particle mesh*-Ewald-Berechnungen und wird benötigt, um ein Anhalten des Codes zu verhindern, wenn sich die Größe und Dichte der

Membransimulationsboxen während der Äquilibration zu stark ändert.³⁹¹ Die Trajektorienanalyse wurde mit dem Tool cpptraj in AMBER durchgeführt.³⁹²

5.4 Synthesen

Die Synthese von TDS (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-triazatetra-14-decansäure), MDS (1-(9H-Fluoren-9-yl)-7-(4-methoxy-4-oxobutanoyl)-3,11-dioxo-2-oxa-4,7,10-triazatetra-14-decansäure) und EDS (1-(9H-Fluoren-9-yl)-3,14-dioxo-2,7,10-trioxa-4,13-diaza-17-heptadecansäure) wurde nach den bereits veröffentlichten Protokollen von Hartmann *et al.* durchgeführt.³⁹³ Dabei wurde die Synthese von MDS von Nils Schomann im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt.

Zur Benennung aller im Folgenden dargestellten Makromoleküle wurde die etablierte Nomenklatur nach Hartmann *et al.* verwendet. Für die sequenz-definierten Strukturen wird in Klammern zunächst die Position der jeweiligen Bausteine oder Funktionen angegeben, gefolgt von der Bezeichnung des jeweiligen Bausteins oder der Seitenkettenfunktion. Dies wird in aufsteigender Reihenfolge für alle Bestandteile des Moleküls durchgeführt. Am Ende wird zudem die Gesamtzahl der Bausteine/Funktionen angegeben und falls vorhanden als letztes die am *N*-Terminus angebrachte Struktur, beispielsweise der Membrananker, benannt. Für die Kohlenhydrat kann zudem in Klammern nach der Bezeichnung der Zuckereinheit die Position von vorhandenen Sulfatierungen, freien Hydroxylgruppen oder Acetylgruppen angegeben werden.

5.4.1 Festphasensynthese von sequenz-definierten Glykooligo(amidoaminen) als sGAG-Mimetika

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Reaktionen angelehnt an die bereits veröffentlichten Protokolle nach Hartmann *et al.* in Polypropylen-Spritzenreaktoren auf einem Schüttler durchgeführt und die angegebenen Reaktionsgrößen beziehen sich auf einen Ansatz von 0,025 mmol.^{92,241} Waschschritte wurden, sofern nicht anders beschrieben, fünfzehnmal und mit je 2 ml Lösungsmittel und im Falle von Wasser mit MilliQ-Wasser durchgeführt. Sofern der Fmoc-Photo-Linker verwendet wurde, wurde unter Lichtausschluss gearbeitet. Vor der Lagerung wurde das Harz mit DCM gewaschen.

Die unsulfatierten Strukturen **1** und **2** wurden entsprechend zuvor veröffentlichter Protokolle am TentaGel® S RAM Harz hergestellt.^{91,241,393} Alle andere Strukturen wurden unter Verwendung des unten beschriebenen Protokolls hergestellt, wobei für die unsulfatierten Strukturen **3** bis **5** ein Teil des Harzes vor der Sulfatierung abgetrennt und zur Abspaltung des unsulfatierten Produkts bestrahlt wurde.

Die Reihenfolge der Reaktionsschritte unterschied sich für die global bzw. segmentweise sulfatierten Glykooligomere. Für die global sulfatierten Strukturen wurde zunächst das

vollständige Rückgrat durch Wiederholung von Entschützungs- und Kupplungsschritten aufgebaut, dann das terminale Amin acetyliert, die Kohlenhydratazide über CuAAC eingeführt, deacetyliert und anschließend sulfatiert. Für die segmentweise sulfatierten Strukturen wurde nach der Kupplung zweier TDS-Bausteine zunächst durch CuAAC entweder geschütztes oder zuvor entschütztes GlcNAc-Azid eingeführt. Anschließend wurden die nächsten zwei TDS-Bausteine hinzugefügt und erneut eine CuAAC durchgeführt. Diese Schritte wurden bis zur Vervollständigung der gewünschten Sequenz wiederholt. Dann wurde die Sulfatierung der ungeschützten Kohlenhydrat-Einheiten durchgeführt, gefolgt von *N*-terminaler Fmoc-Entschützung, *N*-terminaler Acetylierung und Kohlenhydrat-*O*-Deacetylierung. Die Reaktionsbedingungen für alle Arbeitsschritte sind im Folgenden beschrieben.

Funktionalisierung des Harzes mit dem Fmoc-Photo-Linker

TentaGel® S NH₂ Harz (0.405 mmol) wurde in einen 20 ml Spritzenreaktor eingewogen und in 10 ml DMC für 30 min gequollen. Fmoc-Photo-Linker (3 Äq.) und PyBOP (3 Äq.) wurden in DMF (125 mmol/l) gelöst und DIPEA (20 Äq.) wurde hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung in den Spritzenreaktor aufgezogen und die Spritze für 3 h geschüttelt. Das Harz wurde dreimal mit je 5 ml DMF gewaschen und eine zweite Kupplung durchgeführt. Abschließend wurde das Harz jeweils fünfzehnmal mit 5 ml DMF und mit 5 ml DCM gewaschen und unter Hochvakuum getrocknet. Die Beladung wurde wie unten beschrieben bestimmt.

Harzvorbereitung

Zur Vorbereitung des Harzes wurde dieses in einen 5 ml Spritzenreaktor eingewogen (0,025 mmol) und in 2 ml DMC für 30 min gequollen. Anschließend wurde das Harz mit DMF gewaschen.

Fmoc-Abspaltung

Fmoc wurde durch Behandlung mit 2 ml einer 25%igen Piperidinlösung in DMF entfernt. Dafür wurde das Harz dreimal für je 10 min in der Lösung geschüttelt. Zwischen den einzelnen Entschützungsschritten wurde das Harz dreimal und zum Abschluss fünfzehnmal mit DMF gewaschen.

Bausteinakupplung

Der Baustein (5 Äq.) wurde zusammen mit PyBOP (5 Äq.) in DMF (1 ml) gelöst und DIPEA (20 Äq.) wurde hinzugegeben. Die Lösung wurde in den Reaktor aufgezogen und die Spritze für 1 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF gewaschen.

Acetylierung des *N*-Terminus

Um den *N*-Terminus zu acetylieren, wurde das Harz zweimal für 15 min mit je 2 ml Essigsäureanhydrid behandelt und danach mit DMF gewaschen.

Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC)

Das jeweilige Kohlenhydrat-Azid (2,5 Äq. pro Alkin) wurde in DMF (1 ml) oder im Falle von zuvor deacetyliertem β -D-GlcNAc-Azid in DMF/Wasser (1 ml, 9/1) gelöst. Separat wurden

Experimentaltteil

Lösungen von Kupfersulfat-Pentahydrat (50 mol% pro Alkin) und Natriumascorbat (50 mol% pro Alkin) jeweils in 0,15 ml Wasser angesetzt. Die Kohlenhydratlösung wurde gefolgt von der Natriumascorbat- und der Kupfersulfatlösung in die Spritze aufgezogen und diese über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde das Harz ausgiebig mit DMF, einer Natriumdiethyldithiocarbamatlösung (0,2 M) in DMF/Wasser (1/1), Wasser und DCM gewaschen, bis keine Färbung der Waschlösung mehr beobachtet werden konnte.

O-Deacetylierung auf der Festphase

Das Harz wurde zweimal für je 30 min mit 2 ml Natriummethoxidlösung in MeOH (0,2 M) behandelt.³¹⁹ Dazwischen wurde das Harz dreimal mit MeOH und abschließend fünfmal mit MeOH und zehnmal mit DMF gewaschen.

Sulfatierung

Die Sulfatierung wurde in 50 ml Festphasensynthesereaktoren aus Glas, ausgestattet mit einem PTFE-Hahn mit einer T-Bohrung und einer Glasfritte mittlerer Porosität, durchgeführt. Das Harz wurde mit trockenem DMF zehnmal gewaschen und anschließend wurde eine Lösung von TMA*SO₃ (50 Äq. pro Hydroxylgruppe) in DMF (8,65 ml/g) hinzugegeben. Die Mischung wurde zur Reaktion über Nacht bei 70°C gelagert. Anschließend wurde das Harz mit einer 10%igen Natriumacetatlösung in Wasser (10 Äq. bezogen auf TMA*SO₃) behandelt und fünfzehnmal mit Wasser, fünfzehnmal mit warmem DMF (70 °C), dreißigmal mit DMF (RT) und fünfzehnmal mit DCM gewaschen. Anmerkung: Um eine Desulfatierung zu verhindern, sollten längere Inkubationszeiten mit warmem DMF nach Entfernen der Reaktionslösung vermieden werden.

Abspaltung vom Harz – Fmoc-Photo-Linker

Das Harz wurde 30 min in DCM gequollen und anschließend mit ACN gewaschen und in ein Glasgefäß überführt. Das Harz wurde in einer Mischung von ACN und Wasser (1/1) suspendiert und unter einen LED-Spot platziert (365 nm). Anschließend wurde das Harz unter Schütteln für insgesamt 24 h bei einer Leistung von 15 % der maximalen Lampenleistung und einem Abstand von 3 cm von der Lampe, was in einer ungefähren Bestrahlungsstärke von 285 mW/cm² resultiert, bestrahlt. Der Bestrahlungsprozess wurde regelmäßig unterbrochen, um bereits abgespaltenes Produkt vom Harz durch Waschen mit ACN und Wasser abzutrennen und das Harz neu in DCM zu quellen. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend unter vermindertem Druck getrocknet.

Aufarbeitung – Ultrafiltrierung

Zur Aufarbeitung mittels Ultrafiltrierung wurden die Produkte in Wasser gelöst und zehnmal mit Macrosep® Advance Dialysezentrifugiereinheiten, die mit einer Omega™ Membran (MWCO = 1000 g/mol) ausgestattet sind, zentrifugiert. Anschließend wurden die finalen Produkte durch Gefriertrocknung der verbleibenden wässrigen Phase erhalten.

Fmoc-Ladungsbestimmung

a) Für die initiale Harzbeladung nach Funktionalisierung mit dem Fmoc-Photo-Linker

Drei Aliquots von je ungefähr 10 mg des getrockneten Harzes wurden exakt in drei separate Eppendorfgläser eingewogen. Die Proben wurden anschließend mit 1 ml einer 25%igen Piperidin-Lösung in DMF für 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Die UV-Absorption der überstehenden Lösung bei 301 nm wurde anschließend bei einer 20-fachen Verdünnung in Triplikaten gemessen. Die Beladung wurde mit Hilfe der untenstehenden Gleichung berechnet.

b) Für die *in-flow* Überprüfung der einzelnen Reaktionsschritte

Zu Beginn der Festphasensynthese wurde eine exakte Menge Harz in den Festphasenspritzenreaktor eingewogen. Bei jedem durchgeführten Fmoc-Entschützungs-schritt wurde das Harz mit exakt 3 ml der Piperidinabspaltlösung (25%ig in DMF) für 20 min geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung ausgestoßen und das Harz mit erneut 1 ml Abspaltlösung für 10 min behandelt. Die vereinigten Lösungen wurden um das 100-Fache verdünnt und die Absorption bei 301 nm wurde in Triplikaten gemessen. Die Beladung wurde über die untenstehende Gleichung bestimmt.

$$\text{Beladung in mmol/g: } L = \frac{A_{301} \cdot V \cdot d}{E_c \cdot w \cdot m}$$

L = Harzbeladung

A₃₀₁ = Absorption bei 301 nm

V = Volumen der Abspaltlösung

d = Verdünnung

E_c = Extinktionskoeffizient (7800 ml/(mmol*cm))

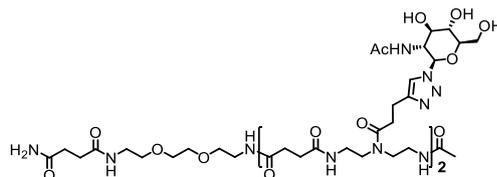
w = Küvettenbreite

m = Masse der eingewogenen Probe

O-Deacetylierung von 3,4,6-Tri-O-Acetyl-β-D-GlcNAc-Azid

Das O-acetylierte Kohlenhydratazid (1,0 g, 2,69 mmol) wurde in 100 ml einer Natriummethoxidlösung in Methanol (2 mg/ml) gelöst. Die Reaktionslösung wurde 30 bis 60 min gerührt und der Umsatz mittels Dünnschichtchromatographie mit 30/70 Ethylacetat/Hexan verfolgt. Nach der vollständigen O-Deacetylierung wurde Amberlite IR120 H⁺ Harz hinzugeben bis ein neutraler pH-Wert erreicht wurde, um die Reaktion zu quenchen. Das Harz wurde durch Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, um das Produkt zu erhalten.

(1)-EDS-(2-3)-GlcNAc-3, 1



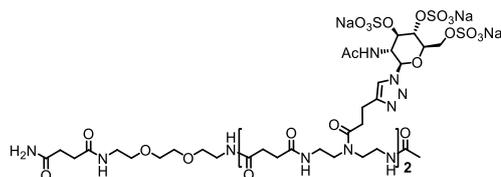
HR-MS kalk. für C₅₄H₈₉N₁₇O₂₁: [M+2H]²⁺ 656,8; gefunden 656,8. Ausbeute: 51,2 mg (78%).

RP-HPLC: (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C): Produkt eluiert mit dem Injektionspeak, Reinheit konnte nicht bestimmt werden.

Experimentaltteil

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 8,01-8,00 (m, 2H, Ar-H), 5,80 (d, $^3\text{J} = 9,7$ Hz, 2H, $\text{CH}_{\text{Anomer}}$), 4,26-4,22 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$), 3,95-3,92 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$), 3,86-3,66 (m, 12H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ (EDS), erhöhtes Integral (6H) verursacht durch PEG aus Harz), 3,63-3,60 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ (EDS)) 3,48-3,43 (m, 8H, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ (TDS)), 3,40-3,31 (m, 12H, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ (TDS und EDS)), 3,03-2,96 (m, 4H, $-\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (Seitenkette)), 2,80-2,76 (m, 4H $-\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (Seitenkette)), 2,60-2,40 (m, 12H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$), 1,93 (m, 3H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ (*N*-terminale Acetylgruppe)), 1,83 (m, 6H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ (*N*-Acetyl)), erhöhte Integration bei 2,06 wird verursacht durch Acetationen, die aus dem Anionenaustausch nach der TFA-Abspaltung stammen.

(1)-EDS-(2-3)-GlcNAc(3-6S)-3, 1S

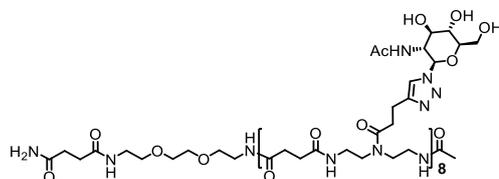


ESI-MS kalk. für $\text{C}_{54}\text{H}_{83}\text{N}_{17}\text{Na}_6\text{O}_{39}\text{S}_6$: $[\text{M}-6\text{Na}+2\text{H}]^{4-}$ 446,8; gefunden 447,0. Ausbeute: 20,0 mg (10%).

DS kalk. mittels $^1\text{H-NMR}$: 91%, kalk. mittels EA: 84%.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 8,02 (m, 2H, Ar-H), 6,01 (d, $^3\text{J} = 9,8$ Hz, 2H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$, anomeres Proton), 4,79 (m, 2H erwartet, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$, verdeckt durch HDO-Signal), 4,68 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$), 4,57 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$), 4,47 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$), 4,20 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$), 3,67 (s, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ (EDS)), 3,63-3,61 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ (EDS)), 3,49-3,28 (m, 20H, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ (TDS und EDS)), 3,08-2,93 (m, 4H, $-\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (Seitenkette)), 2,80-2,73 (m, 4H $-\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (Seitenkette)), 2,62-2,41 (m, 12H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$), 2,01-1,90 (m, 3H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ (*N*-terminale Acetylgruppe)), 1,89-1,72 (m, 6H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ (*N*-Acetyl)), zusätzliches Signal im Bereich 3,75 bis 3,65 verursacht durch PEG aus Harz.

(1)-EDS-(2,3,4,5,6,7,8,9)-GlcNAc-9, 2



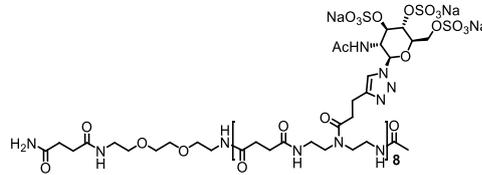
HR-MS kalk. für $\text{C}_{180}\text{H}_{287}\text{N}_{59}\text{O}_{69}$: $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 876,8; gefunden 876,8. Ausbeute: 153,2 mg (70%).

RP-HPLC: (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C): $t_{\text{R}} = 5,43$ min, bestimmte Reinheit: 92 %.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 8,00 (m, 8H, Ar-H), 5,81 (d, $^3\text{J} = 9,7$ Hz, 8H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$, anomeres Proton), 4,24 (m, 8H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$), 3,93 (m, 8H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$), 3,86-3,65 (m, 36H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ (EDS), erhöhtes Integral (6H) verursacht durch PEG aus Harz), 3,62-3,60 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ (EDS)) 3,52-3,40 (m, 32H, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ (TDS)), 3,39-3,26 (m, 36H, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ (TDS und EDS)), 3,02-2,90 (m, 16H, $-\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (Seitenkette)), 2,81-2,72 (m, 16H $-\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (Seitenkette)), 2,58-2,38 (m, 36H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$), 1,93 (m, 3H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ (*N*-terminale Acetylgruppe)), 1,82 (m, 24H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ (*N*-Acetyl)), erhöhte

Integration bei 2,06 wird verursacht durch Acetationen, die aus dem Anionenaustausch nach der TFA-Abspaltung stammen.

(1)-EDS-(2,3,4,5,6,7,8,9)-GlcNAc(3-6S)-9, 2S

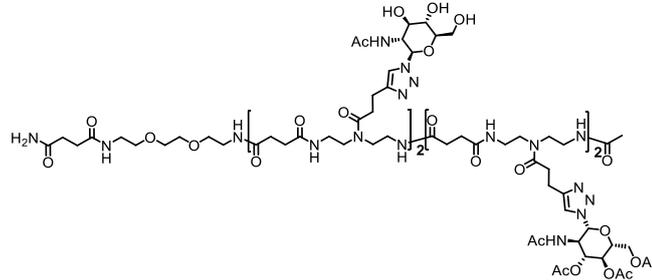


ESI-MS kalk. für $C_{180}H_{263}N_{59}Na_{24}O_{141}S_{24}$: $[M-14Na+5H]^{-9}$ 723,8; gefunden 724,7. Ausbeute: 50,25 mg (20%).

DS kalk. mittels 1H -NMR: 91%, kalk. mittels EA: 88%.

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 8,00 (m, 8H, Ar-H), 6,02 (d, $^3J = 9,9$ Hz, 8H, CH_{Pyranose} , anomeres Proton), 4,79 (m, 2H erwartet, CH_{Pyranose} , verdeckt von HDO-Signal), 4,68 (m, 8H, CH_{Pyranose}), 4,58 (m, 8H, CH_{Pyranose}), 4,47 (m, 8H, CH_{Pyranose}), 4,20 (m, 16H, CH_{Pyranose}), 3,67 (s, 4H, $-OCH_2CH_2O-$ (EDS)), 3,62-3,58 (m, 4H, $-OCH_2CH_2NH-$ (EDS)), 3,48-3,28 (m, 68H, $-C(O)NHCH_2CH_2-$ (TDS und EDS)), 2,98 (m, 16H, $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,76 (m, 16H $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,57-2,42 (m, 36H, $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$), 1,92 (m, 3H, $-C(O)CH_3$, N-terminale Acetylgruppe), 1,83-1,70 (m, 24H, $-C(O)CH_3$ (N-Acetyl)), zusätzliches Signal im Bereich 3,75 bis 3,65 verursacht durch PEG aus Harz.

(1)-EDS-(2,3)-GlcNAc(3-6OH)-(4,5)-GlcNAc(3-6OAc)-5, 3

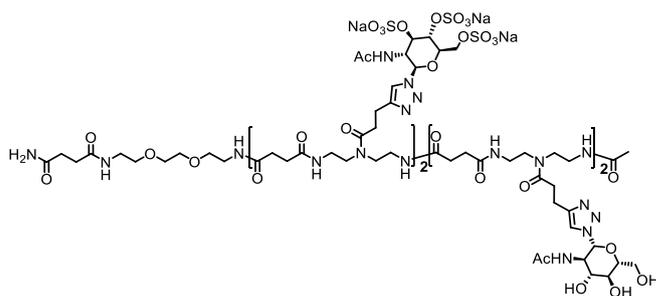


HR-MS kalk. für $C_{108}H_{167}N_{31}O_{43}$: $[M+3H]^{3+}$ 863,1; gefunden 863,1. Ausbeute: 0,9 mg (6%).

RP-HPLC: (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C): $t_R = 9,16$ min, bestimmte Reinheit: 96%.

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 8,04-7,99 (m, 4H, Ar-H), 6,08 (d, $^3J = 9,8$ Hz, 2H, $CH_{\text{Anomer-OAc}}$), 5,81 (m, 2H, $CH_{\text{Anomer-OH}}$), 5,51 (m, 2H, $CH_{\text{Pyranose-OAc}}$), 5,28 (m, 2H, $CH_{\text{Pyranose-OAc}}$), 4,64 (m, 2H, $CH_{\text{Pyranose-OAc}}$), 4,40 (m, 2H, $CH_{\text{Pyranose-OAc}}$), 4,31 (m, 2H, $CH_{\text{Pyranose-OAc}}$), 4,27-4,21 (m, 4H, $CH_{\text{Pyranose-OH}}$, $CH_{\text{Pyranose-OAc}}$), 3,92 (m, 2H, $CH_{\text{Pyranose-OH}}$), 3,85-3,65 (m, 14H, $CH_{\text{Pyranose-OH}}$, $-OCH_2CH_2O-$ (EDS), erhöhtes Integral (2H) verursacht durch PEG aus Harz), 3,63-3,60 (m, 4H, $-OCH_2CH_2NH-$ (EDS)) 3,46-3,27 (m, 34H, $-C(O)NHCH_2CH_2N-$ (TDS), $-C(O)NHCH_2CH_2-$ (TDS und EDS)), 3,02-2,93 (m, 8H, $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,82-2,73 (m, 8H $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,60-2,37 (m, 20H, $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$), 2,26-2,03 (m, 18H, $-C(O)CH_3$ (OAc)) 1,93 (m, 3H, $-C(O)CH_3$ (N-terminale Acetylgruppe)), 1,83-1,77 (m, 12H, $-C(O)CH_3$ (N-Acetyl)), zusätzliches Signal bei 3,17 wahrscheinlich durch Unreinheiten aus dem Harz.

(1)-EDS-(2,3)-GlcNAc(3-6S)-(4,5)-GlcNAc(3-6OH)-5, 3S

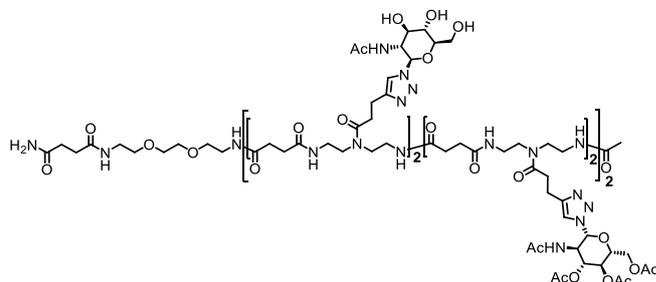


ESI-MS kalk. für $C_{96}H_{149}N_{31}Na_6O_{55}S_6$: $[M-6Na+3H]^3-$ 937,0; gefunden 937,8. Ausbeute: 8,33 mg (23%).

DS kalk. mittels 1H -NMR: 91%, kalk. mittels EA: 89%.

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 8,03 (m, 4H, Ar-H), 6,00 (d, $^3J = 9,7$ Hz, 2H, $CH_{Anomer-S}$), 5,82 (d, $^3J = 9,7$ Hz, 2H, $CH_{Anomer-OH}$), 4,79 (m, 4H erwartet, $CH_{Pyranose-S}$, verdeckt durch HDO-Signal), 4,57 (m, 2H, $CH_{Pyranose-S}$), 4,46 (m, 2H, $CH_{Pyranose-S}$), 4,28-4,13 (m, 6H, $CH_{Pyranose-S}$, $CH_{Pyranose-OH}$), 3,95 (m, 2H, $CH_{Pyranose-OH}$), 3,85-3,20 (m, 52H, $CH_{Pyranose-OH}$, $-OCH_2CH_2O-$ (EDS), $-OCH_2CH_2NH-$ (EDS), $-C(O)NHCH_2CH_2N-$ (TDS), $-C(O)NHCH_2CH_2-$ (TDS und EDS)), 3,10-2,91 (m, 8H, $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,86-2,76 (m, 8H $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,57-2,37 (m, 20H, $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$), 1,92-1,71 (m, 12H, $-C(O)CH_3$ (N-Acetyl)), 2,01-1,72 (m, 3H, $-C(O)CH_3$ (N-terminale Acetylgruppe)).

(1)-EDS-(2,3,6,7)-GlcNAc(3-6OH)-(4,5,8,9)-GlcNAc(3-6OAc)-9, 4

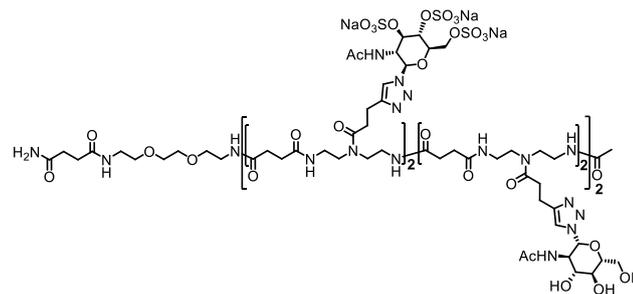


HR-MS kalk. für $C_{204}H_{311}N_{59}O_{81}$: $[M+5H]^5+$ 977,6; gefunden 977,6. Ausbeute: 15,3 mg (17%).

RP-HPLC: (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C): $t_R = 10,53$ min, bestimmte Reinheit: 95% (kleinere zusätzliche Peaks können der Zielstruktur mit mehr oder weniger Acetylgruppen zugeordnet werden).

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 8,01 (m, 8H, Ar-H), 6,08 (d, $^3J = 9,8$ Hz, 4H, $CH_{Anomer-OAc}$), 5,81 (m, 4H, $CH_{Anomer-OH}$), 5,50 (m, 4H, $CH_{Pyranose-OAc}$), 5,27 (m, 4H, $CH_{Pyranose-OAc}$), 4,64 (m, 4H, $CH_{Pyranose-OAc}$), 4,41 (m, 4H, $CH_{Pyranose-OAc}$), 4,31 (m, 4H, $CH_{Pyranose-OAc}$), 4,26-4,20 (m, 8H, $CH_{Pyranose-OH}$, $CH_{Pyranose-OAc}$), 3,92 (m, 4H, $CH_{Pyranose-OH}$), 3,84-3,66 (m, 20H, $CH_{Pyranose-OH}$, $-OCH_2CH_2O-$ (EDS)), 3,61 (m, 4H, $-OCH_2CH_2NH-$ (EDS)) 3,46-3,31 (m, 68H, $-C(O)NHCH_2CH_2N-$ (TDS), $-C(O)NHCH_2CH_2-$ (TDS und EDS)), 3,02-2,97 (m, 16H, $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,78-2,76 (m, 16H $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,58-2,43 (m, 36H, $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$), 2,18-2,01 (m, 36H, $-C(O)CH_3$ (OAc)) 1,92 (m, 3H, $-C(O)CH_3$ (N-terminale Acetylgruppe)), 1,84-1,71 (m, 24H, $-C(O)CH_3$ (N-Acetyl)).

(1)-EDS-(2,3,6,7)-GlcNAc(3-6S)-(4,5,8,9)-GlcNAc(3-6OH)-9, 4S

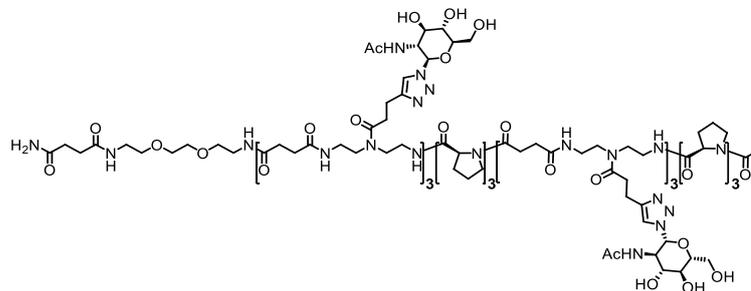


ESI-MS kalk. für $C_{180}H_{275}N_{59}Na_{12}O_{105}S_{12}$: $[M-8Na]^8-$ 677,7; gefunden 677,5. Ausbeute: 42,91 mg (41%).

DS kalk. mittels 1H -NMR: 97%, kalk. mittels EA: 96%.

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 8,02 (m, 8H, Ar-H), 6,00 (d, $^3J = 9,8$ Hz, 4H, $CH_{Anomer-S}$), 5,80 (d, $^3J = 9,7$ Hz, 4H, $CH_{Anomer-OH}$), 4,79 (m, 4H erwartet, $CH_{Pyranose-S}$, verdeckt durch HDO-Signal), 4,70 (m, 4H, $CH_{Pyranose-S}$), 4,56 (m, 4H, $CH_{Pyranose-S}$), 4,46 (m, 4H, $CH_{Pyranose-S}$), 4,28-4,13 (m, 12H, $CH_{Pyranose-S}$, $CH_{Pyranose-OH}$), 3,94 (m, 4H, $CH_{Pyranose-OH}$), 3,85-3,20 (m, 92H, $CH_{Pyranose-OH}$, $-OCH_2CH_2O-$ (EDS), $-OCH_2CH_2NH-$ (EDS), $-C(O)NHCH_2CH_2N-$ (TDS), $-C(O)NHCH_2CH_2-$ (TDS und EDS)), 3,06-2,92 (m, 16H, $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,83-2,73 (m, 16H $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,58-2,42 (m, 36H, $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$), 1,92 (m, 3H, $-C(O)CH_3$ (N-terminale Acetylgruppe)), 1,83-1,72 (m, 24H, $-C(O)CH_3$ (N-Acetyl)).

(1)-EDS-(2,3,4,8,9,10)-GlcNAc(3-6OH)-(5,6,7,11,12,13)-Pro-13, 5

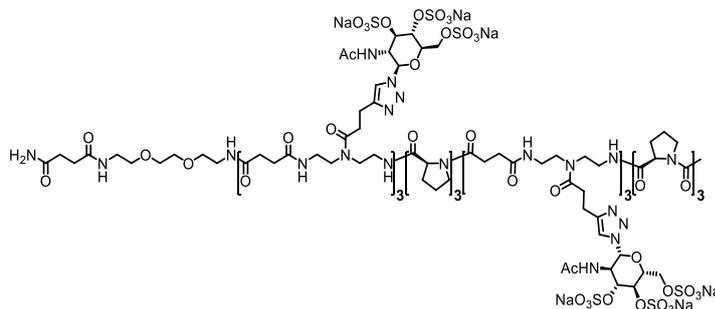


HR-MS kalk. für $C_{168}H_{263}N_{51}O_{59}$: $[M+4H]^4+$ 985,7; gefunden 985,7. Ausbeute: 1,04 mg (2%).

RP-HPLC: (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C): $t_R = 8,99$ min, bestimmte Reinheit: 73%.

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 8,01 (m, 6H, Ar-H), 5,81 (m, 6H, $CH_{Pyranose}$, anomeres Proton), 4,82-4,66 (m, 4H erwartet, $-C(O)CHCH_2CH_2CH_2N-$ (Prolin), verdeckt durch HDO-Signal), 4,33 (m, 2H, $-C(O)CHCH_2CH_2CH_2N-$ (Prolin)), 4,24 (t, $^3J = 9,9$ Hz, 6H, $CH_{Pyranose}$), 3,92 (m, 6H, $CH_{Pyranose}$), 3,84-3,58 (m, 44H, $CH_{Pyranose}$, $-OCH_2CH_2O-$ (EDS), $-OCH_2CH_2NH-$ (EDS), $-C(O)CHCH_2CH_2CH_2N-$ (Prolin)), 3,50-3,24 (m, 52H, $-C(O)NHCH_2CH_2N-$ (TDS), $-C(O)NHCH_2CH_2-$ (TDS und EDS)), 3,07-2,91 (m, 12H, $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,85-2,72 (m, 12H $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,61-2,38 (m, 28H, $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$), 2,36-1,88 (m, 27H, $-C(O)CHCH_2CH_2CH_2N-$ (Prolin), $-C(O)CH_3$ (N-terminale Acetylgruppe)), 1,82-1,72 (m, 18H, $-C(O)CH_3$ (N-Acetyl)).

(1)-EDS-(2,3,4,8,9,10)-GlcNAc(3-6S)-(5,6,7,11,12,13)-Pro-13, 5S



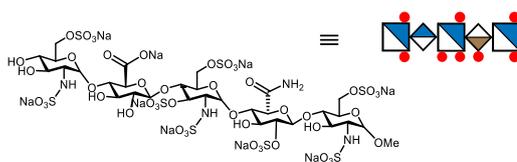
ESI-MS kalk. für $C_{168}H_{245}N_{51}Na_{18}O_{113}S_{18}$: $[M-12Na+5H]^{7-}$ 786,7; gefunden 787,6. Ausbeute: 29,4 mg (21%).

DS kalk. mittels 1H -NMR: 85%, kalk. mittels EA: 87%.

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 8,03 (m, 6H, Ar-H), 6,00 (m, 6H, CH_{Pyranose} , anomeres Proton), 4,86-4,64 (m, 10H erwartet, $-C(O)CHCH_2CH_2CH_2N-$ (Prolin), CH_{Pyranose} , verdeckt durch HDO-Signal), 4,33 (m, 2H, $-C(O)CHCH_2CH_2CH_2N-$ (Prolin)), 4,57 (m, 6H, CH_{Pyranose}), 4,47 (m, 6H, CH_{Pyranose}), 4,32 (m, 2H, $-C(O)CHCH_2CH_2CH_2N-$ (Prolin)), 4,25-4,17 (m, 12H, CH_{Pyranose}), 3,81 (m, 2H, $-C(O)CHCH_2CH_2CH_2N-$ (Prolin), verbliebene Peaks können Protonen der unsulfatierten GlcNAc-Einheiten zugeordnet werden), 3,72-3,22 (m, 72H, $-OCH_2CH_2O-$ (EDS), $-OCH_2CH_2NH-$ (EDS), $-C(O)NHCH_2CH_2-$ (TDS und EDS), $-C(O)CHCH_2CH_2CH_2N-$ (Prolin)), 3,07-2,92 (m, 12H, $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,82-2,70 (m, 12H $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,64-2,39 (m, 28H, $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$), 2,35-1,70 (m, 45H, $-C(O)CHCH_2CH_2CH_2N-$ (Prolin), $-C(O)CH_3$ (N-terminale Acetylgruppe), $-C(O)CH_3$ (N-Acetyl)).

5.4.2 Synthese von Fondaparinux-funktionalisierten Liposomen

Fondaparinux-Natrium



Fondaparinux wurde durch Dialyse der kommerziell erhältlichen Injektionslösung gegen Wasser achtmal 12 h mit Spectra Por Float-A-Lyzer-Einheiten mit einem MWCO von 100-500 g/mol und einem Volumen von 10 ml und anschließender Gefriertrocknung erhalten. In mehreren Läufen wurden insgesamt 24 Spritzen verwendet und 235 mg (Ausbeute: 98%) Fondaparinux erhalten.

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 5,62 (d, $^3J = 3,8$ Hz, 1H, Glukosamin (GA)^{nr}-H1), 5,55 (d, $^3J = 3,5$ Hz, 1H, GA^{zentral}-H1), 5,17 (d, $^3J = 3,8$ Hz, 1H, Iduronsäure (I)-H1), 5,04 (d, $^3J = 3,5$ Hz, 1H, GA^r-H1), 4,86-4,70 (m, 1H erwartet, I-H5, verdeckt durch HDO-Signal), 4,63 (d, $^3J = 7,9$ Hz, 1H, Glucuronsäure(GS)-H1), 4,48 (d, $^3J = 10,0$ Hz 1H, GA^{zentral}-H3), 4,43-4,26 (m, 6H, GA^{nr}-H6', GA^{zentral}-H6', H6'', I-H2, GA^r-H6', 6''), 4,17-4,15 (m, 4H, GA^{nr}-H6'', GA^{zentral}-H5, I-H3, 4), 3,98 (m, 2H, GA^{zentral}-H4, GA^r-H5), 3,90-3,76 (m, 5H, GA^{nr}-H5, GS-H3, 4, 5, GA^r-H4), 3,67-3,57 (m, 3H,

GA^r-H3, GA^{nr}-H3, 4), 3,46-3,41 (m, 5H, GA^{zentral}-H2, GS-H2, OMe), 3,28 (dd, ³J = 10,7, 3,7 Hz, 2H, GA^{nr}-H2, GA^r-H2).

Liposom(DPPE/DSPC/Chol – 60/30/10)-Fondaparinux, 6

Es wurden Liposomen nach einem von Rademacher *et al.* veröffentlichten Protokoll hergestellt.^{90,341} Kurz zusammengefasst wurden definierte Mengen von Stammlösungen der einzelnen Lipidkomponenten in ein Reagenzglas pipettiert, die organischen Lösungsmittel mittels Hochvakuum entfernt und der erhaltene Lipidfilm in 650 µl PBS-Puffer durch Vortexen und Ultraschall resuspendiert. Durch Extrusion durch Membranen mit einer Porengröße von 200 und 100 µm wurden die erhaltenen Liposomen in ihrer Größe vereinheitlicht. Im Vergleich zum verwendeten Protokoll wurde die Zusammensetzung abgeändert und es wurde mit einer Mischung aus DPPE, DSPC und Cholesterol (60/30/10) gearbeitet. Die verwendeten Ansatzgrößen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Zur Liposomherstellung verwendete Ansatzgrößen.

	DPPE	DSPC	Cholesterol
M [g/mol]	691,959	790,2	386,67
Molverhältnis	60,0	30,0	10,0
Menge [mg]	1,245	0,712	0,116
Menge [µmol]	1,799	0,901	0,300
Konz. Stammlösung [mg/ml]	3	20	10
Volumen (Stammlösungen) [µl]	415,0	35,6	11,6
Volumen (PBS-Puffer) [µl]		650	
Finale Gesamtlipidkonzentration [mM]		4,62	

Die Liposomen wurden im Anschluss an die Extrusion mit einem Zetasizer mittels DLS- und Zetapotentialmessung charakterisiert (siehe Tabelle 3). Anschließend wurde die hergestellte Liposomsuspension mit Fondaparinux (3 Äq. bezogen auf DPPE) und DMTMM (5 Äq. bezogen auf DPPE) in 250 µl PBS-Puffer über Nacht inkubiert. Die Liposomen wurden durch Dialyse mit Slyde-A-Lyzer-Kassetten (MWCO = 7000 g/mol) aufgereinigt. Die Liposomen wurden nach der Funktionalisierung erneut mittels DLS- und Zetapotentialmessung charakterisiert (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Zusammensetzung und Ergebnisse der DLS- sowie Zetapotentialmessungen für eine Liposomformulierung vor und nach der Funktionalisierung mit Fondaparinux.

Zusammensetzung [mol%]			Durchmesser ¹ (PDI) ³	Zetapotential ² (SD) ⁴
DPPE	DSPC	Cholesterol	[nm]	[mV]
Vor Funktionalisierung:				
60	30	10	156,7 (0,076)	-7,10 (0,24)
Nach Funktionalisierung:				
60	30	10	168,6 (0,090)	-34,85 (0,85)

¹ Bestimmt durch DLS-Messungen mit einem Zetasizer Nano ZS.

² Mittelwert aus der Messung in Duplikaten bestimmt über Zetapotentialmessungen mit einem Zetasizer Nano ZS.

³ Polydispersität der Liposomen bestimmt durch das Messprogramm des Zetasizer.

⁴ Standardabweichung bestimmt aus der Messung in Duplikaten.

5.4.3 Festphasensynthese von Glykooligo(amidoaminen) und deren Membrananker-tragenden Analoga zur Untersuchung gegenüber Viren

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Reaktionen angelehnt an die bereits veröffentlichten Protokolle nach Hartmann *et al.* und in Polypropylen-Spritzenreaktoren auf einem Schüttler durchgeführt und die angegebenen Reaktionsgrößen beziehen sich auf einen Ansatz von 0,025 mmol.^{92,241} Waschschritte wurden, sofern nicht anders beschrieben, fünfzehnmal und mit je 2 ml Lösungsmittel und im Falle von Wasser mit MilliQ-Wasser durchgeführt. Wenn der Fmoc-Photo-Linker verwendet wurde, wurde TentaGel® S NH₂ Harz verwendet, unter Lichtausschluss gearbeitet und der erste EDS-Baustein als Doppelkupplung eingeführt. Die Reaktionen zur Rückgratfunktionalisierung wurden mittels Kaisertest überprüft. Zur Lagerung wurde das Harz mit DCM gewaschen.

Funktionalisierung von TentaGel® S NH₂ Harz mit dem Fmoc-Photo-Linker

TentaGel® S NH₂ Harz (0.405 mmol) wurde in einen 20 ml Spritzenreaktor eingewogen und in 10 ml DMC für 30 min gequollen. Fmoc-Photo-Linker (3 Äq.) und PyBOP (3 Äq.) wurden in DMF (125 mmol/l) gelöst und DIPEA (20 Äq.) wurde hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung in den Spritzenreaktor aufgezogen und die Spritze für 3 h geschüttelt. Das Harz wurde dreimal mit je 5 ml DMF gewaschen und eine zweite Kupplung durchgeführt. Abschließend wurde das Harz jeweils fünfzehnmal mit 5 ml DMF und mit 5 ml DCM gewaschen und unter Hochvakuum getrocknet. Die Beladung wurde wie unten beschrieben bestimmt.

Harzvorbereitung

Zur Vorbereitung des Harzes wurde dieses in einen 5 ml Spritzenreaktor eingewogen (0,025 mmol) und in 2 ml DMC für 30 min gequollen. Anschließend wurde das Harz mit DMF gewaschen.

Fmoc-Abspaltung

Fmoc wurde durch Behandlung mit 2 ml einer 25%igen Piperidinlösung in DMF entfernt. Dafür wurde das Harz dreimal für je 10 min in der Lösung geschüttelt. Zwischen den einzelnen Entschützungsritten wurde das Harz dreimal und zum Abschluss fünfzehnmal mit DMF gewaschen.

Kupplungen an der Festphase

Reaktionsbedingungen für TDS, EDS, Lysin, Diaminopropionsäure und Pentinsäure: das zu kuppelnde Reagenz (5 Äq.) wurde zusammen mit PyBOP (5 Äq.) in DMF (1 ml) gelöst und DIPEA (20 Äq.) wurde hinzugegeben. Die Lösung wurde in den Reaktor aufgezogen und die Spritze für 1 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF gewaschen.

Reaktionsbedingungen für das Etherlipid, Rhodamin B und die Myristinsäureketten: wie zuvor beschrieben, aber mit DCM als Lösungsmittel. Für Rhodamin wurde anschließend ausgiebig mit DCM und MeOH gewaschen.

Acetylierung

Um den *N*-Terminus oder das Amin der Lysinseitenkette zu acetylieren, wurde das Harz zweimal für 15 min mit je 2 ml Essigsäureanhydrid/Pyridin (1/1) behandelt und danach mit DMF gewaschen.

Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC)

Für die Funktionalisierung mit Mannose: Das Mannose-Azid (2,5 Äq. pro Alkin) wurde in DMF (1 ml) oder im Falle von zuvor deacetyliertem β -D-GlcNAc-Azid in DMF/Wasser (1 ml, 9/1) gelöst. Separat wurden Lösungen von Kupfersulfat-Pentahydrat (50 mol% pro Alkin) und Natriumascorbat (50 mol% pro Alkin) jeweils in 0,15 ml Wasser angesetzt. Die Kohlenhydratlösung wurde gefolgt von der Natriumascorbat- und der Kupfersulfatlösung in die Spritze aufgezogen und diese über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde das Harz ausgiebig mit DMF, einer Natriumdiethyldithiocarbamatlösung (0,2 M) in DMF/Wasser (1/1), Wasser und DCM gewaschen, bis keine Färbung der Waschlösung mehr beobachtet werden konnte.

Für die Funktionalisierung mit Cholesterol: wie oben beschrieben, aber statt DMF wurde THF verwendet, um das Cholesterolazid zu lösen.

Boc-Entschützung

Das Harz wurde für 30 min mit 4M Salzsäurelösung in Dioxan inkubiert und anschließend mit DMF gewaschen.

Dde-Entschützung

Das Harz wurde zweimal für 15 min mit einer frisch angesetzten Lösung von Hydrazin-Hydrat in DMF (2%) behandelt, dazwischen wurde dreimal mit DMF und abschließend fünfzehnmal mit DMF gewaschen.

Experimentaltteil

HCl-Behandlung zur Rhodaminöffnung

Das Harz wurde 5 min mit einer 4M Salzsäurelösung inkubiert und anschließend mit DMF gewaschen.

O-Deacetylierung auf der Festphase

Das Harz wurde zweimal für je 30 min mit 2 ml Natriummethoxidlösung in MeOH (0,2 M) behandelt.³¹⁹ Dazwischen wurde das Harz dreimal mit MeOH und abschließend fünfmal mit MeOH und zehnmal mit DMF gewaschen.

Sulfatierung

Die Sulfatierung wurde in 50 ml Festphasensynthesereaktoren aus Glas, ausgestattet mit einem PTFE-Hahn mit einer T-Bohrung und einer Glasfritte mittlerer Porosität, durchgeführt. Das Harz wurde mit trockenem DMF zehnmal gewaschen und anschließend wurde eine Lösung von TMA*SO₃ (50 Äq. pro Hydroxylgruppe) in DMF (8,65 ml/g) hinzugegeben. Die Mischung wurde zur Reaktion über Nacht bei 70°C gelagert. Anschließend wurde das Harz mit einer 10%igen Natriumacetatlösung in Wasser (10 Äq. bezogen auf TMA*SO₃) behandelt und fünfzehnmal mit Wasser, fünfzehnmal mit warmem DMF (70 °C), dreißigmal mit DMF (RT) und fünfzehnmal mit DCM gewaschen. Anmerkung: Um eine Desulfatierung zu verhindern, sollten längere Inkubationszeiten mit warmem DMF nach Entfernen der Reaktionslösung vermieden werden.

Abspaltung vom Harz – Fmoc-Photo-Linker

Das Harz wurde 30 min in DCM gequollen und anschließend mit ACN gewaschen und in ein Glasgefäß überführt. Das Harz wurde in einer Mischung von ACN und Wasser (1/1) suspendiert und unter einen LED-Spot platziert (365 nm). Anschließend wurde das Harz unter Schütteln für insgesamt 24 h bei einer Leistung von 15 % der maximalen Lampenleistung und einem Abstand von 3 cm von der Lampe, was in einer ungefähren Bestrahlungsstärke von 285 mW/cm² resultiert, bestrahlt. Der Bestrahlungsprozess wurde regelmäßig unterbrochen, um bereits abgespaltenes Produkt vom Harz durch Waschen mit ACN und Wasser abzutrennen und das Harz neu in DCM zu quellen. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend unter vermindertem Druck getrocknet.

Abspaltung vom Harz – TentaGel® S RAM

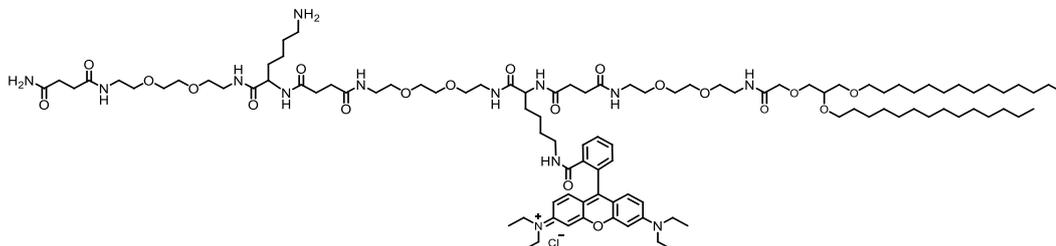
Das Harz wurde mit DCM gewaschen und anschließend eine Abspalllösung bestehend aus 95% TFA, 2,5% TIPS und 2,5% DCM in den Reaktor aufgezogen und diese für eine Stunde geschüttelt. Die Mischung wurde anschließend in Diethylether ausgefällt und der Niederschlag unter Stickstoffstrom getrocknet. Die so erhaltenen Zwischenstufen wurden ohne weitere Aufarbeitung zur Konjugation mit Fondaparinux (siehe unten) verwendet.

Aufarbeitung – Ultrafiltrierung

Zur Aufarbeitung mittels Ultrafiltrierung wurden die Produkte in NaCl-Lösung (0,1 M) gelöst und zehnmal mit Macrosep® Advance Dialysezentrifugiereinheiten, die mit einer Omega™ Membran (MWCO = 1000 g/mol für terminal acetylierte Strukturen, MWCO = 10 000 g/mol

für Cholesterol- oder Lipid-verankerte Strukturen) ausgestattet sind, zentrifugiert, wobei nach dem ersten Lauf Wasser zur weiteren Aufreinigung genutzt wurde. Anschließend wurden die finalen Produkte durch Gefriertrocknung der verbleibenden wässrigen Phase erhalten.

(1,3,5)-EDS-(2)-Lys(NH₂)-(4)-Lys(Rho)-5-Etherlipid, ZS-7



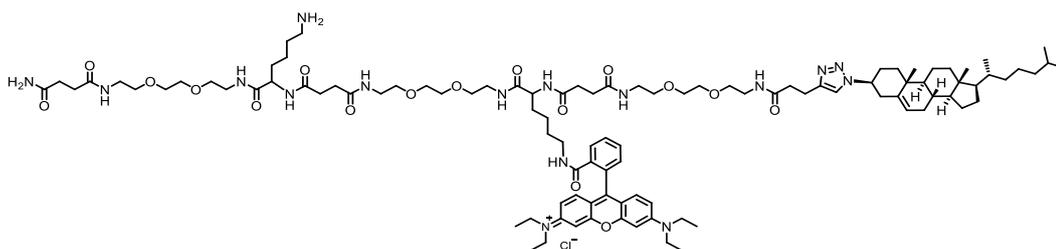
Die Struktur wurde unter Verwendung des oben beschriebenen Protokolls synthetisiert, wobei TentaGel® S RAM Harz verwendet wurde. Nach dem Aufbau des Rückgrats wurde Fmoc-entschützt und das Etherlipid konjugiert. Anschließend wurde die Dde-Schutzgruppe entfernt und Rhodamin B gekuppelt. Die Zwischenstufe wurde durch Abspaltung mit TFA und Ausfällen in Diethylether erhalten.

ESI-MS kalk. für C₁₀₃H₁₇₄N₁₃O₂₀⁺: [M⁺+2H]³⁺ 638,4; gefunden 638,6. Ausbeute: 30,2 mg (61%).

HR-MS kalk. für C₁₀₃H₁₇₄N₁₃O₂₀⁺: [M⁺+1H]²⁺ 957,2; gefunden 957,2.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O) δ (ppm) = 8,16-6,12 (erwartet 10H, Ar-H (Rho)), 4,23 (m, 1H, -C(O)CH(CH₂)NH- (Lys)), 4,10-3,83 (m, 2H, -C(O)CH(CH₂)NH- (Lys), -C(O)CH₂OCH₂CH(OR)CH₂O- (Lipid)) 3,75-2,87 (m, 66H, erhöhtes Integral (9H) verursacht durch PEG aus Harz, -OCH₂CH₂NHC(O)CH(Lys)NH- (EDS), -Ar-NCH₂CH₃ (Rho), -OCH₂CH₂O- (EDS), -OCH₂CH₂NH- (EDS), -C(O)NHCH₂CH₂- (EDS), -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NHC(O)- (Lys), -OCH₂- (Lipid)), 2,79-2,27 (12H, -C(O)CH₂CH₂C(O)-), 2,06-0,65 (m, 78H, -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NHC(O)- (Lys), -Ar-NCH₂CH₃ (Rho), -CH₂OCH₂(CH₂)₁₂CH₃- (Lipid)).

(1,3,5)-EDS-(2)-Lys(NH₂)-(4)-Lys(Rho)-5-Cholesterol, ZS-8



Die Struktur wurde unter Verwendung des oben beschriebenen Protokolls und mit TentaGel® S RAM Harz synthetisiert, wobei nach dem Aufbau des Rückgrats Fmoc-entschützt und Pentinsäure gekuppelt wurde. Anschließend wurde das Cholesterol-Azid via CuAAC angebracht, die Dde-Schutzgruppe entfernt, und Rhodamin B gekuppelt. Die Zwischenstufe wurde durch Abspaltung mit TFA und Ausfällen in Diethylether erhalten.

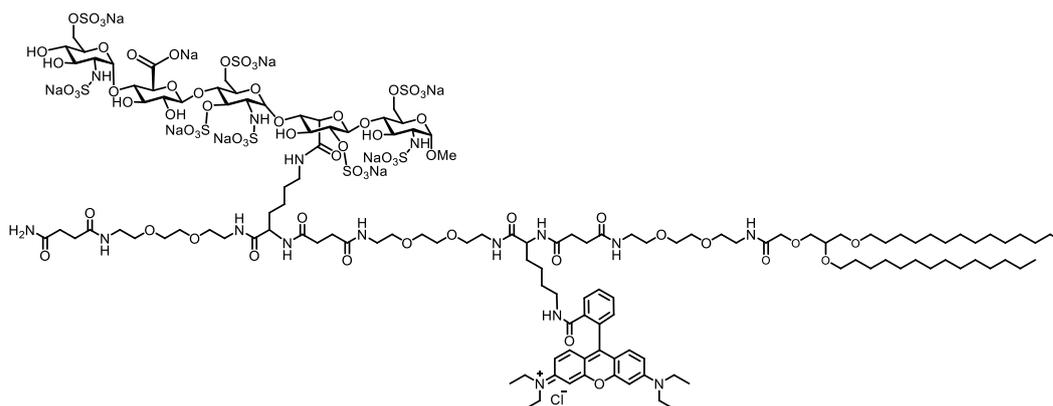
ESI-MS kalk. für C₁₀₂H₁₅₉N₁₆O₁₇⁺: [M⁺+1H]²⁺ 940,6; gefunden 940,6. Ausbeute: 28,2 mg (59%).

HR-MS kalk. für C₁₀₂H₁₅₉N₁₆O₁₇Cl: [M+3H]³⁺ 638,5; gefunden 638,6.

Experimentaltteil

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 7,98-7,60 (m, 4H, Ar-H (Rho und Triazol)), 7,42 (m, 2H, Ar-H (Rho und Triazol)), 7,26-6,67 (m, 5H, Ar-H (Rho, Triazol)), 5,32 (m, 1H, $-\text{C}=\text{CH}-$ (Chol)), 4,21 (m, 1H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{CH}_2)\text{NH}-$ (Lys)), 3,99 (m, 1H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{CH}_2)\text{NH}-$ (Lys)), 3,85-2,74 (m, 53H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}(\text{Lys})\text{NH}-$ (EDS), $-\text{Ar}-\text{NCH}_2\text{CH}_3$ (Rho), $-\text{NCH}-$ (Chol), $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ (EDS), $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ (EDS), $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ (EDS), $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ (Lys), $-\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (Pentinsäure)), 2,63-2,40 (m, 12H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$), 2,19-0,28 (m, 67H, $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ (Lys), $-\text{Ar}-\text{NCH}_2\text{CH}_3$ (Rho)), Chol).

(1,3,5)-EDS-(2)-Lys(Fondaparinux)-(4)-Lys(Rho)-5-Etherlipid, 7

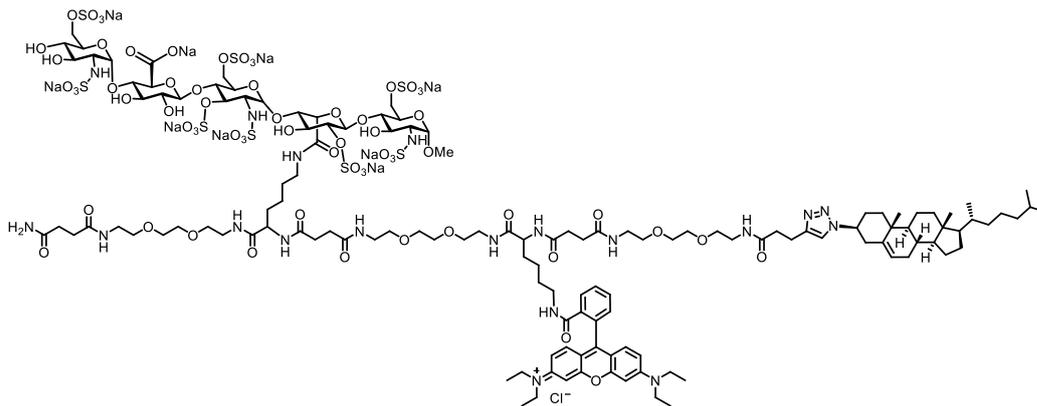


Das Produkt wurde durch Umsetzung von 20 mg **ZS-7** mit Fondaparinux (2,7 Äq.) unter Verwendung von DMTMM (50 Äq.) in 4 ml Phosphatpuffer (Sörensenpuffer, pH = 6,5) und 1 ml DMF unter Schütteln über Nacht umgesetzt. Nach Aufreinigung in Dialysezentrifugiereinheiten mit einem MWCO von 10 000 g/mol und Gefriertrocknung wurde das Produkt als Feststoff erhalten.

ESI-MS kalk. für $\text{C}_{134}\text{H}_{216}\text{N}_{16}\text{Na}_9\text{O}_{68}\text{S}_8^+$: $[\text{M}^+ + 4\text{H} - 9\text{Na}]^{4-}$ 849,0; gefunden 849,8. Ausbeute: 29,02 mg (80%).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 5,64 (d, $^3\text{J} = 3,8$ Hz, 0,78H, Glukosamin (GA)^{nr}-H1), 5,54 (d, $^3\text{J} = 3,5$ Hz, 0,75H, GA^{zentral}-H1), 5,19 (d, $^3\text{J} = 3,8$ Hz, 0,78H, Iduronsäure (I)-H1), 5,04 (d, $^3\text{J} = 3,5$ Hz, 0,78H, GA^r-H1), 4,65 (d, $^3\text{J} = 7,9$ Hz, 0,69H, Glucuronsäure(GS)-H1), 4,56-2,87 (m, 81H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}(\text{Lys})\text{NH}-$ (EDS), $-\text{Ar}-\text{NCH}_2\text{CH}_3$ (Rho), $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ (EDS), $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ (EDS), $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ (EDS), $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ (Lys), $-\text{OCH}_2-$ (Lipid), $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$), 2,70-2,44 (m, 12H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$), 2,13-0,61 (m, 78H, $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ (Lys), $-\text{Ar}-\text{NCH}_2\text{CH}_3$ (Rho), $-\text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3-$ (Lipid)).

(1,3,5)-EDS-(2)-Lys(Fondaparinux)-(4)-Lys(Rho)-5-Cholesterol, 8

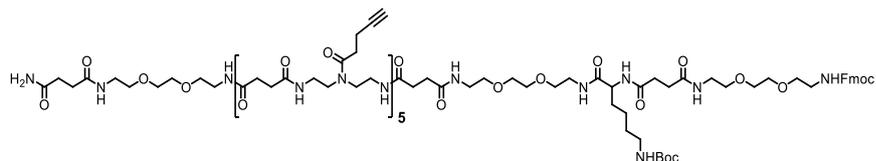


Das Produkt wurde durch Umsetzung von 6,1 mg **ZS-8** mit Fondaparinux (2,7 Äq.) unter Verwendung von PyBOP (50 Äq.) in 1,5 ml DMF und 0,5 ml DMSO unter Schütteln über Nacht umgesetzt. Nach Aufreinigung mittels Zentrifugation in Dialysezentrifugiereinheiten mit einem MWCO von 10 000 g/mol und Gefrierdrying wurde das Produkt als Feststoff erhalten.

ESI-MS kalk. für $C_{133}H_{201}N_{19}Na_9O_{65}S_8^+$: $[M^+-7Na]^6^-$ 567,7; gefunden 567,9. Ausbeute: 4,24 mg (37%).

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 5,62 (d, potenziell: Glukosamin (GA)^{nr}-H1), 5,56 (m, potenziell: GA^{zentral}-H1), 5,49 (m, $-C=CH-$ Chol), 5,02 (m, potenziell: GA^r-H1), 4,62 (m, potenziell: Glucuronsäure(GS)-H1), 4,51-2,82 (m, $-OCH_2CH_2NHC(O)CH(Lys)NH-$ (EDS), $-Ar-NCH_2CH_3$ (Rho), $-OCH_2CH_2O-$ (EDS), $-OCH_2CH_2NH-$ (EDS), $-C(O)NHCH_2CH_2-$ (EDS), $-CHCH_2CH_2CH_2CH_2NHC(O)-$ (Lys), $-NCH-$ Chol, $CH_{Pyranose}$), 2,70-2,39 (m, 12H, $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$), 2,23-0,35 (m, 67H, $-CHCH_2CH_2CH_2CH_2NHC(O)-$ (Lys), $-Ar-NCH_2CH_3$ (Rho), Chol).

(1,7,9)-EDS-(2,3,4,5,6)-TDS-(8)-Lys(Boc)-9-Fmoc, ZS-Oligomerrückgrat



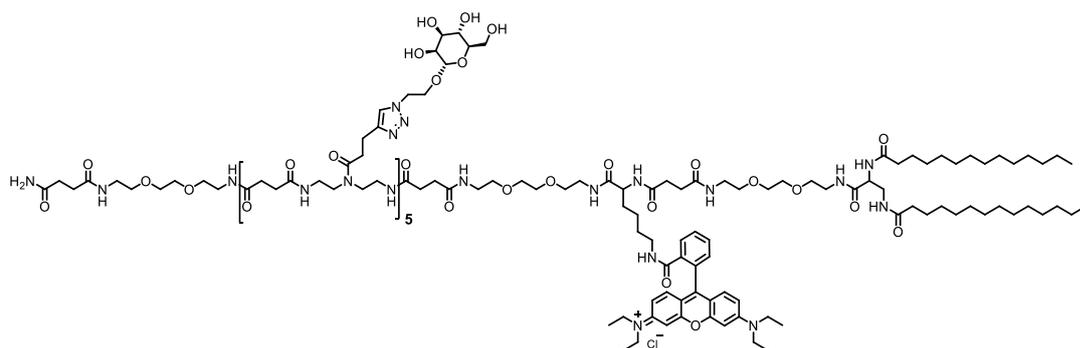
Die Struktur wurde nach dem oben beschriebenen Protokoll am Photolinker-funktionalisierten Harz durch Wiederholung von Entschützungs- und Kupplungsschritten aufgebaut. Die analytischen Daten wurden durch eine Mikroabspaltung unter Bestrahlung einer kleinen Harzmenge erhalten.

ESI-MS kalk. für $C_{121}H_{182}N_{24}O_{32}$: $[M+3H]^{3+}$ 829,8; gefunden 829,1. Ausbeute: Mikroabspaltung.

RP-HPLC: (von 100 bis 0 Vol. % A in 17 min bei 25 °C): t_R = 9,72 min, bestimmte Reinheit: 97%.

HR-MS kalk. für $C_{121}H_{185}N_{24}O_{32}$ $[M+3H]^{3+}$ 828,8; gefunden 828,8.

(1,7,9)-EDS-(2,3,4,5,6)-Man(2-6OH)-(8)-Lys(Rho)-9-Lipid 9



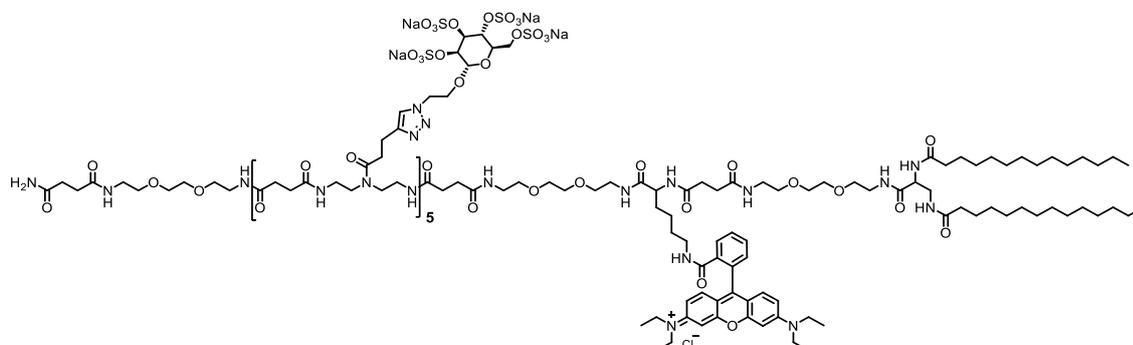
Ausgehend von **ZS-Oligomerrückgrat** wurde die Struktur unter Verwendung des oben beschriebenen Protokolls synthetisiert, wobei zunächst das Mannose-Azid durch CuAAC angebracht und dann DAP sowie die Myristinketten durch Entschützungs- und Kupplungsschritte eingeführt wurden. Im nächsten Schritt wurde die Boc-Schutzgruppe entfernt und Rhodamin B gekuppelt. Es wurde *O*-deacetyliert und mit HCl behandelt. Durch Aufteilung des Harzes und Bestrahlung eines Anteils gefolgt von der Aufreinigung mittels Dialysezentrifugiereinheit wurde die Verbindung **9** erhalten. Das restliche Harz wurde zur Synthese von **9S** verwendet.

ESI-MS kalk. für $C_{200}H_{326}N_{43}O_{63}^+$: $[M^++4H]^{5+}$ 868,3; gefunden 868,8. Ausbeute: 16,0 mg (20%)

HR-MS kalk. für $C_{200}H_{326}N_{43}O_{63}^+$: $[M^++3H]^{4+}$ 1085,1; gefunden 1085,3.

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 7,85 (m, 6H, Ar-H Triazol und Rho), 4,79 (m, 6H erwartet, $CH_{Pyranose-OH}$, $-C(O)CH(CH_2NHC(O)R)NHC(O)-$ Lipid, verdeckt durch HDO-Signal), 4,60 (m, 10H, $-NCH_2CH_2O-$ Seitenkette), 4,06 (m, 6H, $-NCH_2CH_2O-$ Seitenkette, $-C(O)CH(CH_2R)NH-$ Lys), 3,95-3,84 (m, 10H, $-NCH_2CH_2O-$ Seitenkette, $CH_{Pyranose-OH}$), 3,78-3,18 (m, 106H, $-OCH_2CH_2O-$ (EDS), $-OCH_2CH_2NH-$ (EDS), $-C(O)NHCH_2CH_2N-$ (TDS), $-C(O)NHCH_2CH_2-$ (TDS und EDS), $-Ar-NCH_2CH_3$ Rho, $CH_{Pyranose-OH}$, $-C(O)CHCH_2NHC(O)-$ Lipid), 3,03-2,91 (m, 17H, $-CHCH_2CH_2CH_2CH_2NHC(O)-$ Lys, $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette), $CH_{Pyranose-OH}$), 2,77 (m, 10H $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,56-2,35 (m, 32H, $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$), 2,18 (m, 4H, $-NHC(O)CH_2(CH_2)_{11}CH_3$ Lipid), 1,83-0,62 (m, 68H, $-CHCH_2CH_2CH_2CH_2NHC(O)-$ Lys, $-Ar-NCH_2CH_3$ Rho, $-NHC(O)CH_2(CH_2)_{11}CH_3$ Lipid).

(1,7,9)-EDS-(2,3,4,5,6)-Man(2-6S)-(8)-Lys(Rho)-9-Lipid 9S



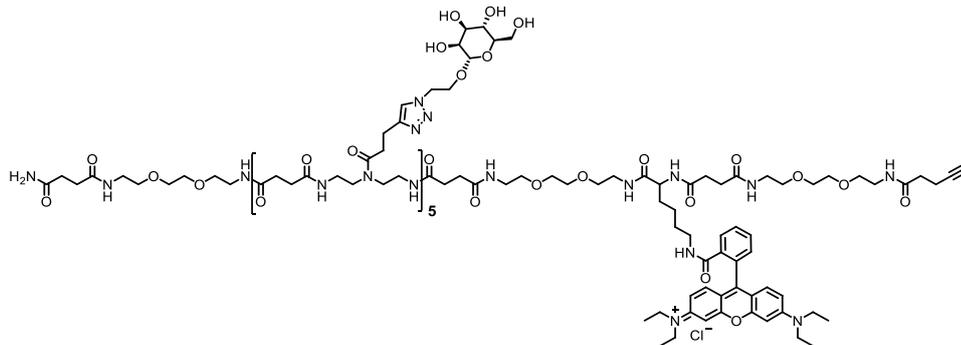
Harz aus dem Ansatz von **9** wurde unter Sulfatierungsbedingungen behandelt. Die Struktur **9S** wurde anschließend durch Bestrahlung und Aufreinigung durch Ultrafiltrierung erhalten.

ESI-MS kalk. für $C_{200}H_{306}N_{43}Na_{20}O_{123}S_{20}^+$: $[M^+-9Na]^{8-}$ 771,3; gefunden 771,0. Ausbeute: 17,9 mg (15%).

DS kalk. mittels 1H -NMR: 91%, kalk. mittels EA: 99%.

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 7,93 (m, 6H, Ar-H Triazol und Rho), 7,66 (m, 1H, Ar-H, Rho), 7,47 (m, 1H, Ar-H, Rho), 7,25 (m, 1H, Ar-H, Rho), 6,76 (m, 1H, Ar-H, Rho), 6,44 (m, 5H, Ar-H), 5,13 (s, 5H, CH_{Pyranose} anomeres Proton), 4,79 (m, 11H erwartet, $CH_{\text{Pyranose-S}}$, $-C(O)CHNHC(O)-$ Lipid, verdeckt durch HDO-Signal), 4,72-4,32 (25H, $-NCH_2CH_2O-$ Seitenkette, $CH_{\text{Pyranose-S}}$), 4,14-3,94 (m, 16H, $-NCH_2CH_2O-$ Seitenkette, $CH_{\text{Pyranose-S}}$, $-C(O)CH(CH_2R)NH-$ Lys), 3,75-3,22 (m, 91H, $-OCH_2CH_2O-$ (EDS), $-OCH_2CH_2NH-$ (EDS), $-C(O)NHCH_2CH_2N-$ (TDS), $-C(O)NHCH_2CH_2-$ (TDS und EDS), $-Ar-NCH_2CH_3$ Rho, $-C(O)CHCH_2NHC(O)-$ Lipid, $CH_{\text{Pyranose-S}}$), 3,01 (m, 12H, $-CHCH_2CH_2CH_2CH_2NHC(O)-$ Lys, $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,82 (m, 10H $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,58-2,35 (m, 32H, $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$), 2,32-0,47 (m, 72H, $-CHCH_2CH_2CH_2CH_2NHC(O)-$ Lys, $-NHC(O)CH_2(CH_2)_{11}CH_3$ Lipid, $-Ar-NCH_2CH_3$ Rho, $-NHC(O)CH_2(CH_2)_{11}CH_3$ Lipid).

(1,7,9)-EDS-(2,3,4,5,6)-Man(2-6OH)-(8)-Lys(Rho)-9-Pentinsäure, **ZS-10**



Ausgehend von **ZS-Oligomerrückgrat** wurde die Struktur unter Verwendung des oben beschriebenen Protokolls synthetisiert, wobei zunächst das Mannose-Azid durch CuAAC angebracht, anschließend die Fmoc-Schutzgruppe entfernt und Pentinsäure gekuppelt wurde. Im nächsten Schritt wurde die Boc-Schutzgruppe entfernt und Rhodamin B gekuppelt. Die Zwischenstufe wurde durch Bestrahlung in Form einer Mikroabspaltung erhalten.

ESI-MS kalk. für $C_{174}H_{272}N_{41}O_{61}^+$: $[M^++4H]^{5+}$ 783,9; gefunden 783,6. Ausbeute: Mikroabspaltung.

RP-HPLC: (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C): $t_R = 12,85$ min, bestimmte Reinheit: 92%.

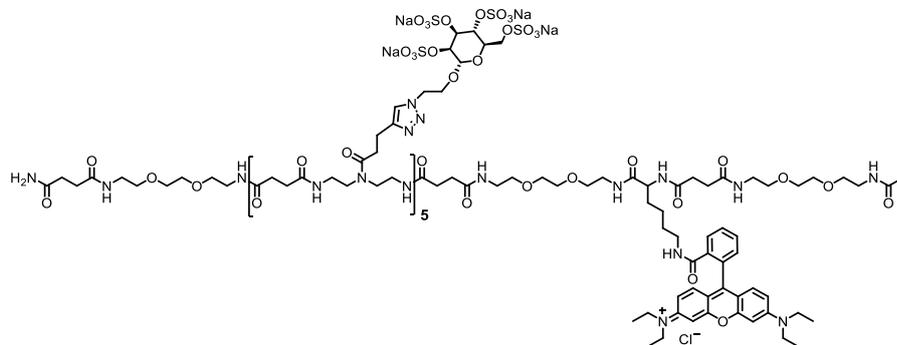
HR-MS kalk. für $C_{174}H_{272}N_{41}O_{61}^+$: $[M^++4H]^{5+}$ 783,9; gefunden 783,2.

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 7,86 (m, 7H, Ar-H Triazol und Rho), 6,29 (Rho, unterdrückt) 4,79 (m, 5H erwartet, $CH_{\text{Pyranose-OH}}$, verdeckt durch HDO-Signal), 4,57 (m, 10H, $-NCH_2CH_2O-$ Seitenkette), 4,06 (m, 6H, $-NCH_2CH_2O-$ Seitenkette, $-C(O)CH(CH_2R)NH-$ Lys), 3,93-3,82 (m, 10H, $-NCH_2CH_2O-$ Seitenkette, $CH_{\text{Pyranose-OH}}$), 3,77-3,15 (m, 104H, $-OCH_2CH_2O-$ (EDS), $-OCH_2CH_2NH-$ (EDS), $-C(O)NHCH_2CH_2N-$ (TDS), $-C(O)NHCH_2CH_2-$ (TDS und EDS), $-Ar-NCH_2CH_3$ Rho, $CH_{\text{Pyranose-OH}}$), 3,06-2,91 (m, 19H, $-CHCH_2CH_2CH_2CH_2NHC(O)-$ Lys, $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette), $CH_{\text{Pyranose-OH}}$), 2,77 (m, 12H $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,57-2,28 (m, 32H, $-$

DS kalk. mittels 98%.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 7,97 (m, 7H, Ar-H Triazol und Rho), 7,63 (m, 1H, Ar-H, Rho), 7,45 (m, 1H, Ar-H, Rho), 7,26 (m, 1H, Ar-H, Rho), 6,78 (m, 1H, Ar-H, Rho), 6,32 (m, 5H, Ar-H, Rho), 5,16 (bs, 5H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$ anomeres Proton), 4,79 (m, $\text{CH}_{\text{Pyranose-S}}$ überlappt mit HDO-Signal), 4,72-4,52 (m, 15H, $\text{CH}_{\text{Pyranose-S}}$, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ Seitenkette), 4,48-4,26 (m, 10H, $\text{CH}_{\text{Pyranose-S}}$), 4,18-3,91 (m, 16H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ Seitenkette, $\text{CH}_{\text{Pyranose-S}}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{CH}_2\text{R})\text{NH}-$ Lys), 3,76-3,15 (m, 89H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ (EDS), $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ (EDS), $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ (TDS), $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ (TDS und EDS), $-\text{ArNCH}_2\text{CH}_3$ Rho, $-\text{NCH}-$ Chol, $\text{CH}_{\text{Pyranose-S}}$), 3,01 (m, 14H, $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ Lys, $-\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (Pentinsäure)), 2,82 (m, 12H $-\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (Pentinsäure)), 2,58-2,40 (m, 32H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$), 2,05-0,46 (m, 61H, Chol, $-\text{Ar}-\text{NCH}_2\text{CH}_3$ Rho, $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ Lys).

(1,7,9)-EDS-(2,3,4,5,6)-Man(2-6S)-(8)-Lys(Rho)-9-Ac 11S



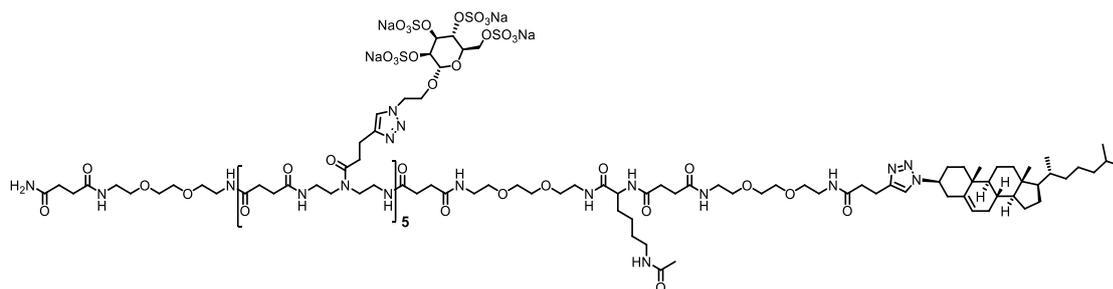
Ausgehend von **ZS-Oligomerrückgrat** wurde die Struktur unter Verwendung des oben beschriebenen Protokolls synthetisiert, wobei zunächst *N*-terminal Fmoc-entschützt und acetyliert wurde. Anschließend wurde Boc-entschützt und Rhodamin B konjugiert. Die TDS-Seitenketten wurden durch CuAAC mit Mannoseazid funktionalisiert und nach Deacetylierung und HCl-Behandlung die Sulfatierung durchgeführt. Das Produkt **11S** wurde durch Bestrahlung und nach Aufreinigung durch Ultrafiltrierung erhalten.

ESI-MS kalk. für $\text{C}_{171}\text{H}_{250}\text{N}_{41}\text{Na}_{20}\text{O}_{121}\text{S}_{20}$: $[\text{M}^+-10\text{Na}]^9-$ 631,4; gefunden 631,8. Ausbeute: 16 mg (22%).

DS kalk. mittels EA: 94%.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 7,88 (m, 6H, Ar-H Triazol und Rho), 7,64 (m, 2H, Ar-H, Rho), 7,06 (m, 2H, Ar-H, Rho), 6,52 (m, 5H, Ar-H), 5,13 (bs, 5H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$ anomeres Proton), 4,79 (m, $\text{CH}_{\text{Pyranose-S}}$ überlappt mit HDO-Signal) 4,71-4,54 (15H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ Seitenkette, $\text{CH}_{\text{Pyranose-S}}$), 4,43 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{Pyranose-S}}$), 4,34 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{Pyranose-S}}$), 4,15-3,87 (m, 16H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ Seitenkette, $\text{CH}_{\text{Pyranose-S}}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{CH}_2\text{R})\text{NH}-$ Lys.), 3,73-3,24 (m, erwartet 89H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ (EDS), $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ (EDS), $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ (TDS), $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ (TDS und EDS), $-\text{Ar}-\text{NCH}_2\text{CH}_3$ Rho, $\text{CH}_{\text{Pyranose-S}}$, erhöhtes Integral (9H) verursacht durch PEG aus Harz), 3,08-2,98 (m, 12H, $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ Lys, $-\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (Seitenkette)), 2,87-2,74 (m, 10H, $-\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (Seitenkette)), 2,60-2,37 (m, 32H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$), 1,98 (m, 3H, *N*-terminale Acetylgruppe), 1,46-0,89 (m, 18H, $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ Lys, $-\text{Ar}-\text{NCH}_2\text{CH}_3$ Rho).

(1,7,9)-EDS-(2,3,4,5,6)-Man(2-6S)-(8)-Lys(Ac)-9-Cholesterol **12S**



Ausgehend von **ZS-Oligomerrückgrat** wurde die Struktur unter Verwendung des oben beschriebenen Protokolls synthetisiert, wobei zunächst das Mannose-Azid durch CuAAC angebracht und dann *N*-terminal Fmoc entschützt und Pentinsäure gekuppelt wurde. Im nächsten Schritt wurde die Boc-Schutzgruppe entfernt und das Amin acetyliert. Es wurde das Cholesterolazid durch CuAAC eingeführt, *O*-deacetyliert und mit HCl behandelt. Nach Sulfatierung wurde durch Bestrahlung des Harzes gefolgt vom Aufreinigungsschritt mittels Ultrafiltrierung die Verbindung **12S** erhalten.

ESI-MS kalk. für $C_{175}H_{270}N_{42}Na_{20}O_{120}S_{20}^+$: $[M^+ - 10Na]^9$ 638,8; gefunden 638,8. Ausbeute: 4,7 mg (4%).

DS kalk. mittels EA: 94%.

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ (ppm) = 7,91 (m, 6H, Ar-H Triazol), 5,49 (m, 1H, $-C=CH-$ Chol), 5,13 (bs, 5H, $CH_{Pyranose}$ anomeres Proton), 4,79 (m, 5H erwartet, $CH_{Pyranose-S}$, überlappt mit HDO-Signal), 4,66 (m, 10H, $-NCH_2CH_2O-$ Seitenkette, 5H $CH_{Pyranose-S}$), 4,58 (m, 5H, $CH_{Pyranose-S}$), 4,44 (m, 5H, $CH_{Pyranose-S}$), 4,34 (m, 5H, $CH_{Pyranose-S}$), 4,19 (m, 1H, $-C(O)CH(CH_2R)NH-$ Lys), 4,10 (m, 10H, $-NCH_2CH_2O-$ Seitenkette, $CH_{Pyranose-S}$), 3,95 (m, 5H, $-NCH_2CH_2O-$ Seitenkette), 3,71-3,27 (m, 82H, $-OCH_2CH_2O-$ (EDS), $-OCH_2CH_2NH-$ (EDS), $-C(O)NHCH_2CH_2N-$ (TDS), $-C(O)NHCH_2CH_2-$ (TDS und EDS), $-NCH-$ Chol, $CH_{Pyranose-S}$), 3,14 (m, 2H, $-CHCH_2CH_2CH_2CH_2NHC(O)-$ Lys), 3,01 (m, 12H, $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,82 (m, 12H $-NC(O)CH_2CH_2-$ (Seitenkette)), 2,62-2,42 (m, 32H, $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$) 2,09-0,86 (m, in diesem Bereich liegen 3H, N-Acetyl, 34H Chol, 6H, $-CHCH_2CH_2CH_2CH_2NHC(O)-$ Lys), 0,83 (m, 6H, $-CHCH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH(CH_3)_2-$ Chol), 0,63 (bs, 3H, $-CHCH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH(CH_3)_2-$ Chol).

5.4.4 Festphasensynthese von sequenz-definierten funktionalisierten Oligo(amidoaminen) zur Ansteuerung von Galektinen

Zur Synthese der Strukturen **13** bis **18** wurde das TentaGel® S RAM Harz verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Reaktionen angelehnt an die bereits veröffentlichten Protokolle nach Hartmann *et al.* in Polypropylen-Spritzenreaktoren auf einem Schüttler durchgeführt und die angegebenen Reaktionsgrößen beziehen sich auf einen Ansatz von 0,025 mmol.^{92,241} Waschschrte wurden, sofern nicht anders beschrieben, fünfzehnmal und mit je 2 ml Lösungsmittel und im Falle von Wasser mit MilliQ-Wasser durchgeführt. Vor der Lagerung wurde das Harz mit DCM gewaschen. Die Arbeitsschritte wurden in der unten angegebenen Reihenfolge durchgeführt, wobei Entschützungs- und Kupplungsschritte wiederholt wurden, bis das vollständige Rückgrat aufgebaut war. Um ein freies terminales

Amin zu generieren, wurde für Struktur **13** und **18** das terminale EDS für die CuAAC Fmoc-geschützt belassen und erst anschließend entschützt. Für die Strukturen **14** bis **17** wurde Boc-geschütztes Alanin als terminaler Baustein verwendet (für **14**, **15**, **17** β -Alanin, für **16** α -Alanin), das erst bei der finalen Oligomerabspaltung mittels TFA entschützt wurde. Dies war nötig, da bei der Demethylierung der MDS-Seitenketten andernfalls auch das *N*-terminale Fmoc-geschützte Amin entschützt worden wäre, was Nebenreaktionen desamins mit den freien Carboxylgruppen ermöglicht hätte.

Harzvorbereitung

Zur Vorbereitung des Harzes wurde dieses in einen 5 ml Spritzenreaktor eingewogen (0,025 mmol) und in 2 ml DMC für 30 min gequollen. Anschließend wurde das Harz mit DMF gewaschen.

Fmoc-Abspaltung

Fmoc wurde durch Behandlung mit 2 ml einer 25%igen Piperidinlösung in DMF entfernt. Dafür wurde das Harz dreimal für je 10 min in der Lösung geschüttelt. Zwischen den einzelnen Entschützungsschritten wurde das Harz dreimal und zum Abschluss fünfzehnmal mit DMF gewaschen.

Baustein Kupplung

Der Baustein oder die Aminosäure (5 Äq.) wurde zusammen mit PyBOP (5 Äq.) in DMF (1 ml) gelöst und DIPEA (20 Äq.) wurde hinzugegeben. Die Lösung wurde in den Reaktor aufgezogen und die Spritze für 1 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF gewaschen.

Entschützung der MDS-Seitenkette

Vor der Entschützung wurde das Harz fünfmal mit einer Mischung aus THF/Wasser (1/1) gewaschen. Dann wurde das Harz zweimal für jeweils 1 h mit 1,5 ml einer Lithiumhydroxidlösung (0,2 M) in THF/Wasser (1/1) behandelt. Zwischen den zwei Entschützungen wurde das Harz fünfmal mit dem verwendeten Lösungsmittelgemisch gewaschen. Nach der zweiten Entschützung wurden jeweils fünf Waschgänge mit Wasser, DMF, DCM und erneut DMF durchgeführt.

Amidkupplung an die MDS-Seitenkette

Zur Voraktivierung wurde HATU (3 Äq. pro Carboxylgruppe) in 0,4 ml DMF gelöst, es wurde DIPEA (10 Äq.) hinzugegeben, die Lösung in die Spritze aufgezogen und das Harz für 15 min geschüttelt. Anschließend wurde eine Lösung von 4-Aminobenzolsulfonsäure (3 Äq. pro Carboxylgruppe) in 0,4 ml DMF hinzugefügt und die Reaktionsmischung für weitere 1,5 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF gewaschen.

Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC)

Das jeweilige Kohlenhydrat-Azid (2,5 Äq. pro Alkin) wurde in DMF (1 ml) gelöst. Separat wurden Lösungen von Kupfersulfat-Pentahydrat (50 mol% pro Alkin) und Natriumascorbat (50 mol% pro Alkin) jeweils in 0,15 ml Wasser angesetzt. Die Kohlenhydratlösung wurde

Experimentaltteil

gefolgt von der Natriumascorbat- und der Kupfersulfatlösung in die Spritze aufgezogen und diese über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde das Harz ausgiebig mit DMF, einer Natriumdiethyldithiocarbamatlösung (0,2 M) in DMF/Wasser (1/1), Wasser und DCM gewaschen, bis keine Färbung der Waschlösung mehr beobachtet werden konnte.

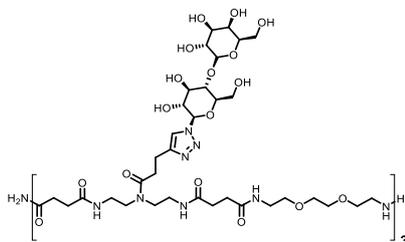
O-Deacetylierung auf der Festphase

Das Harz wurde zweimal für je 30 min mit 2 ml Natriummethoxidlösung in MeOH (0,2 M) behandelt.³¹⁹ Dazwischen wurde das Harz dreimal mit MeOH und abschließend fünfmal mit MeOH und zehnmal mit DMF gewaschen.

Abspaltung vom Harz

Das Harz wurde mit DCM gewaschen und anschließend eine Abspalllösung bestehend aus 95% TFA, 2,5% TIPS und 2,5% DCM in den Reaktor aufgezogen und diese für eine Stunde geschüttelt. Die Mischung wurde anschließend in Diethylether ausgefällt und der Niederschlag unter Stickstoffstrom getrocknet. Zur TFA-Entfernung wurde entsprechend des Protokolls von Roux *et al.* für 100 mg Probe, 1000 mg Anionenaustauscherharz genutzt.³⁹⁴ Das Harz wurde zunächst aktiviert durch je dreimaliges Waschen mit 10 ml einer 1,6 M Essigsäurelösung und einer 0,16 M Essigsäurelösung. Das Produkt wurde in 10 ml Wasser gelöst und in die Spritze mit dem Harz aufgezogen. Die Spritze wurde für 1 h geschüttelt und die wässrige Phase aufgefangen. Das Harz wurde dreimal mit je 2 ml Wasser gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen gefriergetrocknet. Anschließend wurde das erhaltene Produkt mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.

(1,3,5)-Lac-(2,4,6)-EDS-6, 13

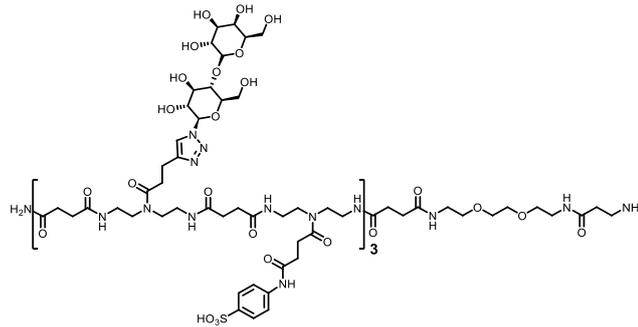


HR-MS kalk. für $C_{105}H_{177}N_{25}O_{51}$: $[M+4H]^{4+}$ 652,1; gefunden 652,1. Ausbeute: 113,4 mg (22%).

RP-HPLC: (von 100 bis 50 Vol. % A in 30 min bei 25 °C): $t_R = 7,37$ min, bestimmte Reinheit: 95%.

1H -NMR (600 MHz, D_2O) $\delta = 8,46$ (s, 1H, NH), 8,05 (br s, 3H, Ar-H), 5,74 (m, 3H, CH_{Pyranose} , anomeres Proton Glc), 4,53 (d, $^3J = 7,8$ Hz, 3H, CH_{Pyranose} , anomeres Proton Gal), 4,05 (t, $^3J = 9,1$ Hz, 3H, CH_{Pyranose}), 3,99 – 3,58 (m, 57H, CH_{Pyranose} , $-OCH_2CH_2O-$, $-C(O)NHCH_2CH_2O-$, $-OCH_2CH_2NH_2$), 3,46-3,32 (m, 34H, $-C(O)NHCH_2CH_2N-$, $-C(O)NHCH_2CH_2O-$), 3,22 (t, $^3J = 5,0$ Hz, 2H, $-OCH_2CH_2NH_2$), 3,04 (m, 6H, $-NC(O)CH_2CH_2-$), 2,81 (m, 6H, $-NC(O)CH_2CH_2-$), 2,56 – 2,44 (m, 24H, $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$) ppm.

(1,3,5)-Lac-(2,4,6)-pSO₃HPh-(7)-EDS-(8)-βAla-8, 14

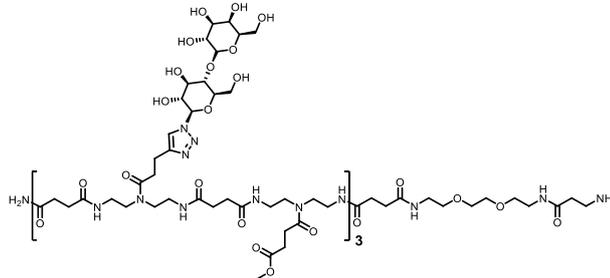


HR-MS kalk. für C₁₄₂H₂₁₈N₃₄O₆₅S₃: [M+3H]³⁺ 1179,5; gefunden 1179,5. Ausbeute: 261,0 mg (37%).

RP-HPLC: (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C): t_R = 4,86 min, Reinheit konnte nicht bestimmt werden, da das Produkt und das Nebenprodukt mit einer fehlenden *p*-Benzolsulfonsäure-Einheit zusammenlaufen.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O) δ = 8,02 (m, 3H, Ar-H), 7,76 (m, 6H, Ar-H), 7,58 (m, 6H, Ar-H), 5,73 (m, 3H, CH_{Pyranose}, anomeres Proton Glc), 4,50 (m, 3H, CH_{Pyranose}, anomeres Proton Gal), 4,03 (m, 3H, CH_{Pyranose}), 3,99-3,22 (m, 95H, CH_{Pyranose}, -OCH₂CH₂O-, -C(O)NHCH₂CH₂O-, -C(O)NHCH₂CH₂N-, -C(O)CH₂CH₂NH₂), 3,04-2,92 (m, 6H, -NC(O)CH₂CH₂-), 2,84-2,65 (m, 20H, -NC(O)CH₂CH₂-, -NC(O)CH₂CH₂C(O)NH-, -C(O)CH₂CH₂NH₂), 2,53-2,33 (m, 28H, -C(O)CH₂CH₂C(O)-) ppm.

(1,3,5)-Lac-(2,4,6)-MDS-(7)-EDS-(8)-βAla-8, 15

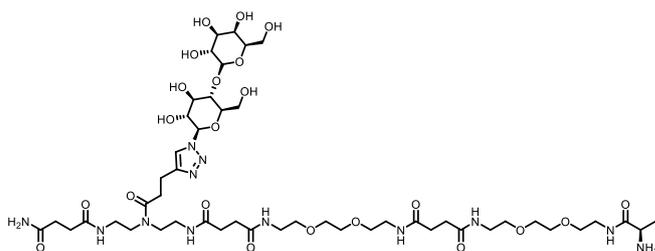


HR-MS kalk. für C₁₂₇H₂₀₉N₃₁O₅₉: [M+4H]⁴⁺ 779,3; gefunden 779,4. Ausbeute: 37,67 mg (22%).

RP-HPLC: (von 100 bis 75 Vol. % A in 30 min bei 25 °C): t_R = 13,32 min, bestimmte Reinheit: 95%.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O) δ = 8,65 (br s, 6H, NH), 8,05 (m, 3H, Ar-H), 5,74 (d, ³J = 9,2 Hz, 3H, CH_{Pyranose}, anomeres Proton Glc), 4,51 (d, ³J = 7,8 Hz, 3H, CH_{Pyranose}, anomeres Proton Gal), 4,05 (m, 3H, CH_{Pyranose}), 3,99-3,33 (m, 108H, CH_{Pyranose}, -OCH₂CH₂O-, -C(O)NHCH₂CH₂O-, -C(O)NHCH₂CH₂N-, -C(O)OCH₃), 3,28 (t, ³J = 6,7 Hz, 2H, -C(O)CH₂CH₂NH₂), 3,07-3,02 (m, 6H, -NC(O)CH₂CH₂-), 2,87-2,80 (m, 6H, -NC(O)CH₂CH₂-), 2,75-2,68 (m, 8H, -NC(O)CH₂CH₂C(O)NH-, -C(O)CH₂CH₂NH₂), 2,65-2,62 (m, 6H, -NC(O)CH₂CH₂C(O)NH-), 2,55-2,40 (m, 28H, -C(O)CH₂CH₂C(O)-) ppm.

(1)-Lac-(2,3)-EDS-(4)- α Ala-4, 16

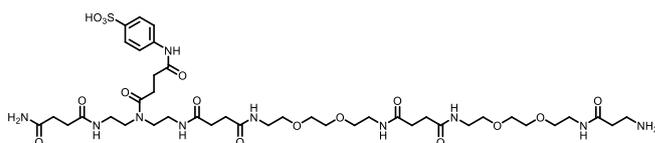


HR-MS kalk. für $C_{48}H_{84}N_{12}O_{22}$: $[M+2H]^{2+}$ 591,3; gefunden 591,3. Ausbeute: 32,4 mg (54%).

RP-HPLC: (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C): Produkt eluiert mit dem Injektionspeak, Reinheit konnte nicht bestimmt werden.

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ = 8,07 (m, 1H, Ar-H), 5,75 (m, 1H, CH_{Pyranose} , anomeres Proton Glc), 4,52 (d, 3J = 7,8 Hz, 1H, CH_{Pyranose} , anomeres Proton Gal), 4,11-4,01 (m, 2H, CH_{Pyranose} , –C(O)CHNH $_2$ CH $_3$), 4,00-3,76 (m, 9H, CH_{Pyranose}), 3,72-3,58 (m, 23H, CH_{Pyranose} , –OCH $_2$ CH $_2$ O–, –C(O)NHCH $_2$ CH $_2$ O–), 3,51-3,33 (m, 16H, –C(O)NHCH $_2$ CH $_2$ N–, –C(O)NHCH $_2$ CH $_2$ O–), 3,40-3,33 (m, 16H, –C(O)NHCH $_2$ CH $_2$ N–), 3,05 (m, 2H, –NC(O)CH $_2$ CH $_2$ –), 2,82 (m, 2H, –NC(O)CH $_2$ CH $_2$ –), 2,59-2,46 (m, 12H, –C(O)CH $_2$ CH $_2$ C(O)–), 1,53 (d, 3J = 7,0 Hz, 3H, –C(O)CHNH $_2$ CH $_3$) ppm.

(1)-pSO $_3$ HPh-(2,3)-EDS-(4)- β Ala-4, 17

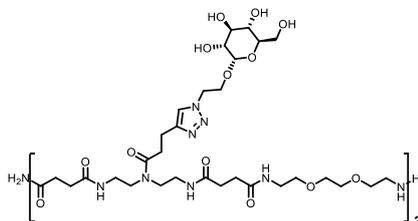


HR-MS kalk. für $C_{41}H_{68}N_{10}O_{16}S$: $[M+2H]^{2+}$ 495,2; gefunden 495,2. Ausbeute: 63,4 mg (32%).

RP-HPLC: (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C): t_R = 2,30 min, bestimmte Reinheit: 95%.

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ = 7,78 (m, 2H, Ar-H), 7,62 (m, 2H, Ar-H), 3,69-3,56 (m, 32H, –OCH $_2$ CH $_2$ O–, –C(O)NHCH $_2$ CH $_2$ O–, –C(O)NHCH $_2$ CH $_2$ N–, –C(O)NHCH $_2$ CH $_2$ O–), 3,26 (t, 3J = 6,7 Hz, 2H, –C(O)CH $_2$ CH $_2$ NH $_2$), 2,79-2,74 (m, 4H, –NC(O)CH $_2$ CH $_2$ C(O)NH–), 2,68 (t, 3J = 6,7 Hz, 2H, –C(O)CH $_2$ CH $_2$ NH $_2$), 2,56-2,41 (m, 12H, –C(O)CH $_2$ CH $_2$ C(O)–) ppm.

(1,3,5)-Glc-(2,4,6)-EDS-6, 18



HR-MS kalk. für $C_{93}H_{159}N_{25}O_{39}$: $[M+4H]^{4+}$ 563,5; gefunden 563,5. Ausbeute: 78,9 mg (18%).

RP-HPLC: (von 100 bis 50 Vol. % A in 30 min bei 25 °C): t_R = 8,03 min, bestimmte Reinheit: 99%.

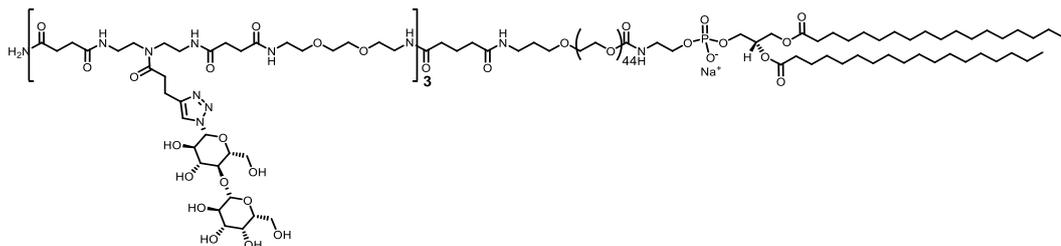
1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ = 8,46 (br s, 1H, NH), 7,91 (m, 3H, Ar-H), 4,90 – 4,77 (m, CH_{Pyranose} , anomeres Proton, überlappt mit HDO), 4,70 – 4,62 (m, 6H, –NCH $_2$ CH $_2$ O–), 4,43 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 7,9 Hz, 0,6H, CH_{Pyranose} anomeres Proton (β -Anomer)), 4,09 (m, 3H, –NCH $_2$ CH $_2$ O–), 3,93 (m, 3H, –NCH $_2$ CH $_2$ O–), 3,77 (m, 2H, CH_{Pyranose}), 3,73 – 3,32 (m, 71H, –OCH $_2$ CH $_2$ O–, –C(O)NHCH $_2$ CH $_2$ O–,

$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$, 3,26 – 3,22 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3,00 (m, 6H, $-\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,87 (m, 2,4H, $\text{CH}_{\text{Pyranose}}$), 2,80 (m, 6H, $-\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,57 – 2,44 (m, 24H, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$) ppm.

5.4.5 Synthese von Ligand-Lipid-Konjugaten

Die Ligand-Lipid-Konjugationen für **L13** und **L18** wurde entsprechend bereits veröffentlichter Protokolle von Rademacher *et al.* durchgeführt.^{90,341} Dazu wurde DSPE-PEG-NHS (12 mg, 1 Äq.) in 600 µl DMF gelöst und mit einer Lösung der jeweiligen Liganden (8 Äq.) in 5,4 ml NaHCO_3 -Puffer (0,1 M, pH = 8,4) gemischt. Die Mischung wurde über Nacht gerührt. Anschließend wurden die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, das Produkt erneut in NaHCO_3 -Puffer (0,1 M, pH = 8,4) gelöst und mit Slide-A-Lyzer Kassetten (MWCO = 7000 g/mol) dreimal 8 bis 12 Stunden gegen Puffer und anschließend dreimal 8 bis zwölf Stunden gegen Wasser dialysiert. Die Konjugationen von Oligomer **14** bis **17** wurde von Nils Schomann unter Anwendung eines leicht abgewandelten Protokolls durchgeführt. Dafür wurden DSPE-PEG-NHS (1 Äq.) und der jeweilige Ligand (5 Äq.) in DMSO (0,5 ml pro 1 mg Lipid) gelöst, DIPEA (20 Äq.) hinzugefügt und die Mischung über Nacht gerührt. Die restlichen Arbeitsschritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Alle Proben wurden nach Gefriertrocknung als weiße Feststoffe erhalten. Die Ausbeuten in mg beziehen sich auf das erfolgreich konjugierte Lipid. Das Verhältnis von konjugiertem zu unkonjugiertem Lipid wurde über die $^1\text{H-NMR}$ -Analytik bestimmt und in der Berechnung der Ausbeute wurde das unkonjugierte Lipid aus der Ausbeute rausgerechnet.

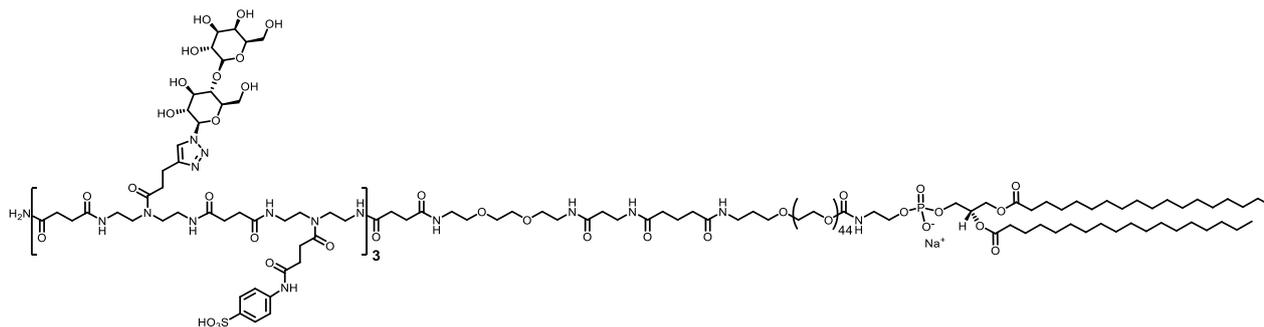
(1,3,5)-Lac-(2,4,6)-EDS-6-PEG-DSPE-Konjugat, L13



Ausbeute: 17,6 mg (48%). Umsetzung: 92%. MALDI-TOF-MS kalk. für $\text{C}_{243}\text{H}_{445}\text{N}_{27}\text{NaO}_{107}\text{P}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 5512,3; gefunden: 5512,9.

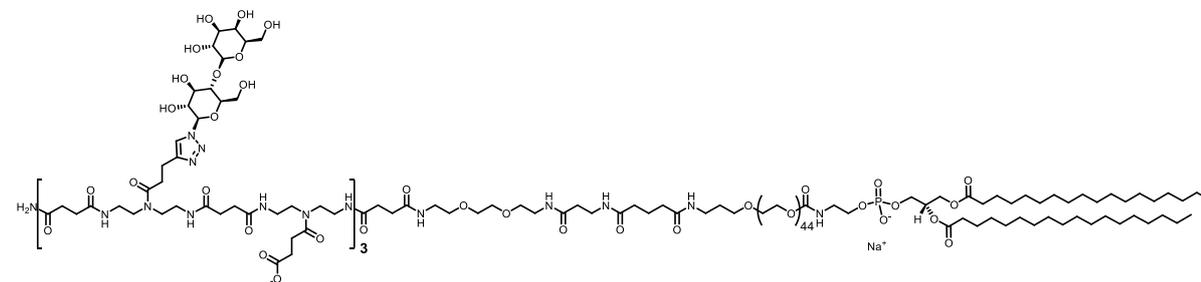
Experimentarteil

(1,3,5)-Lac-(2,4,6)-pSO₃HPh-(7)-EDS-(8)-βAla-8-PEG-DSPE-Konjugat, L14



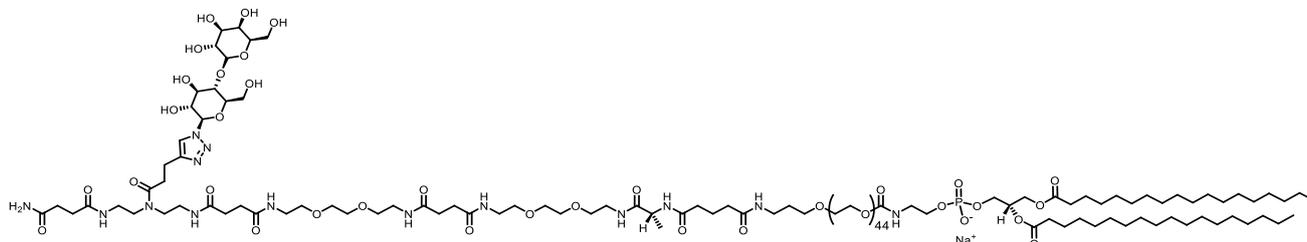
Ausbeute: 10,0 mg (29%). Umsetzung: 96%. MALDI-TOF-MS kalk. für C₂₈₀H₄₈₆N₃₆NaO₁₂₁PS₃: [M+H]⁺ 6440,1; gefunden -.

(1,3,5)-Lac-(2,4,6)-MDS-(7)-EDS-(8)-βAla-8-PEG-DSPE-Konjugat, L15



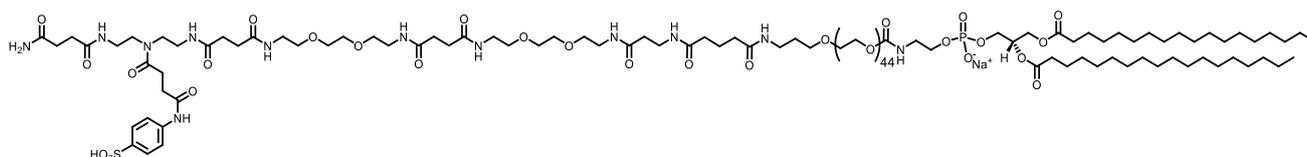
Ausbeute: 9,6 mg (13%). Umsetzung: 19%. MALDI-TOF-MS kalk. für C₂₆₅H₄₇₇N₃₃NaO₁₁₅P: [M+H]⁺ 6020,8; gefunden: 6021,6.

(1)-Lac-(2,3)-EDS-(4)-βAla-4-PEG-DSPE-Konjugat, L16



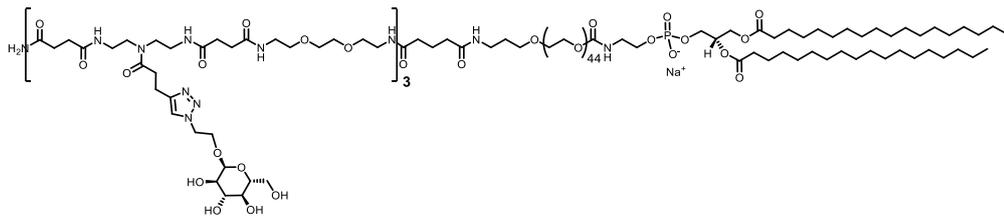
Ausbeute: 12,5 mg (34%). Umsetzung: 33%. MALDI-TOF-MS kalk. für C₁₈₆H₃₅₂N₁₄NaO₇₈P: [M+H]⁺ 4063,9; gefunden: 4064,0.

(1)-pSO₃HPh-(2,3)-EDS-(4)-βAla-4-PEG-DSPE-Konjugat, L17



Ausbeute: 17,9 mg (9%). Umsetzung: 13%. MALDI-TOF-MS kalk. für C₁₇₉H₃₃₆N₁₂NaO₇₂P: [M+H]⁺ 3895,7; gefunden: 3894,2.

(1,3,5)-Glc-(2,4,6)-EDS-6-PEG-DSPE-Konjugat, L18



Ausbeute: 14,4 mg (42 %). Umsetzung: 72%. MALDI-TOF-MS kalk. für $C_{231}H_{427}N_{27}NaO_{95}P$: $[M+H]^+$ 5158,0; gefunden: 5159,4.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kapitel der vorliegenden Arbeit basierend auf der Festphasensynthese nach Hartmann et al. (oben) mit dem übergeordneten Ziel die Untersuchung von Ligand-Protein-Interaktionen auf Membranen zu ermöglichen.....	II
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Glykokalyx und der Interaktion von Proteinen, z.B. von Bakterien, Viren oder anderen Zellen, mit den präsentierten Glykanen, die an Lipide und Proteine konjugiert vorliegen.	2
Abbildung 3: Die häufigsten natürlichen Monosaccharide: Glukose (Glc), Galaktose (Gal), N-Acetylglukosamin (GlcNAc), N-Acetylgalaktosamin (GalNAc), Fucose (Fuc), Xylose (Xyl), Sialinsäure (Neu5Ac), Glucuronsäure (GlcA), Mannose (Man) und Iduronsäure (IdoA).....	2
Abbildung 4: Schematische Struktur der Galektinklassen: A) Prototyp; B) Tandem-repeat; C) Chimera; sowie Darstellung der Proteinstruktur von Gal-3 mit den Untereinheiten der CRD (PDB ID: 1A3K).....	3
Abbildung 5: Synthetische Glykomimetika zur Ansteuerung von Gal-1 und Gal-3: Verbindung 1 – unfunktionalisiertes TDG, Verbindung 2 – TDG mit fluorsubstituiertem Aromaten an der C3-Position ⁷¹ , Verbindung 3 – TDG mit u.a. einem Sulfatsubstituenten an C2 ⁷² , Verbindung 4 – TD139 ⁷³ , Verbindung 5 – unsubstituierte Galaktose, Verbindung 6 – an C2 und C3 substituierte Galaktose ⁷⁴	5
Abbildung 6: Per Festphasensynthese erhaltene Galektinliganden unter Anwendung zwei verschiedener Strategien. A) Synthese heteromultivalenter Liganden; B) Erhöhung der Multivalenz durch Präsentation auf der Liposomoberfläche.	6
Abbildung 7: Das Prinzip der STD-NMR-Spektroskopie: Gleichgewicht der Protein-Ligand-Komplexbildung; Off-resonance-Experiment: die Ligandenprotonen werden im ¹ H-NMR-Experiment registriert; On-resonance-Messung: Die Sättigung des Proteins wird auf die an der Interaktion beteiligten Teile des Liganden übertragen, die entsprechenden Signale im ¹ H-NMR-Spektrum werden verringert; Subtraktion der aus beiden Experimenten erhaltenen ¹ H-NMR-Spektren ergibt das STD-Spektrum.	8

Abbildung 8: Beispielhafte NMR-Spektren und Verhalten eines exemplarischen Proteinsignals bei einem NMR-Experiment unter Titration von Ligand: A) schneller Austausch zwischen gebundenem und freiem Zustand des Proteins; B) langsamer Austausch zwischen gebundenem und freiem Zustand des Proteins (Nachgedruckt mit Erlaubnis von Becker, W.; Bhattiprolu, K. C.; Gubensäk, N.; Zangger, K. Investigating Protein-Ligand Interactions by Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. <i>Chemphyschem</i> 2018 , 19 (8), 895-906. DOI: 10.1002/cphc.201701253. Copyright 2018 John Wiley and Sons).	9
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Monosaccharidsequenz verschiedener Glykosaminoglykane: Hyaluronsäure (HA), Chondroitin-/Dermatansulfat (CS/DS), Keratansulfat (KS), Heparansulfat/Heparin (HS/HP) sowie die Protein-Polysaccharid-Linkersequenz GlcA- β -1,3-Gal- β -1,3-Gal- β -1,4-Xyl für CS, DS, HS und HP.	11
Abbildung 10: Unterschiedliche Arten von Sulfatierungsmustern, die die Protein-Interaktion beeinflussen können: Lokales Sulfatierungsmuster, welches positionsspezifische Sulfatierungen umfasst und globales Sulfatierungsmuster, welches durch die Abfolge unterschiedlich stark sulfatierter Domänen entsteht.	12
Abbildung 11: Pentasaccharidsequenz des Fondaparinux (Arixtra®) zur Aktivierung von AT.	14
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Mechanismen, über die HSPG und therapeutisches HP/HS die Virusinfektion beeinflussen: A) Viren nutzen HSPGs zur Anreicherung auf der Zelloberfläche und interagieren anschließend mit sekundären Rezeptoren zur Internalisierung in die Zelle; B) Viren nutzen HSPGs als Rezeptor zur Anbindung an die Zellmembran und zur Internalisierung in die Zelle; C) lösliche sGAGs können die Interaktion von Viren mit den HSPGs und somit die Infektion einer Zelle inhibieren.	16
Abbildung 13: Schematische Darstellung verschiedener Systeme zur Untersuchung von biologischen Prozessen auf der Glykokalyx: A) Eine unterstützte Membrandoppelschicht; B) ein Liposom als Protozelle; C) Manipulation der natürlichen Glykokalyx im Rahmen des Glycocalyx Engineering.	18
Abbildung 14: Beispiele für Designprinzipien von synthetischen Glykomimetika zur Ansteuerung von: A) Lektinen über einen Rezeptor-basierten Ansatz durch Präsentation essentieller terminaler Kohlenhydratepitope; B) sGAG-bindenden Proteinen, hier als Beispiel FGF2 (PDB ID: 1BFB), über einen Ligand-basierten Ansatz durch Nachahmung globaler und lokaler Strukturparameter.	20

Abbildung 15: Beispiele für Polymer-basierte sGAG-Mimetika: Polyanionen, Glykopolymere und ein Polymer mit anionischen und Kohlenhydrat-Einheiten; rot: Sulfatgruppen = Ladungen und blau: Kohlenhydratepitope.	22
Abbildung 16: Übersicht über bei der Festphasensynthese verwendete Harze, Linker, Kupplungsreagenzien und Schutzgruppen.	25
Abbildung 17: Schema der von Hartmann et al. entwickelten Festphasensynthese sequenz-definierter Glykooligo(amidoamine).	26
Abbildung 18: Maßgeschneiderte Bausteine für die Festphasensynthese funktionalisierter Oligo(amidoamine).	27
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Synthesepanung zur Gewinnung von segmentweise funktionalisierten Glykooligomeren und Oligoprolin-Hybrid-Glykooligomeren.	31
Abbildung 20: Arbeitsschritte der Linker-Etablierung: Linkerkupplung; A) Evaluation der ersten Bausteinkupplungen; B) Aufbau der ersten Teststruktur aus TDS und EDS unter Verwendung von Mannose-Azid, inkl. Sulfatierung; der Kupplungserfolg wurde durch Fmoc-Ladungsbestimmung verfolgt.	33
Abbildung 21: Auszüge der ¹ H-NMR-Spektren der erfolgreich synthetisierten Teststrukturen T1 (oben) und T2 (unten).	34
Abbildung 22: Schematische Darstellung aller GlcNAc-funktionalisierten Zielstrukturen A) global sulfatiert (1S , 2S); B) segmentweise sulfatiert (3S , 4S); C) global sulfatierte Oligoprolin-Hybrid-Struktur (5S), sowie beispielhaft die chemische Struktur für 5S	36
Abbildung 23: Syntheschema für die Herstellung segmentweise sulfatierter Glykooligomere: A) Kupplung des Fmoc-Photo-Linkers; B) Fmoc-Entschützung; C) Bausteinkupplung mit TDS oder EDS; D) falls in diesem Schritt vorgesehen, CuAAC mit GlcNAc in acetylierter oder deacetylierter Form; E) Sulfatierung der freien Hydroxylgruppen; F) Fmoc-Entschützung; G) N-Acetylierung; H) O-Deacetylierung; I) Abspaltung von der Festphase durch Bestrahlung.	38
Abbildung 24: Auszüge der ¹ H-NMR-Spektren von A) 2 ; B) 2S ; C) 4 ; D) 4S ; E) 5 ; und F) 5S ; mit grauen Kästen sind die verbleibenden Signale der anomeren Protonen der unsulfatierten Kohlenhydrate markiert, alle integrierten Signale gehören zu Protonen der Kohlenhydrate. Das Spektrum zeigt deutlich die Verschiebung der Protonensignale der Kohlenhydrat-Einheiten durch Sulfatierung oder Acetylierung (die vollständigen Spektren sind im Anhang dargestellt).	39

Abbildung 25: a) Hexaprolin p-Br-C ₆ H ₄ -Pro ₆ -OH b) Kristallstruktur von Hexaprolin (ORTEP) c) Segmentweise Seitenansicht d) Sicht entlang der Achse (Nachgedruckt mit Erlaubnis von Wilhelm, P.; Lewandowski, B.; Trapp, N.; Wennemers, H. A Crystal Structure of an Oligoproline P _{ii} -Helix, at Last. Journal of the American Chemical Society 2014 , 136 (45), 15829-15832. DOI: 10.1021/ja507405j. Copyright 2014 American Chemical Society).....	40
Abbildung 26: Vier verschiedenen Klassen von Strukturen zur Präsentation auf Liposomen: A) das Pentasaccharid Fondaparinux; B) Fondaparinux-funktionalisierte Präzisionsglykomakromoleküle; C) sGAG-mimetische sulfatierte Mannose-funktionalisierte Präzisionsglykomakromoleküle und D) sGAG-mimetische sulfatierte Mannose-funktionalisierte Polymere (Design und Synthese durch Lorand Bonda im Rahmen seiner Promotion).....	44
Abbildung 27: Synthetische Strategien zur Ligand-Lipid-Konjugation: A) Konjugation in Lösung; B) Konjugation auf der Liposomoberfläche; C) Konjugation auf der Festphase.	45
Abbildung 28: Versuche zur Fondaparinux-Lipid-Konjugation in Lösung: A) mit dem C18-Ceramid N-Stearoyl-D-erythro-sphingosin; B) mit dem Phospholipid DPPE; blau unterlegt sind die reaktiven Gruppen.....	46
Abbildung 29: Schema der Reaktion zur Funktionalisierung von vorformulierten Liposomen mit Fondaparinux zur Synthese der funktionalisierten Liposomen (6).....	49
Abbildung 30: Syntheschema für den ersten Versuch zur Synthese von Fondaparinux-funktionalisierten Präzisionsglykomakromolekülen über folgende Schritte: 1) Aufbau des Oligo(amidoamin)-Rückgrats; 2) Fmoc-Entschützung und N-Acetylierung; 3) Dde-Entschützung und Rhodaminkupplung; 4) Boc-Entschützung und Fondaparinuxkupplung; 5) Abspaltung; die Syntheseroute bietet die Möglichkeit durch spätere Modifizierung auch einen Membrananker einzubringen.....	51
Abbildung 31: Syntheserouten zur Herstellung von Fondaparinux-funktionalisierten Glykomakromolekülen unter Verwendung der Festphasensynthese zur Membrankanker-Konjugation und der Durchführung der Fondaparinux-Konjugation in Lösung über folgende Schritte: 1) Aufbau des Oligo(amidoamin)-Rückgrats; 2) Fmoc-Entschützung und Membranankereinführung; 3) Dde-Entschützung und Rhodaminkupplung; 4) Abspaltung unter sauren Bedingungen und Boc-Entschützung; 5) Fondaparinuxkupplung in Lösung.	52
Abbildung 32: ¹ H-NMR-Spektren A) des verwendeten Etherlipids; B) des Oligomers mit dem Etherlipid als Membrananker vor der Funktionalisierung; C) des Fondaparinux-Edukts; D) des	

Oligomers mit dem Etherlipid nach der Funktionalisierung mit Fondaparinux (**7**); mit blau umrandet die Kohlenhydratprotonen, in Grau die Bernsteinsäureprotonen und in Gelb die Lysin- und Lipidprotonen. 54

Abbildung 33: Schema der Synthese zweier sulfatierter Mannose-funktionalisierter Membrananker-tragender Präzisionsglykomakromoleküle: A) Sulfatiertes Mannose-funktionalisiertes Oligo(amidoamin) mit einem Membrananker aus N_{α},N_{β} -di-Fmoc-L-2,3-diaminopropionsäure (DAP) und zwei Myristinsäureketten (**9S**); B) Sulfatiertes Mannose-funktionalisiertes Oligo(amidoamin) mit Cholesterol als Membrananker (**10S**)..... 56

Abbildung 34: Übersicht über die synthetisierten sulfatierten Mannose-funktionalisierten Präzisionsglykomakromoleküle: Verbindung **9S** mit einem Membrananker bestehend aus polarem Kopf und unpolaren Alkylketten, Verbindung **10S** mit Cholesterolmembrananker, Verbindung **11S** ohne Membrananker und Verbindung **12S** ohne Rhodamin-Funktionalisierung..... 57

Abbildung 35: Auszüge der ^1H -NMR-Spektren von: A) **ZS-Oligomerrückgrat**; B) Oligomer **10**; C) Oligomer **10S**; mit rosa umrandet die aromatischen Rhodaminprotonen, mit blau umrandet die Kohlenhydratprotonen, in Grau die Bernsteinsäure- und Pentinsäureprotonen und in Gelb die Lysin- und Cholesterolprotonen. 59

Abbildung 36: Schematische Darstellung der erhaltenen membranverankerten sGAG-Mimetika und eines natürlichen HSPGs auf einer exemplarischen Membran..... 60

Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopiebilder für Fondaparinux-dekorierte Liposomen (**6**) inkubiert mit HPV16-VLPs: A) Aufgenommen im Kanal des Membranfarbstoffs; B) Aufgenommen im Kanal des zur VLP-Markierung verwendeten Farbstoffs und C) Bilder aus A und B übereinandergelegt; D) Schematische Darstellung der Interaktion der VLPs mit der Liposommembran. 61

Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopiebilder für Fondaparinux-dekorierte Liposomen (**6**) inkubiert mit MCPyV-VLPs: A) Aufgenommen im Kanal des Membranfarbstoffs; B) Aufgenommen im Kanal des zur VLP-Markierung verwendeten Farbstoffs und C) Bilder aus A und B übereinandergelegt; D) Schematische Darstellung der funktionalisierten Liposomen ohne Interaktion der VLPs. 62

Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopiebilder für Polymer-dekorierte Liposomen inkubiert mit HPV16-VLPs: A) Aufgenommen im Kanal des zur Markierung des Polymers verwendeten Rhodamin B; B) Aufgenommen im Kanal des zur VLP-Markierung verwendeten Farbstoffs und

C) Bilder aus A und B übereinandergelegt; D) Schematische Darstellung der Interaktion der VLPs mit der Liposommembran.	62
Abbildung 40: Fluoreszenzmikroskopiebilder für sGAG-Polymer-dekorierte Liposomen inkubiert mit MCPyV-VLPs: A) Aufgenommen im Kanal des zur Markierung des Polymers verwendeten Rhodamin B; B) Aufgenommen im Kanal des zur VLP-Markierung verwendeten Farbstoffs und C) Bilder aus A und B übereinandergelegt; D) Schematische Darstellung der Interaktion der VLPs mit der Liposommembran.	63
Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopiebilder für zuvor mit sGAG-Polymeren behandelte GM-95 Zellen inkubiert mit MCPyV-VLPs: A) Aufgenommen im Kanal des zur Markierung des Polymers verwendeten Rhodamin B; B) Aufgenommen im Kanal des zur VLP-Markierung verwendeten Farbstoffs und C) Bilder aus A und B übereinandergelegt; D) Schematische Darstellung der Interaktion der VLPs mit der Zellmembran.	64
Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskopiebilder für zuvor mit sGAG-Polymeren behandelte GM-95 Zellen inkubiert mit SV40-VLPs: A) Aufgenommen im Kanal des zur Markierung des Polymers verwendeten Rhodamin B; B) Aufgenommen im Kanal des zur VLP-Markierung verwendeten Farbstoffs und C) Bilder aus A und B übereinandergelegt; D) Schematische Darstellung der dekorierten Zellmembran ohne Interaktion der VLPs.	64
Abbildung 43: Designprinzip von Galektinliganden zur Studie von Interaktionen mittels ¹ H-NMR-Analytik, beispielhaft gezeigt für die Interaktion mit Gal-3.	67
Abbildung 44: Schematische Darstellung der Festphasensynthese homo- und heteromultivalenter Oligo(amidoamine): A) Fmoc-Entschützung; B) Bausteinkupplung; C) Entschützung der MDS-Seitenkette; D) Kupplung der p-Aminobenzolsulfonsäure; E) CuAAC mit dem Laktose-Azid; F) O-Deacetylierung der Kohlenhydrate; G) Abspaltung von der Festphase unter sauren Bedingungen.	68
Abbildung 45: Schematische Darstellungen der synthetisierten homo- und heteromultivalenten Oligomere: A) trivalente homo- und heterofunktionalisierte Oligomere 13 (3-Lac), 14 (3-Lac-3-SO ₃ H), 15 (3-Lac-3-COOMe); B) monovalentes Oligomer 16 (1-Lac); C) Negativkontrollen: 17 (1-SO ₃ H) und trivalentes Glukose-funktionalisiertes Oligomer 18 (3-Glc).	70
Abbildung 46: Schema der Ligand-Lipid-Konjugation unter Verwendung von DSPE-PEG-NHS und Ligand 13	72

Abbildung 47: Schematische Darstellung und kurze Erläuterung zu den STD-NMR-Messungen.	74
Abbildung 48: Bindungsepitop-Charakterisierung als Ergebnis der ¹ H-STD-NMR-Studien für die synthetisierten Laktose-funktionalisierten Liganden in der Interaktion mit hGal3 (oben) und hGal1 (unten) bei einer Galektinkonzentration von 40µM und einem Molverhältnis von 8:1 für 3-Lac (13), 3-Lac-3-pSO ₃ HPh (14) und 3-Lac-3-COOMe (15) sowie 30:1 für 1-Lac (16).....	75
Abbildung 49: Schematische Darstellung und kurze Erläuterung zu den ¹ H- ¹⁵ N-HSQC-NMR-Experimenten mit den freien Liganden in Lösung.	75
Abbildung 50: Gemessene CSP für die hGal3-CRD bei der Bindung von 3-Lac-3-pSO ₃ HPh (14) (1:1 Verhältnis, grün) bzw. bei der Interaktion mit freier Laktose (1:3 und 1:10 Verhältnis, gelb bzw. blau).	77
Abbildung 51: Schematische Darstellung und kurze Erläuterung zu den ¹ H- ¹⁵ N-HSQC-NMR-Experimenten mit Liposomen.	78
Abbildung 52: Bestimmung der Peakvolumenreduktion für die hGal-3 CRD durch Anbindung an Ligand-funktionalisierte Liposomen (hellblau) sowie die Wiederherstellung der Signalintensitäten durch Zugabe von 20 Äq. Laktose (dunkelblau). Als Kontrolle wurde zudem das Protein zusammen mit unfunktionalisierten Liposomen (PC) vermessen.	80
Abbildung 53: Schematische Darstellung der möglichen cis- und trans-Interaktionen von hGal1 mit den Liganden auf der Liposomoberfläche.	81
Abbildung 54: Cryo-EM-Aufnahmen für folgende Probenzusammensetzungen: A) 3-Lac-Lipid (L13)-funktionalisierte Liposomen mit hGal3-CRD mit schematischer Darstellung der möglichen Interaktionen; B) 3-Lac-Lipid (L13)-funktionalisierte Liposomen mit hGal1 mit schematischer Darstellung der möglichen Interaktionen; C) unfunktionalisierte Liposomen; D) unfunktionalisierte Liposomen mit hGal3-CRD und E) 3-Lac-Lipid (L13)-funktionalisierte Liposomen.	82
Abbildung 55: Repräsentative Momentaufnahmen einer 100 ns dauernden MD-Simulation in wässriger Lösung für die folgenden Situationen auf einer POPC Doppelschicht: A) drei Gal-3-Moleküle binden simultan an die drei Laktose-Einheiten von einem 3-Lac-Lipid (L13)-Molekül und B) ein Gal-1-Homodimer bindet an die äußere und die mittlere Laktose-Einheit zwei verschiedener 3-Lac-Lipid (L13)-Moleküle.	83
Abbildung 56: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 1: Etablierung eines Protokolls zur Festphasensynthese global und segmentweise sulfatierter Glykooligo(amidoamine);	

Übersicht über die hergestellten Zielstrukturen; Ergebnisse der Koagulationsassays unter Verwendung der synthetisierten Verbindungen.....	86
Abbildung 57: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 2: Fondaparinux-Funktionalisierung von Liposomen durch Grafting-to-Ansatz; Entwicklung einer Festphasensyntheseplattform zur Herstellung von Membrananker-tragenden sGAG-Oligo(amidoaminen); Erste Studien zur Verwendung Membrananker-tragender sGAGs- und sGAG-Mimetika zur Dekoration von GUVs und Zellen sowie die Untersuchungen der VLP-Anbindung an die funktionalisierten Membranen.....	88
Abbildung 58: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 3: Epitopmapping durch STD-NMR; Signalreduktion beobachtet in ^1H - ^{15}N -2D-HSQC-NMR-Experimenten; Cryo-EM- und MD-Simulationen zur weiteren Entschlüsselung intermolekularer Wechselwirkungen.	90
Abbildung 59: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung T1	140
Abbildung 60: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung T2	141
Abbildung 61: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, DMSO-d_6) von Verbindung T3 und T3S sowie dem unbehandelten Fmoc-Photo-Linker.	141
Abbildung 62: HR-MS Spektrum von Verbindung 1	142
Abbildung 63: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 1	142
Abbildung 64: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 1.58$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 1	142
Abbildung 65: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 1	143
Abbildung 66: ESI-MS von Verbindung 1S , Negativionenmodus.	143
Abbildung 67: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 1S	144
Abbildung 68: HR-MS Spektrum von Verbindung 2	144
Abbildung 69: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 2	144
Abbildung 70: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 5.43$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 2	145
Abbildung 71: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 2	145
Abbildung 72: ESI-MS von Verbindung 2S , Negativionenmodus.	145
Abbildung 73: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 2S	146
Abbildung 74: HR-MS Spektrum von Verbindung 3	146

Anhang

Abbildung 75: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 3 (kleine zusätzliche Peaks können Derivaten der Zielstruktur mit mehr oder weniger Acetylgruppen zugeordnet werden).....	146
Abbildung 76: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 9.16$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 3	147
Abbildung 77: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 3	147
Abbildung 78: ESI-MS von Verbindung 3S , Negativionenmodus.....	148
Abbildung 79: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 3S	148
Abbildung 80: HR-MS Spektrum von Verbindung 4	148
Abbildung 81: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 4	149
Abbildung 82: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 10.53$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 4	149
Abbildung 83: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 4	149
Abbildung 84: ESI-MS von Verbindung 4S , Negativionenmodus.....	150
Abbildung 85: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 4S	150
Abbildung 86: HR-MS Spektrum von Verbindung 5	150
Abbildung 87: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 5 (das Signal bei 7.53 min mit einer Fläche von 11.9% kann dem Nebenprodukt zugeordnet werden, dass durch Acetylierung nach der siebten Kupplung entstanden ist).	151
Abbildung 88: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 8.99$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 5	151
Abbildung 89: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 5	151
Abbildung 90: ESI-MS von Verbindung 5S , Negativionenmodus.....	152
Abbildung 91: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 5S	152
Abbildung 92: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung Fondaparinux-Natrium.	153
Abbildung 93: ESI-MS von Verbindung ZS-7	153
Abbildung 94: HR-MS Spektrum von Verbindung ZS-7	153
Abbildung 95: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung ZS-7	154
Abbildung 96: ESI-MS von Verbindung ZS-8	154
Abbildung 97: HR-MS Spektrum von Verbindung ZS-8	154

Abbildung 98: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung ZS-8	155
Abbildung 99: ESI-MS von Verbindung 7 , Negativionenmodus.....	155
Abbildung 100: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 7	156
Abbildung 101: ESI-MS von Verbindung 8-1 , Negativionenmodus.....	156
Abbildung 102: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 8-1	157
Abbildung 103: ESI-MS von Verbindung 8 , Negativionenmodus.....	157
Abbildung 104: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 8	158
Abbildung 105: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 17 min bei 25 °C) von Verbindung ZS-Oligomerrückgrat	158
Abbildung 106: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 9,72$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung ZS-Oligomerrückgrat	158
Abbildung 107: HR-MS Spektrum von Verbindung ZS-Oligomerrückgrat	159
Abbildung 108: ESI-MS Spektrum von Verbindung 9	159
Abbildung 109: HR-MS Spektrum von Verbindung 9	159
Abbildung 110: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 9	160
Abbildung 111: ESI-MS von Verbindung 9S , Negativionenmodus.....	160
Abbildung 112: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 9S	161
Abbildung 113: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung ZS-10	161
Abbildung 114: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 12,85$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung ZS-10	161
Abbildung 115: HR-MS Spektrum von Verbindung ZS-10	162
Abbildung 116: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (300 MHz, D_2O) von Verbindung ZS-10	162
Abbildung 117: ESI-MS Spektrum von Verbindung 10	163
Abbildung 118: HR-MS Spektrum von Verbindung 10	163
Abbildung 119: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 10	163
Abbildung 120: ESI-MS von Verbindung 10S , Negativionenmodus.....	164
Abbildung 121: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (300 MHz, D_2O) von Verbindung 10S	164
Abbildung 122: ESI-MS von Verbindung 11S , Negativionenmodus.....	165
Abbildung 123: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 11S	165
Abbildung 124: ESI-MS von Verbindung 12S , Negativionenmodus.....	166
Abbildung 125: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 12S	166

Abbildung 126: Fluoreszenzmikroskopiebilder aufgenommen im Kanal des Rhodamin B für drei beispielhafte GUVs funktionalisiert mit 9S .	166
Abbildung 127: Quantifizierung der mittleren Fluoreszenz für Gm-95-Zellen nach der Inkubation mit SV40 bzw. MCPyV-VLPs.	167
Abbildung 128: HR-MS Spektrum von Verbindung 13 .	167
Abbildung 129: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 50 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 13 .	167
Abbildung 130: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 7.37$ min (von 100 bis 50 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 13 .	168
Abbildung 131: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 13 .	168
Abbildung 132: HR-MS Spektrum von Verbindung 14 .	168
Abbildung 133: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 14 .	169
Abbildung 134: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 14 nach der Inkubation mit TFA. Die Peaks sind schmaler und schärfer im Vergleich zum Lauf aus Abbildung 133. Der Injektionspeak wird durch entstandene Salze vergrößert.	169
Abbildung 135: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 4.86$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 14 . Zugeordnet sind auch die Massen des Nebenprodukts mit einem fehlenden p-Benzolsulfonsäurerest.	169
Abbildung 136: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 14 .	170
Abbildung 137: HR-MS Spektrum von Verbindung 15 .	170
Abbildung 138: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 75 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 15 .	170
Abbildung 139: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 13.32$ min (von 100 bis 75 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 15 .	171
Abbildung 140: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 15 .	171
Abbildung 141: HR-MS Spektrum von Verbindung 16 .	171
Abbildung 142: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 16 .	172
Abbildung 143: ESI-MS Spektrum des Injektionspeaks (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 16 .	172

Abbildung 144: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 16	172
Abbildung 145: HR-MS Spektrum von Verbindung 17	173
Abbildung 146: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 17	173
Abbildung 147: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 2.30$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 17	173
Abbildung 148: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 17	174
Abbildung 149: HR-MS Spektrum von Verbindung 18	174
Abbildung 150: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 50 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 18	174
Abbildung 151: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 8.03$ min (von 100 bis 50 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 18	175
Abbildung 152: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 18	175
Abbildung 153: ^1H -NMR Spektrum von Verbindung L13	176
Abbildung 154: MALDI-TOF-MS Spektrum von Verbindung L13	176
Abbildung 155: ^1H -NMR Spektrum von Verbindung L14	177
Abbildung 156: ^1H -NMR Spektrum von Verbindung L15	177
Abbildung 157: MALDI-TOF-MS Spektrum von Verbindung L15	178
Abbildung 158: ^1H -NMR Spektrum von Verbindung L16	178
Abbildung 159: MALDI-TOF-MS Spektrum von Verbindung L16	179
Abbildung 160: ^1H -NMR Spektrum von Verbindung L17	179
Abbildung 161: MALDI-TOF-MS Spektrum von Verbindung L17	180
Abbildung 162: ^1H -NMR Spektrum von Verbindung L18	180
Abbildung 163: MALDI-TOF-MS Spektrum von Verbindung L18	181
Abbildung 164: ^1H -STD-NMR-Spektren der Interaktion der Glykomakromoleküle mit Gal-3 (volle Länge) (oben) und Gal-1 (unten) (Daten erstellt am CICbioGUNE).....	182
Abbildung 165: ^1H - ^{15}N -TROSY-NMR-Spektrum von Gal-1 (106 μM) nach Zugabe von 10 Äq. von 3-Lac-3- SO_3H (14) (Daten erstellt am CICbioGUNE).....	182
Abbildung 166: ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrum von Gal-3 (50 μM) nach Zugabe von nackten Liposomen (PC LUV) bzw. von Liposomen funktionalisiert mit: L13 , L14 , L15 , L16 , L17 und L18 (Daten erstellt am CICbioGUNE).....	183

Anhang

Abbildung 167: ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrum von Gal-1 (50 μM) nach Zugabe von nackten Liposomen (PC LUV) bzw. von Liposomen funktionalisiert mit: L13 , L14 , L15 , L16 , L17 und L18 (Daten erstellt am CICbioGUNE).....	184
Abbildung 168: Full-atom Modell des Lipidkonjugats L13 verankert in einer POPC Lipiddoppelschicht und mit drei angebondenen Gal-3-Molekülen, die die Laktose-Einheiten binden (Daten erstellt am CICbioGUNE).....	185
Abbildung 169: Analyse von Gal-3 gebunden an L13 einer POPC-Doppelschicht durch MD Simulationen. Jede Laktose-Einheit bindet ein Gal-3-Molekül. Links: charakteristische Wasserstoffbrückenbindungen und CH/ π -Interaktionen; Rechts: die Geometrie der β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-glykosidischen Bindung (Daten erstellt am CICbioGUNE).....	185
Abbildung 170: Analyse von Gal-1 gebunden an L13 einer POPC-Doppelschicht durch MD Simulationen. Jede Laktose-Einheit bindet ein Gal-3-Molekül. Links: charakteristische Wasserstoffbrückenbindungen und CH/ π -Interaktionen; Rechts: die Geometrie der β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-glykosidischen Bindung (Daten erstellt am CICbioGUNE).....	186

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sulfatierungsgrade bestimmt über EA und ^1H -NMR-Analytik sowie Ausbeuten für die synthetisierten sulfatierten GlcNAc-Oligo(amidoamine).	37
Tabelle 2: Gemessene APTT für das unsulfatierte (US) octavalente Glykooligomer 2 , die global sulfatierten (GS) Glykooligomere 1S und 2S , das segmentweise sulfatierte (SWS) octavalente Glykooligomer 4S , das global sulfatierte Oligoprolin-Hybrid-Oligomer, für Heparin und für einen Blank, bei dem lediglich Puffer zugesetzt wurde.....	41
Tabelle 3: Zusammensetzung und Ergebnisse der DLS- sowie Zetapotentialmessungen für drei getestete Liposomformulierungen unter Verwendung von DPPE sowie die Analyseergebnisse für die Liposomen mit einem Verhältnis von 60/30/10 nach der Funktionalisierung mit Fondaparinux.	48
Tabelle 4: Sulfatierungsgrade bestimmt über Elementaranalyse und Ausbeuten für die hergestellten sulfatierten Mannoseoligo(amidoamine) 9S bis 12S	58

Tabelle 5: Relative Reinheiten (bestimmt über Integration des UV-Signals bei $\lambda = 214$ nm), Ausbeuten und HR-ESI-MS-Ergebnisse der synthetisierten Oligo(amidoamine) 13 bis 18 zur Studie von Galektin-Ligand-Wechselwirkungen.	70
Tabelle 6: Umsätze, Ausbeuten und MALDI-TOF-MS-Ergebnisse für die Ligand-Lipid-Konjugation der Liganden 13 bis 18 mit DSPE-PEG-NHS.....	72
Tabelle 7: Zur Liposomherstellung verwendete Ansatzgrößen.	107
Tabelle 8: Zusammensetzung und Ergebnisse der DLS- sowie Zetapotentialmessungen für eine Liposomformulierung vor und nach der Funktionalisierung mit Fondaparinux.	108

6.3 Analytik

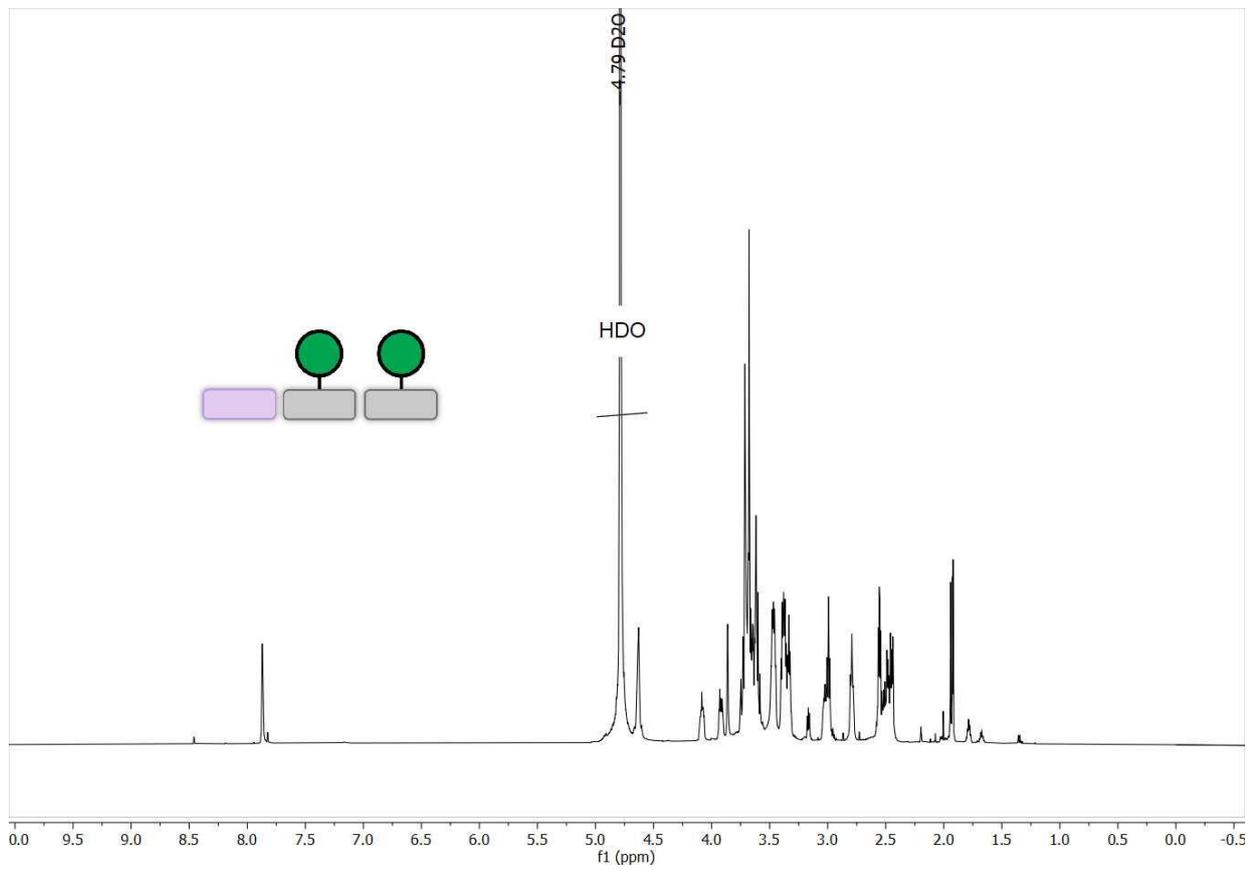


Abbildung 59: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung **T1**.

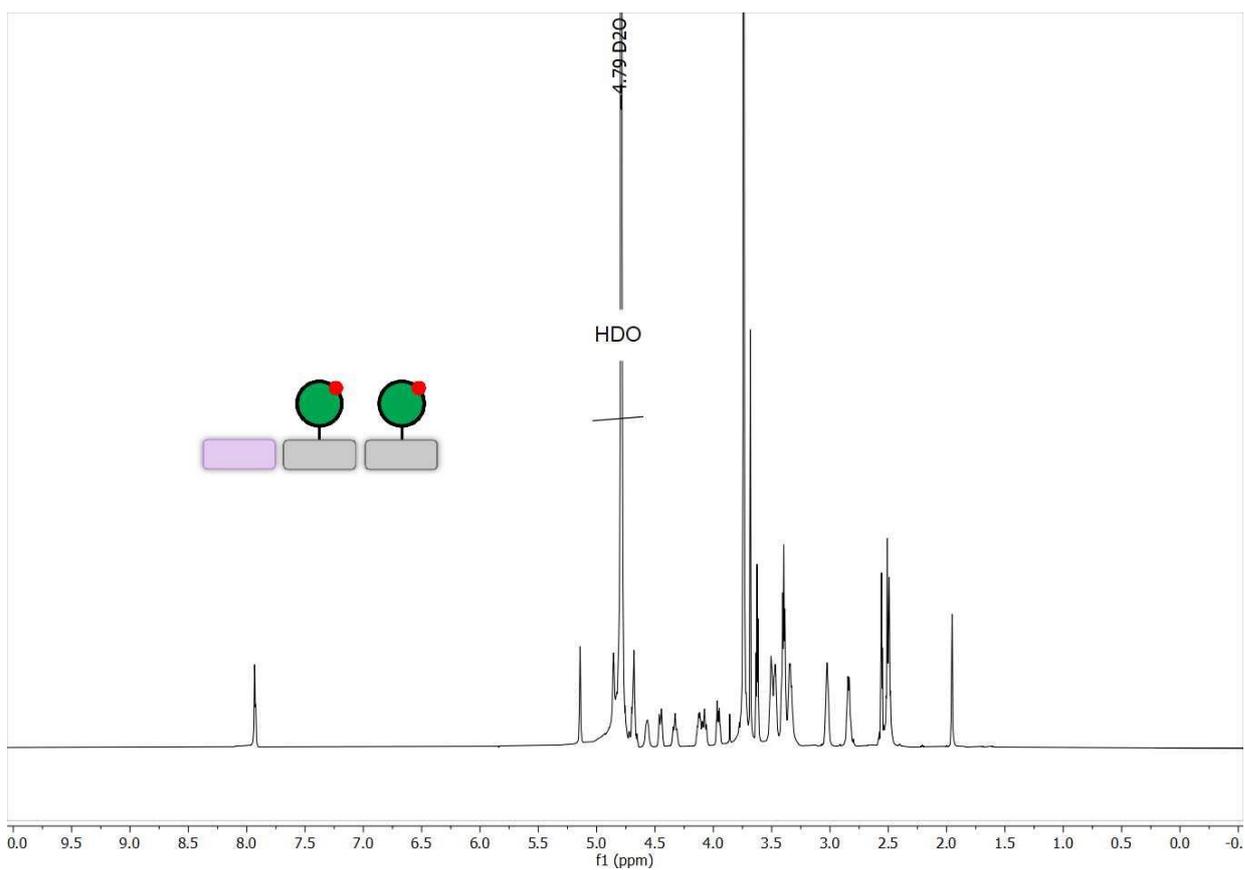


Abbildung 60: ¹H-NMR Spektrum (600 MHz, D₂O) von Verbindung T2.

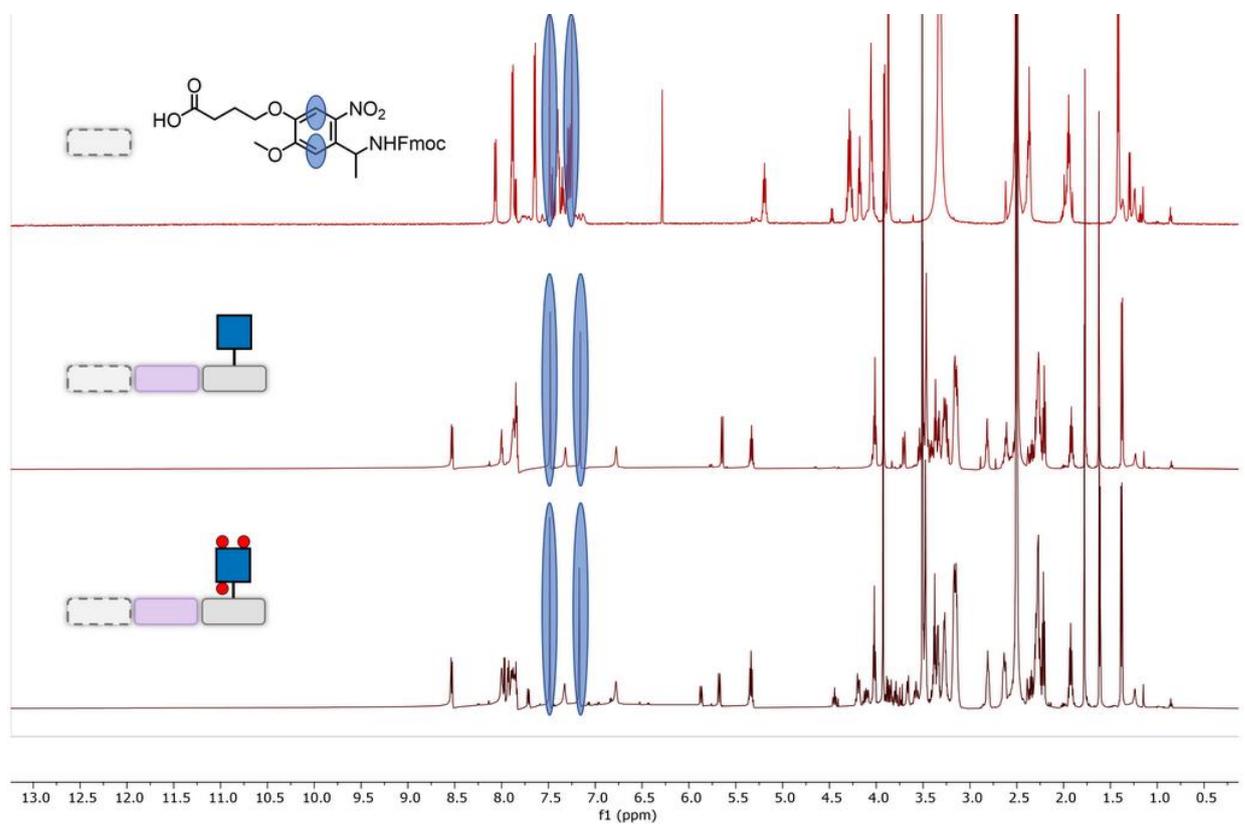


Abbildung 61: ¹H-NMR Spektrum (600 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung T3 und T3S sowie dem unbehandelten Fmoc-Photo-Linker.

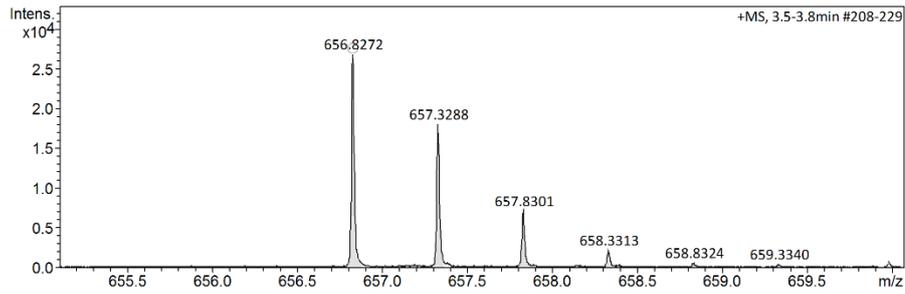


Abbildung 62: HR-MS Spektrum von Verbindung 1.

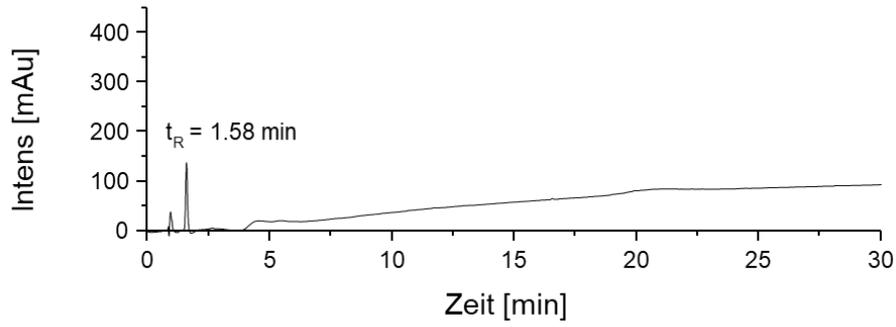


Abbildung 63: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 1.

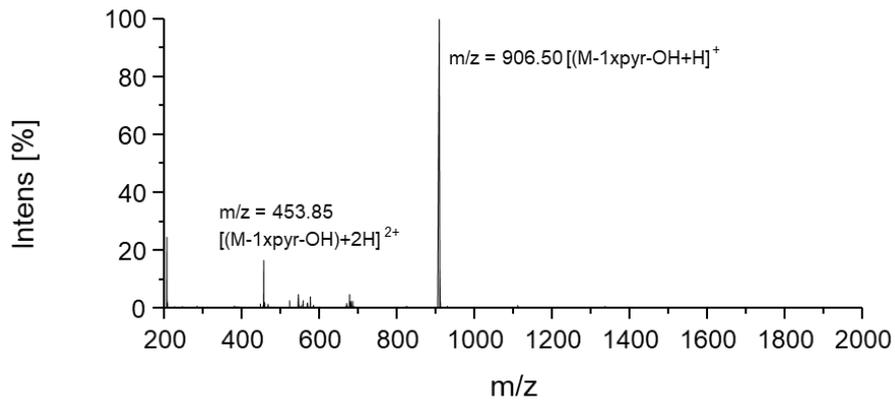


Abbildung 64: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 1.58$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 1.

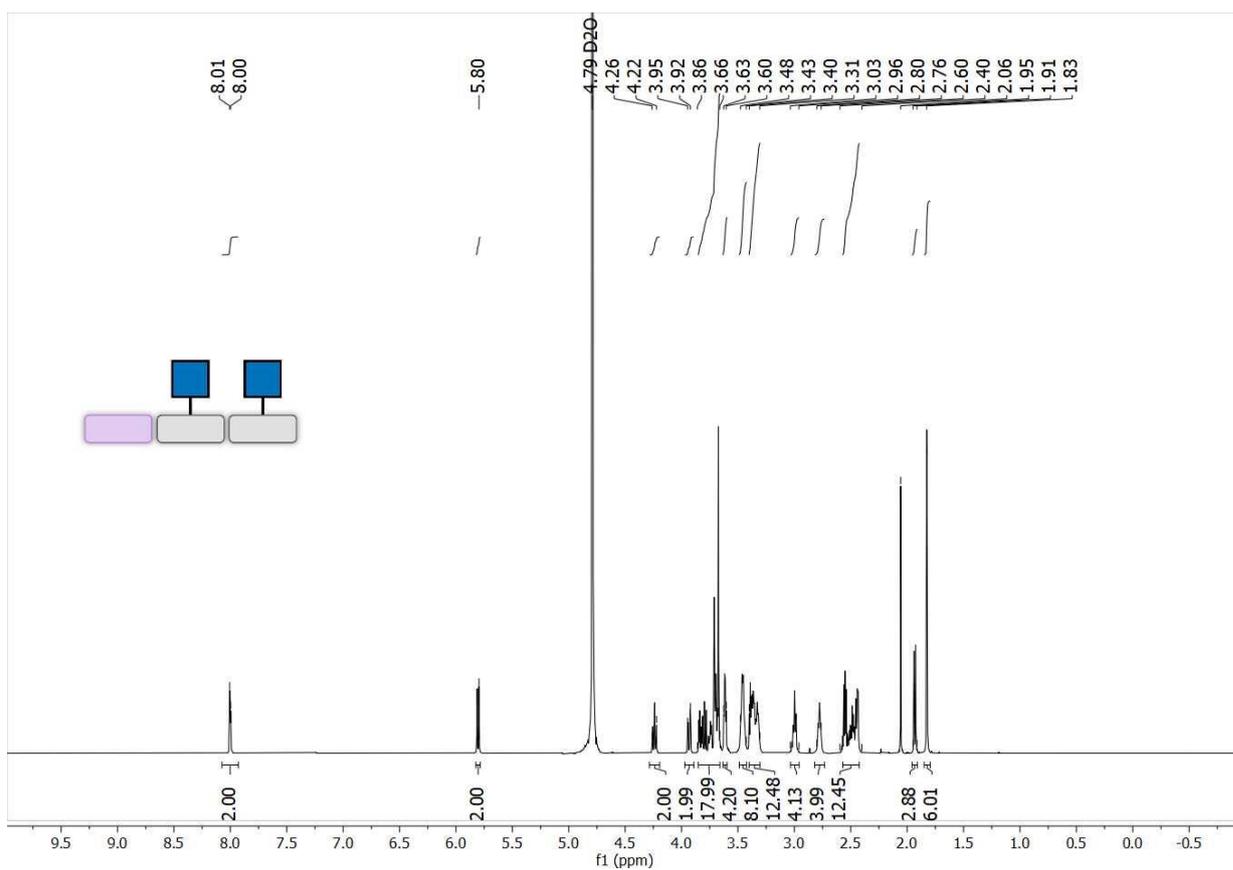


Abbildung 65: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 1.

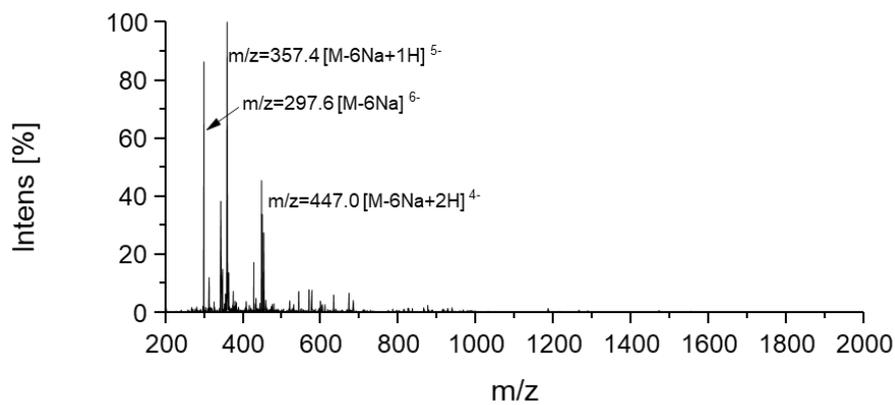


Abbildung 66: ESI-MS von Verbindung 1S, Negativionenmodus.

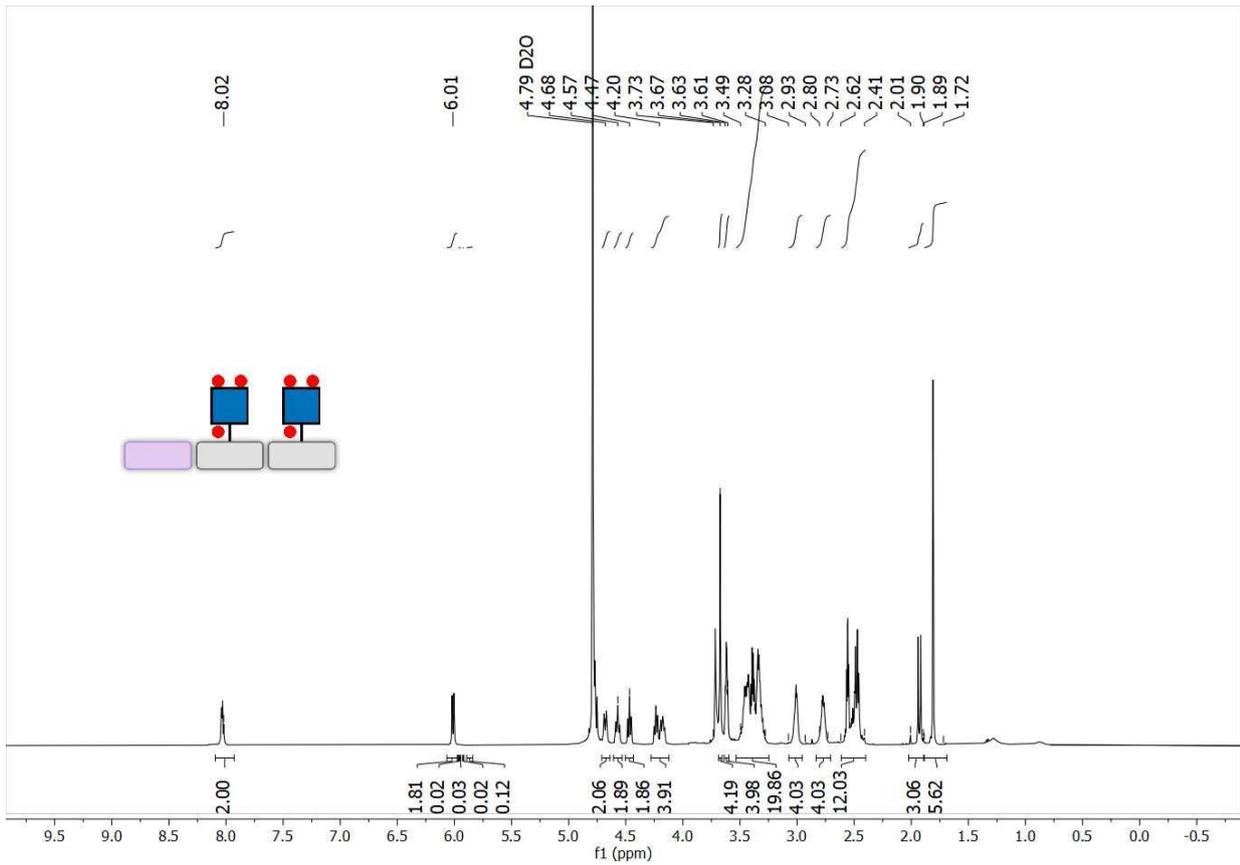


Abbildung 67: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 1S.

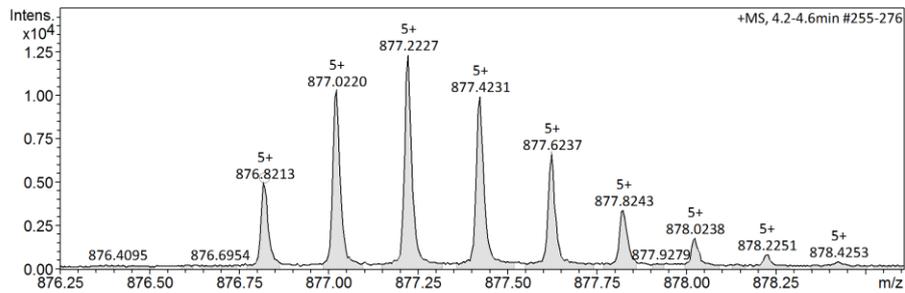


Abbildung 68: HR-MS Spektrum von Verbindung 2.

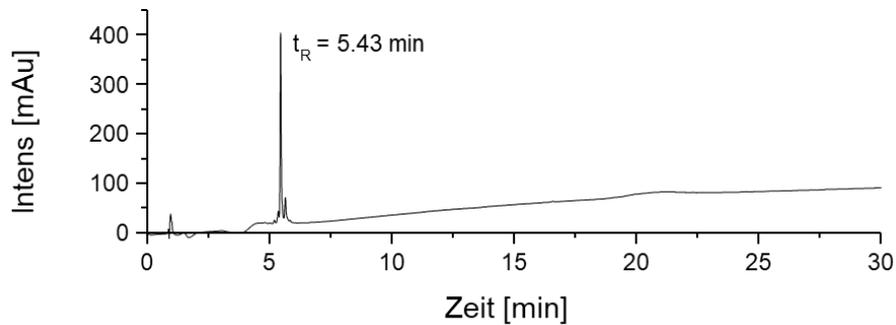


Abbildung 69: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 2.

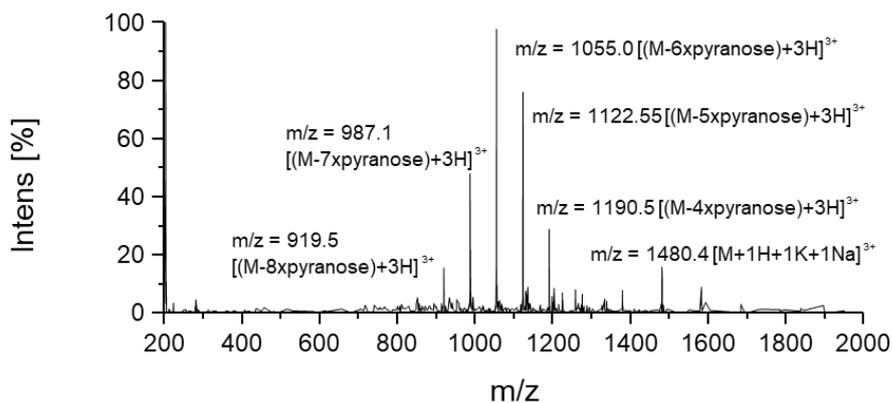


Abbildung 70: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 5.43$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 2.

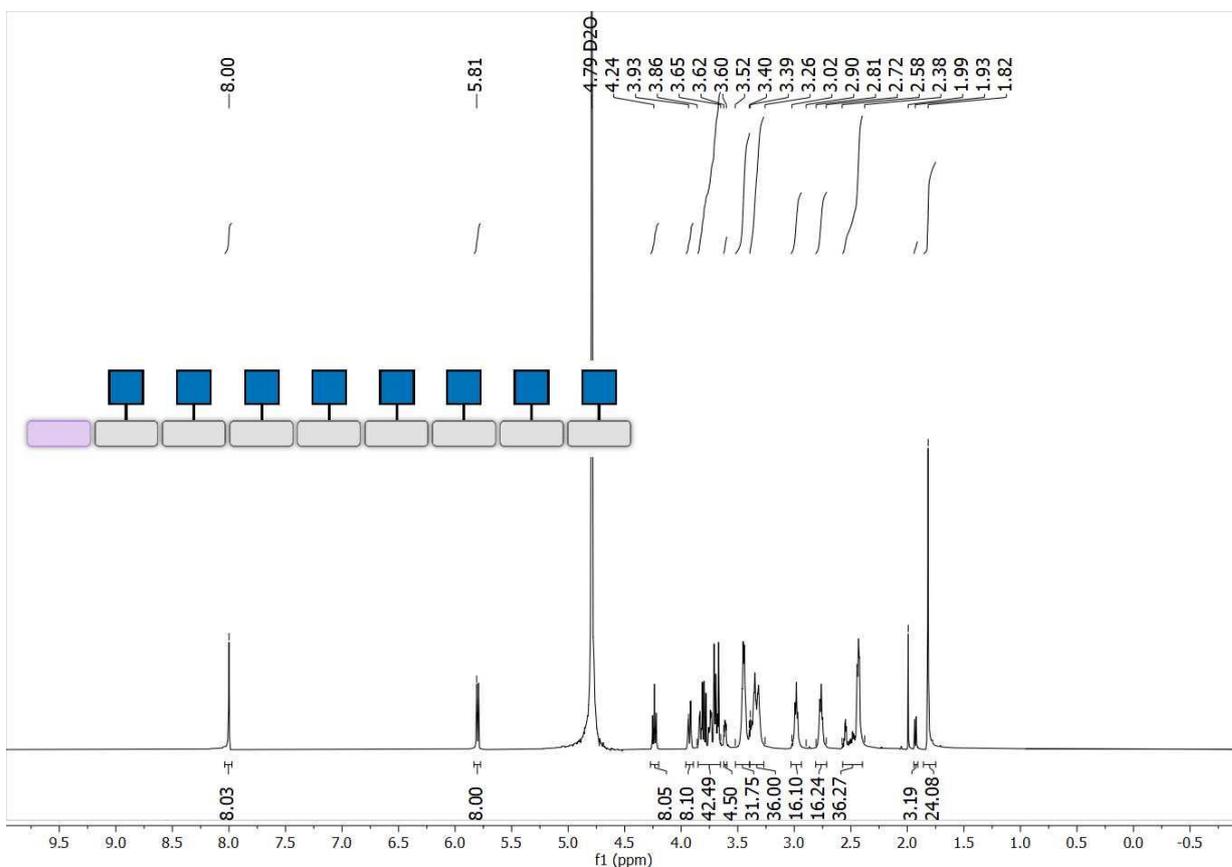


Abbildung 71: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 2.

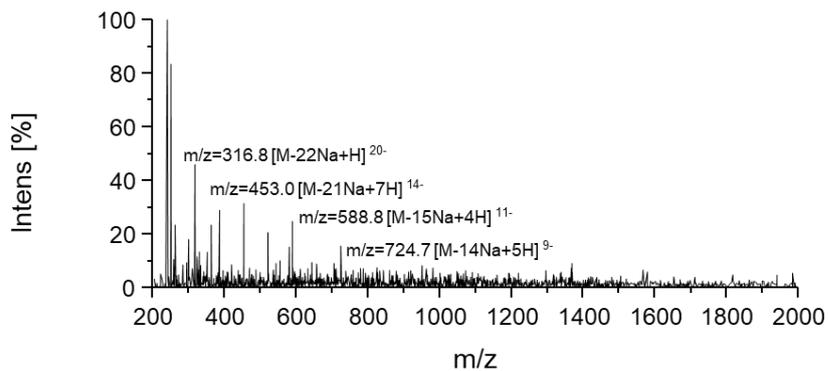


Abbildung 72: ESI-MS von Verbindung 25, Negativionenmodus.

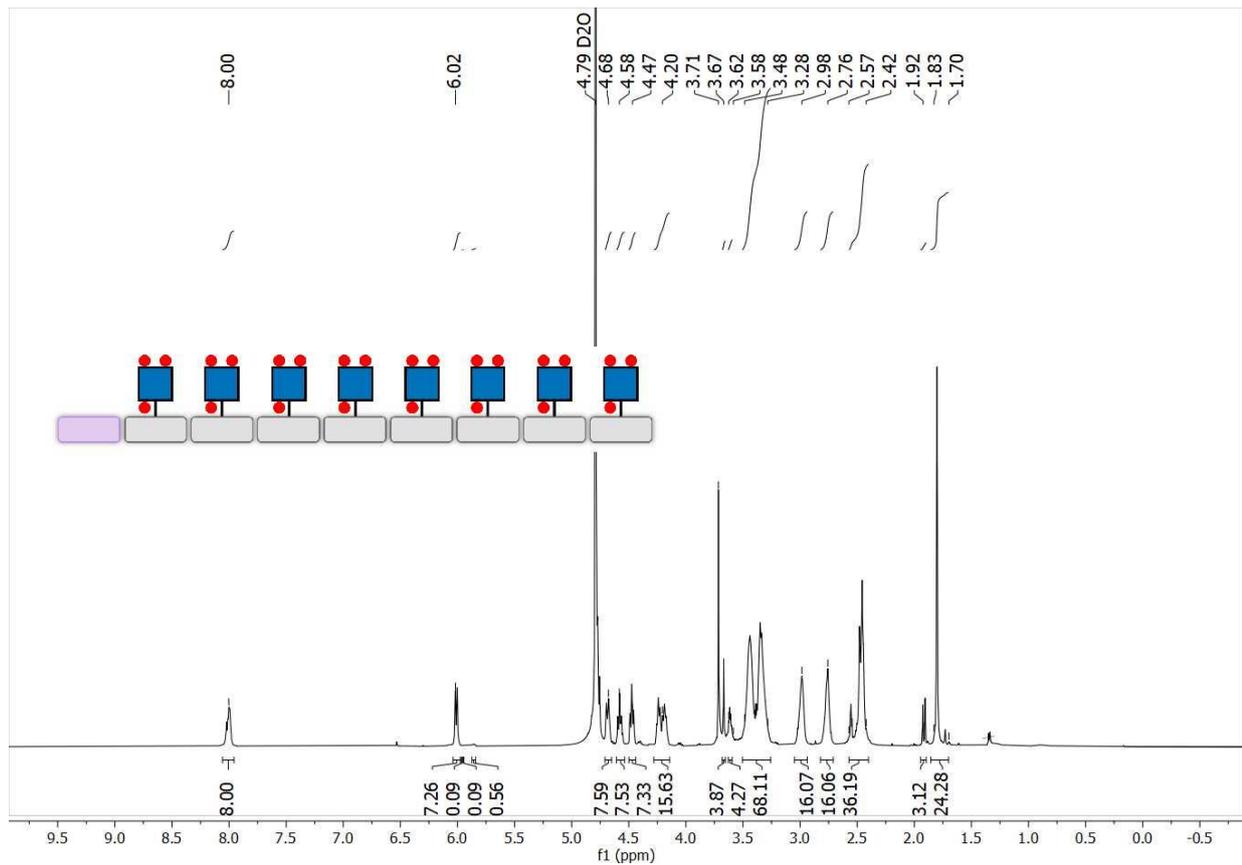


Abbildung 73: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 2S.

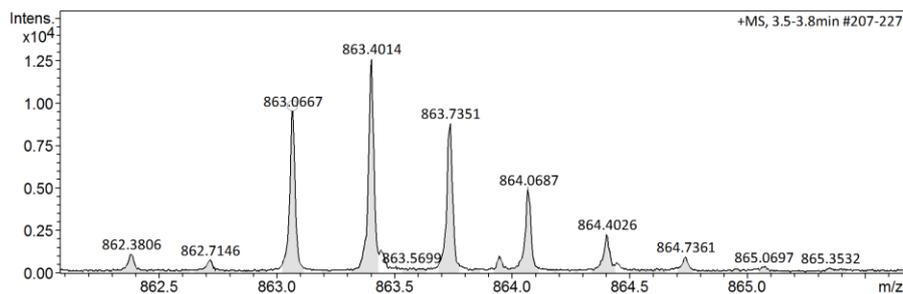


Abbildung 74: HR-MS Spektrum von Verbindung 3.

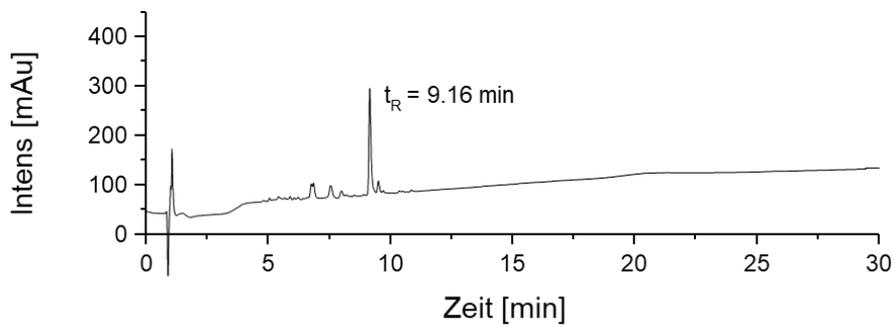


Abbildung 75: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 3 (kleine zusätzliche Peaks können Derivaten der Zielstruktur mit mehr oder weniger Acetylgruppen zugeordnet werden).

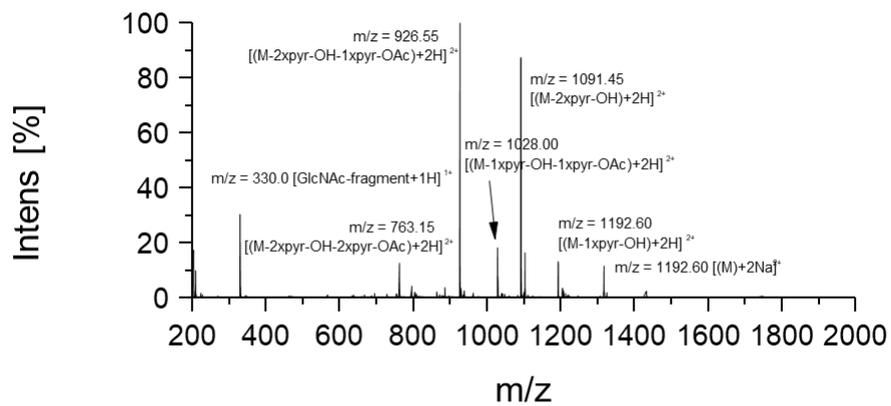


Abbildung 76: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 9.16$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 3.

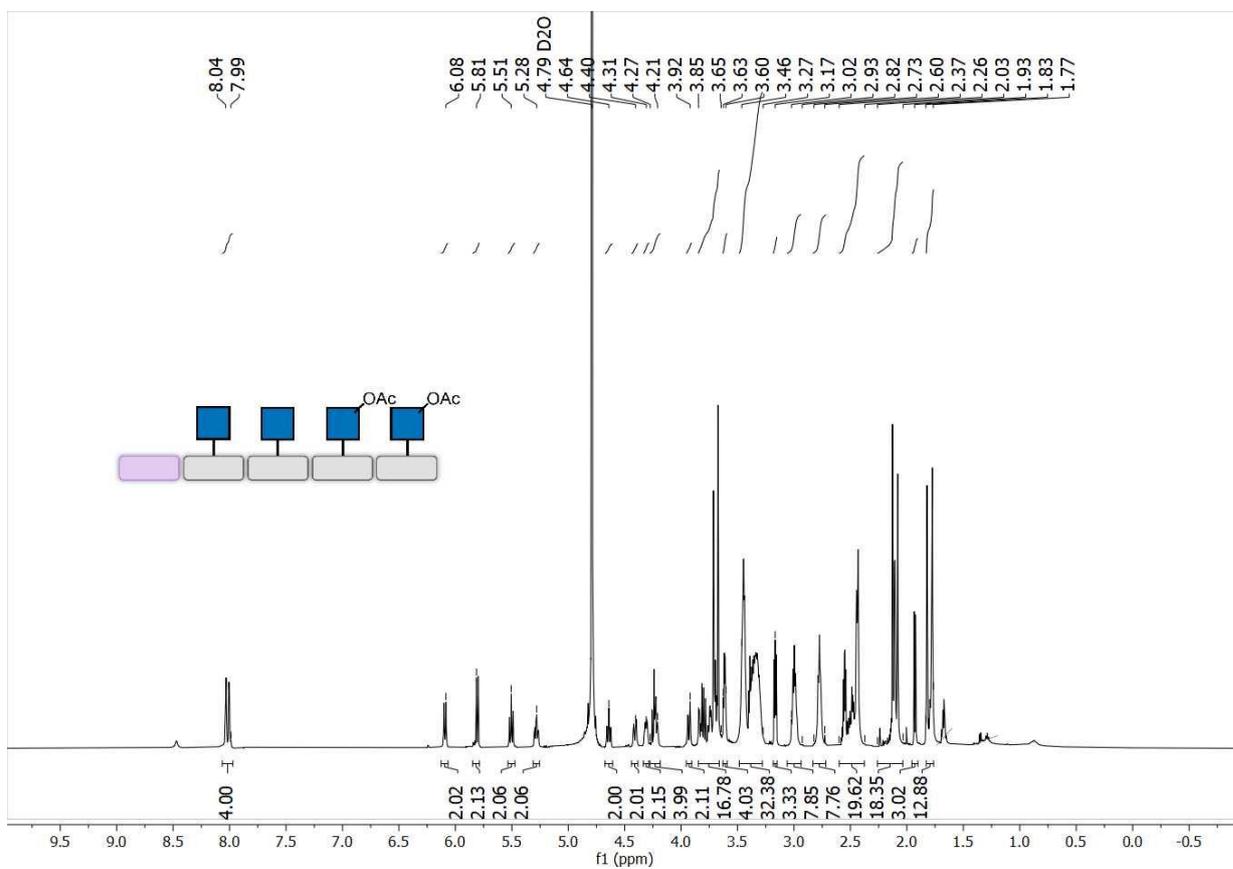


Abbildung 77: 1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 3.

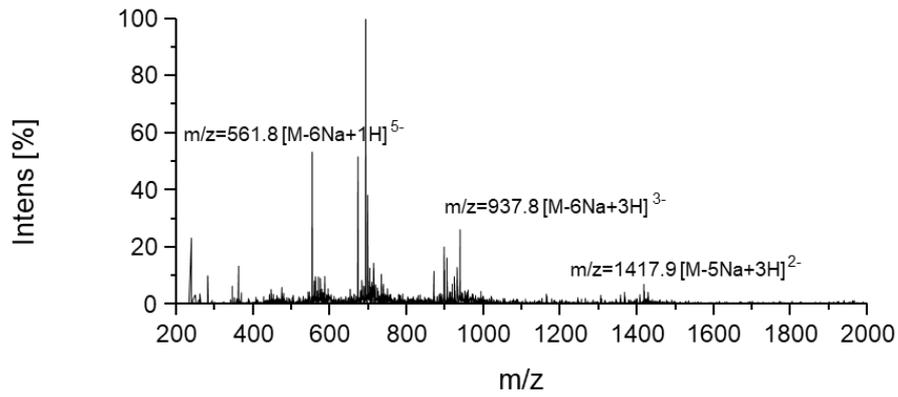


Abbildung 78: ESI-MS von Verbindung **3S**, Negativionenmodus.

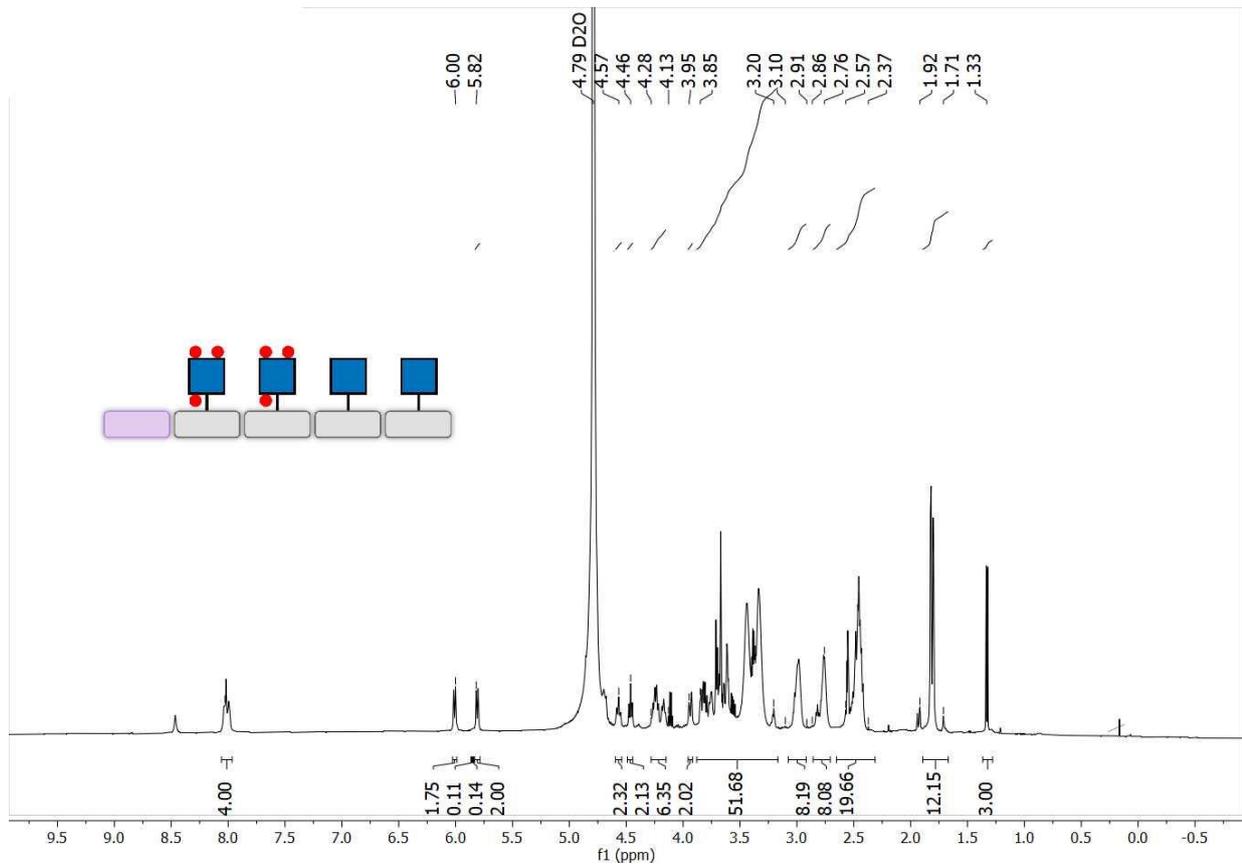


Abbildung 79: ¹H-NMR Spektrum (600 MHz, D₂O) von Verbindung **3S**.

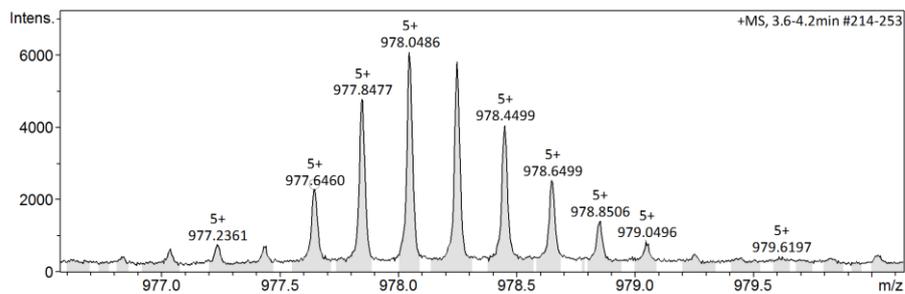


Abbildung 80: HR-MS Spektrum von Verbindung **4**.

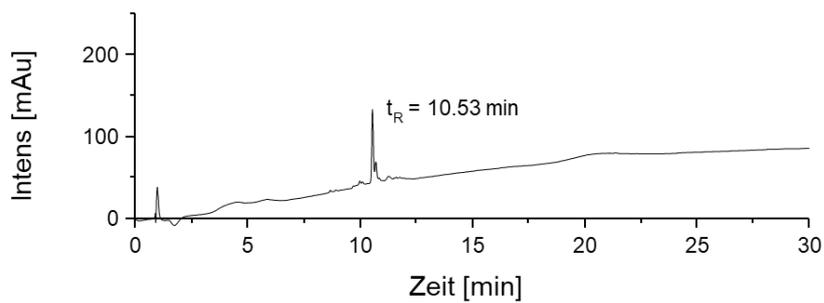
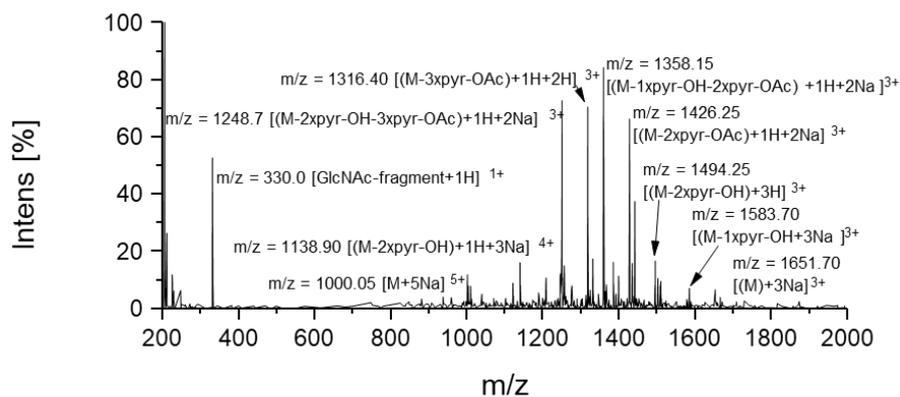
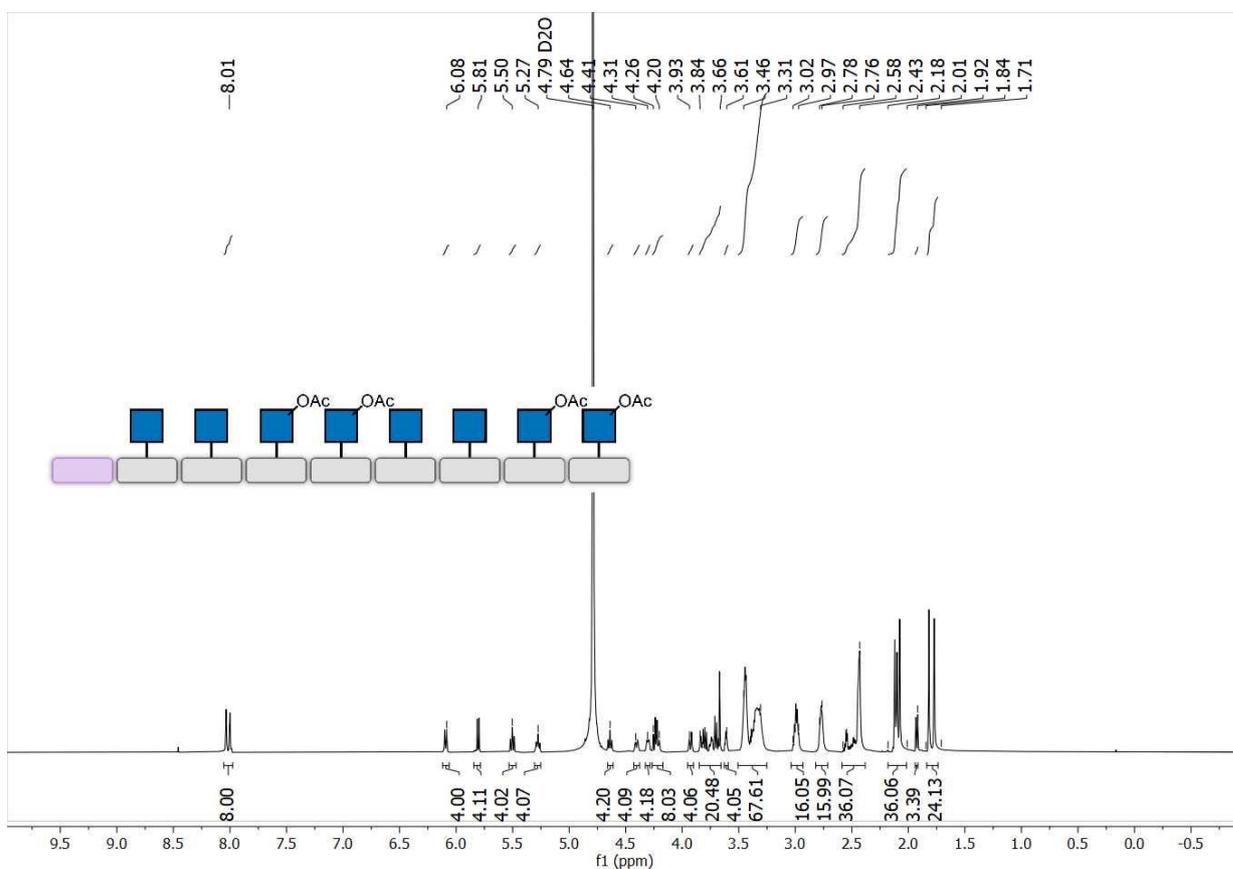


Abbildung 81: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 4.

Abbildung 82: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 10.53$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 4.Abbildung 83: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 4.

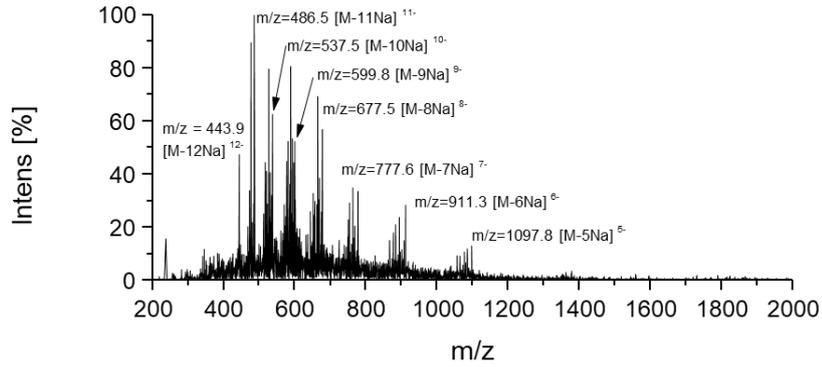


Abbildung 84: ESI-MS von Verbindung 4S, Negativionenmodus.

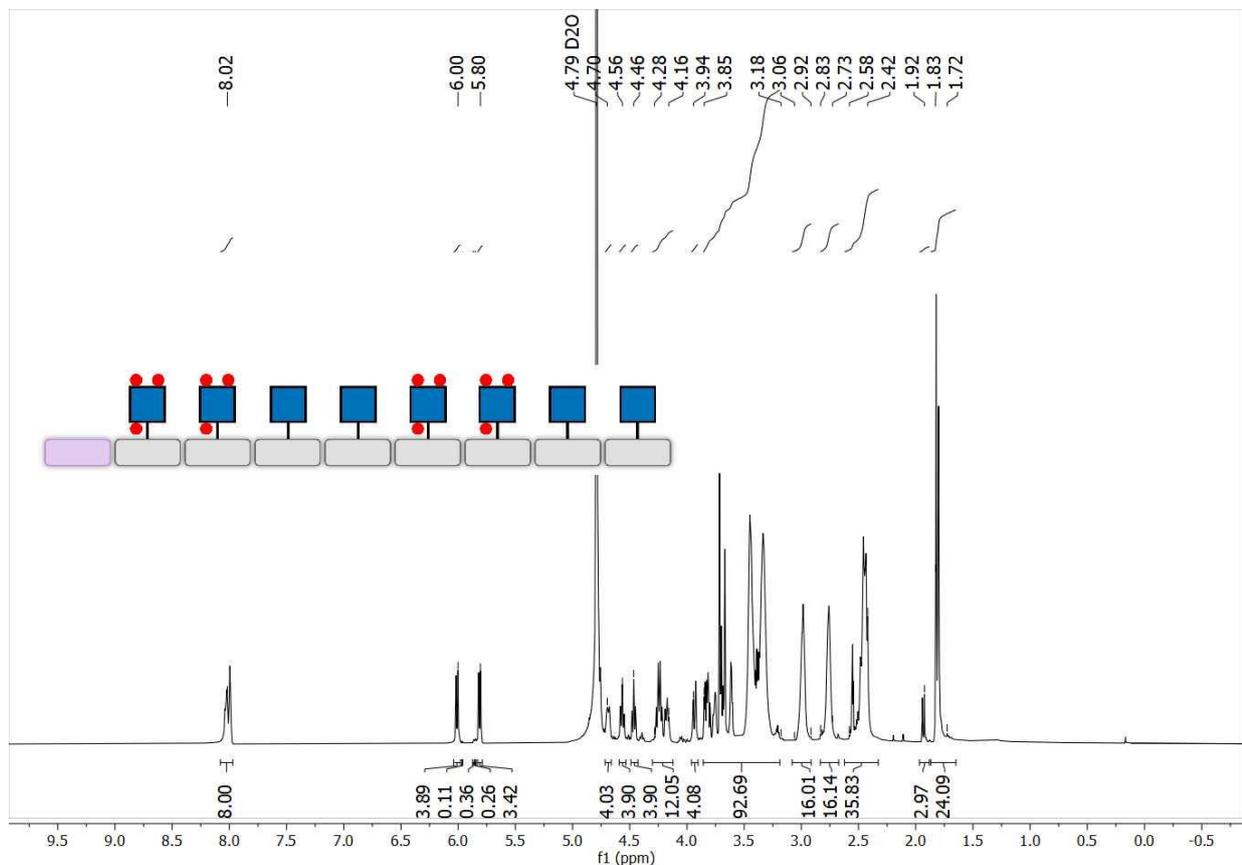


Abbildung 85: ¹H-NMR Spektrum (600 MHz, D₂O) von Verbindung 4S.

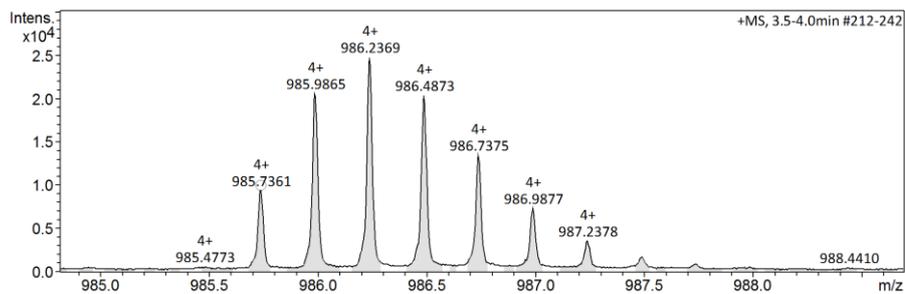


Abbildung 86: HR-MS Spektrum von Verbindung 5.

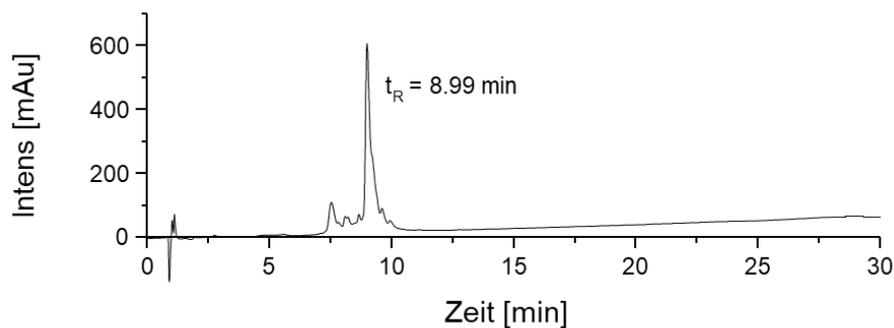


Abbildung 87: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 5 (das Signal bei 7.53 min mit einer Fläche von 11.9% kann dem Nebenprodukt zugeordnet werden, dass durch Acetylierung nach der siebten Kupplung entstanden ist).

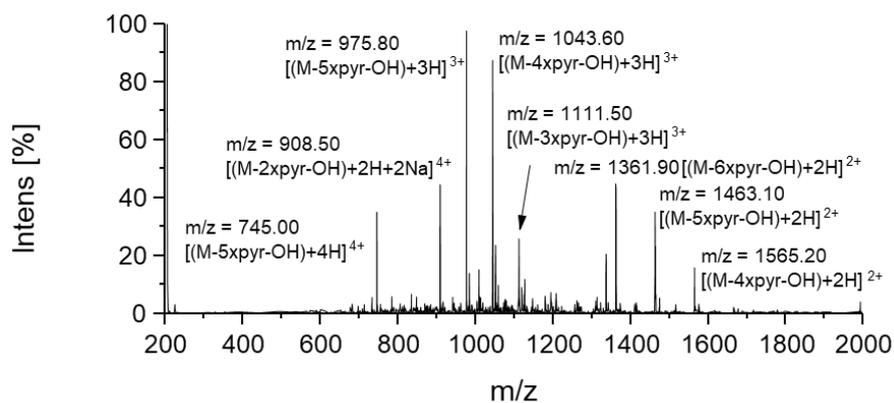


Abbildung 88: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 8.99$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 5.

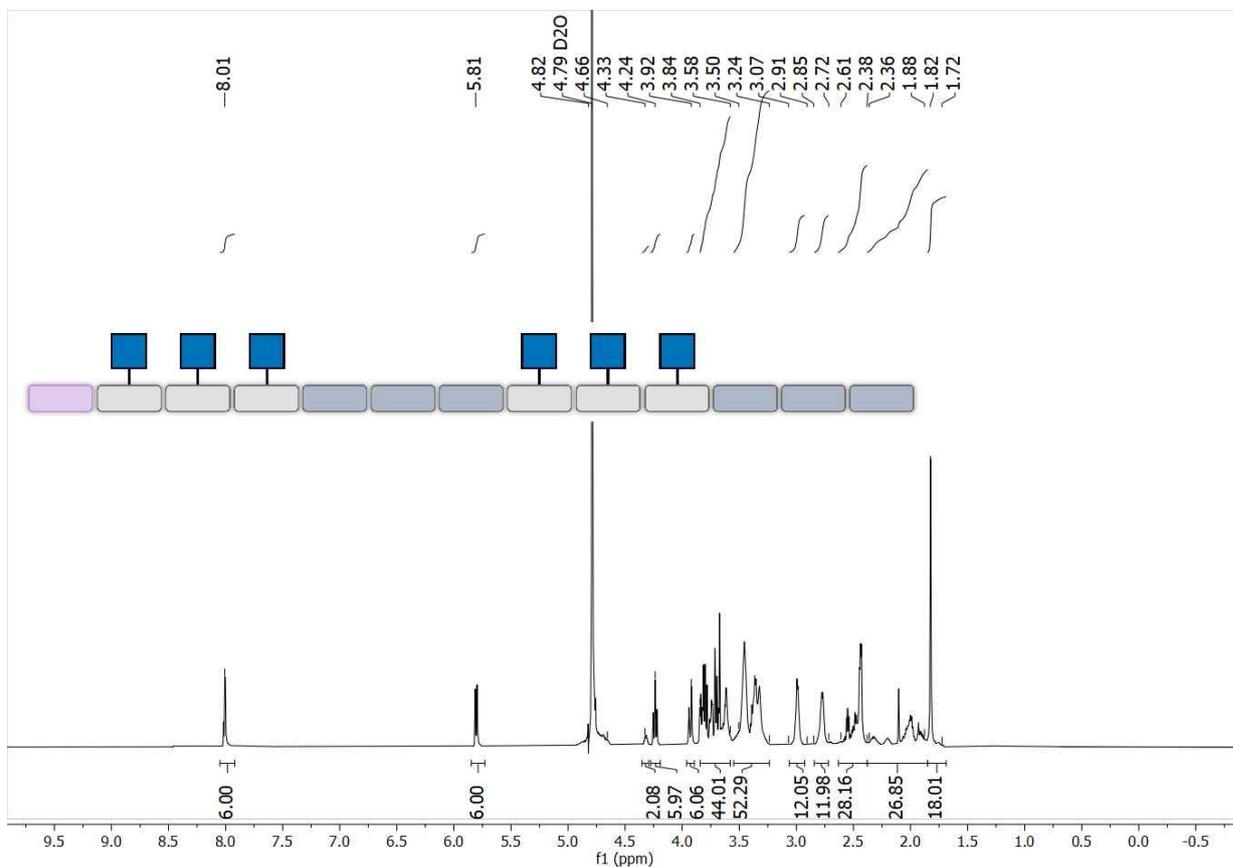


Abbildung 89: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 5.

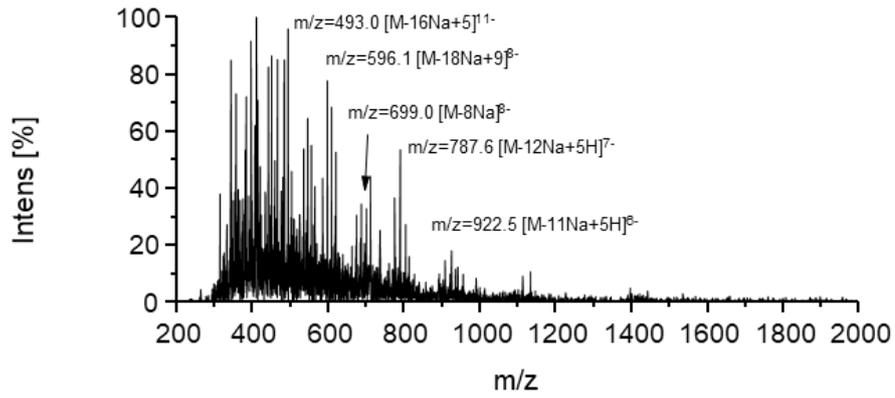


Abbildung 90: ESI-MS von Verbindung 5S, Negativionenmodus.

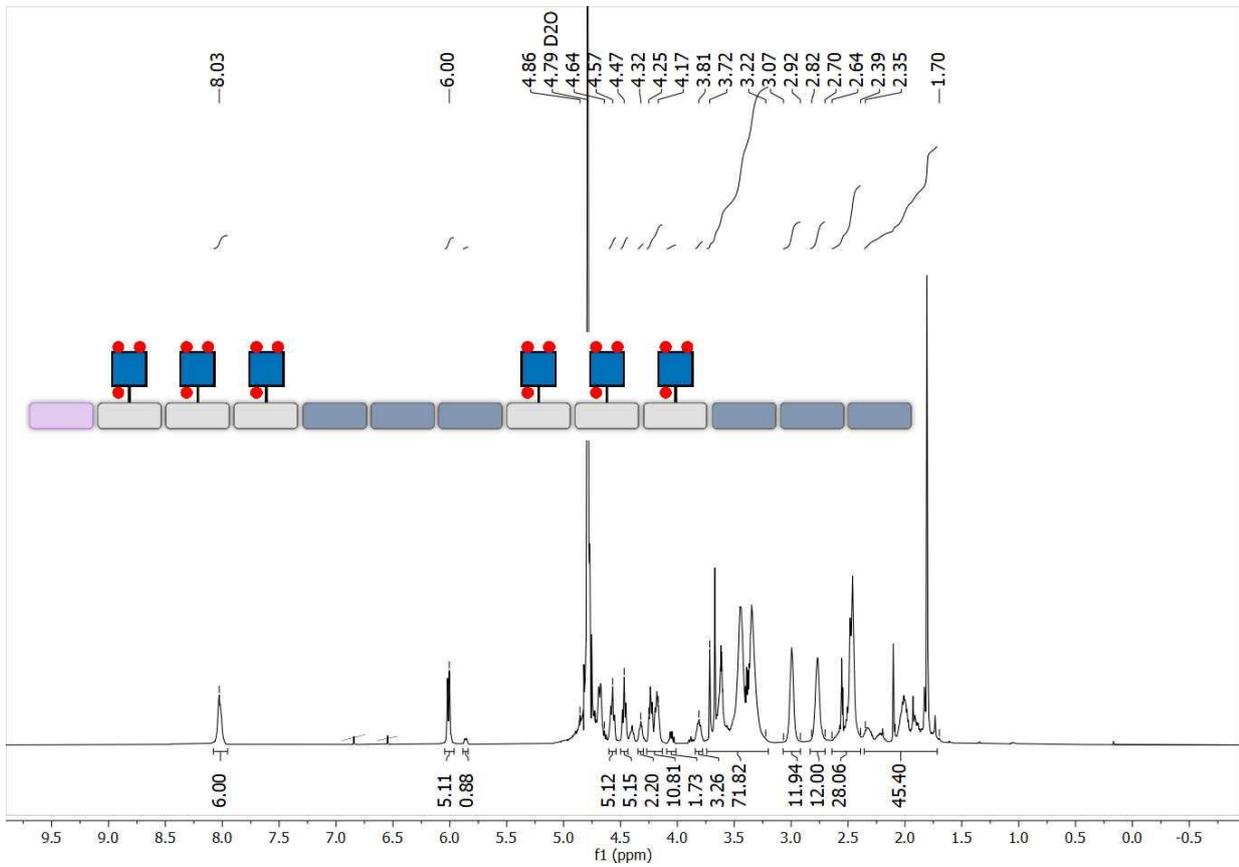


Abbildung 91: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 5S.

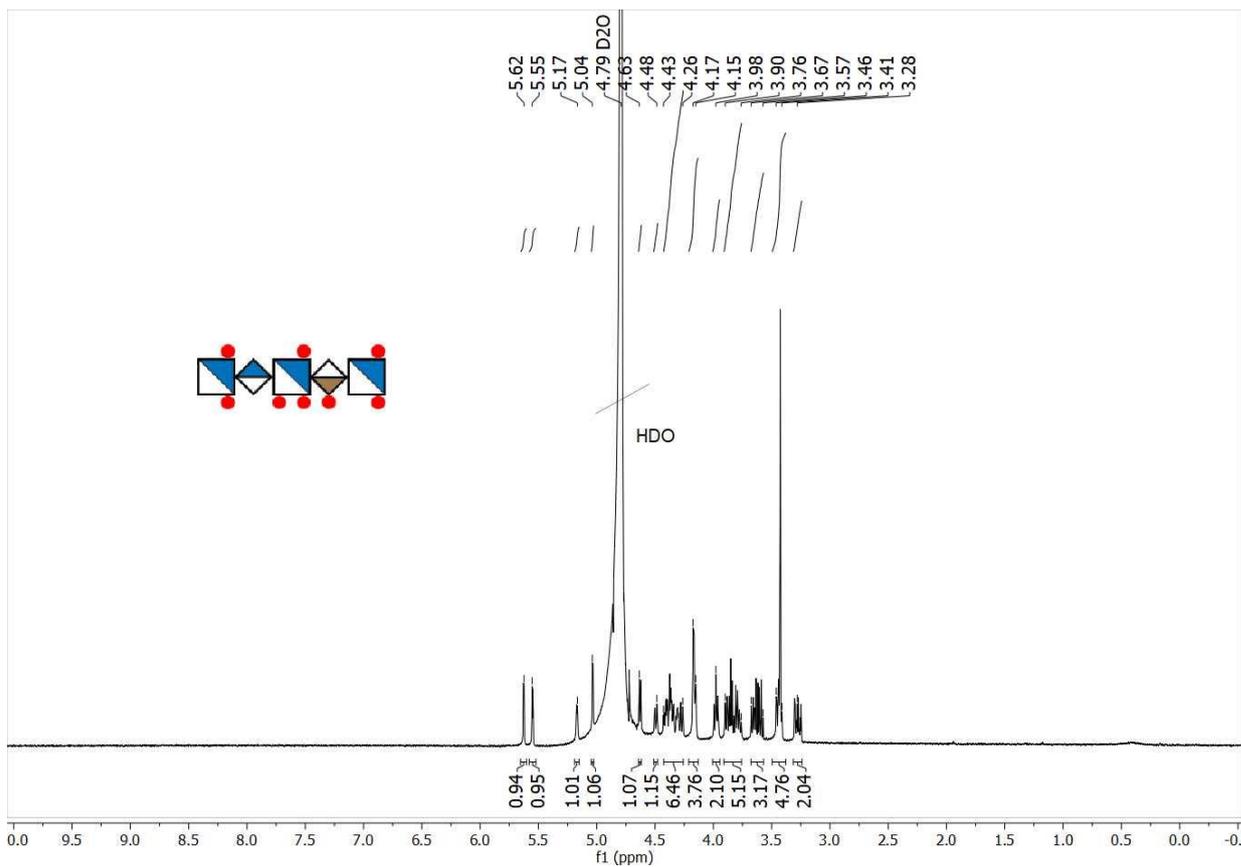
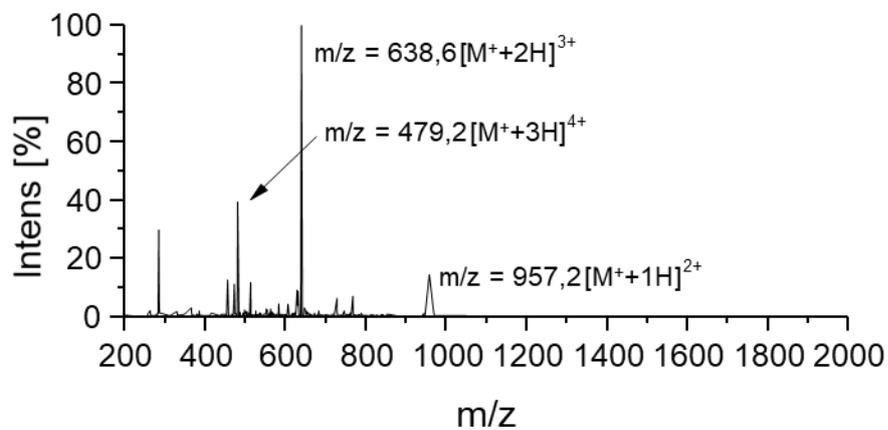
Abbildung 92: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung Fondaparinux-Natrium.

Abbildung 93: ESI-MS von Verbindung ZS-7.

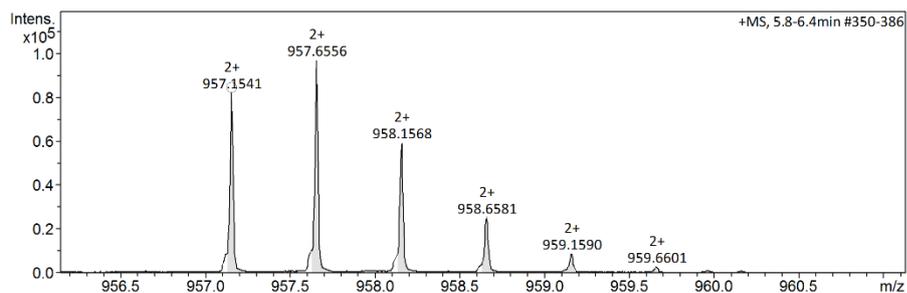


Abbildung 94: HR-MS Spektrum von Verbindung ZS-7.

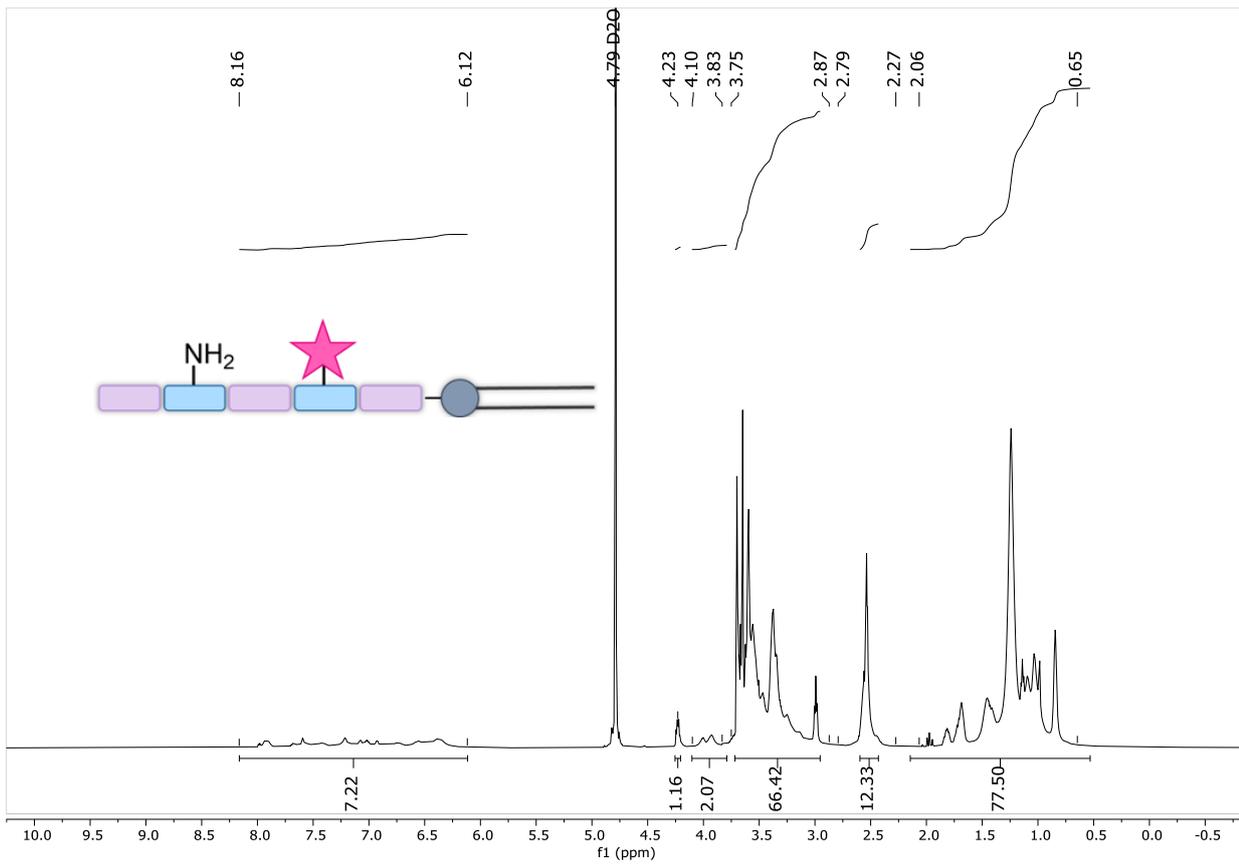


Abbildung 95: ¹H-NMR Spektrum (600 MHz, D₂O) von Verbindung ZS-7.

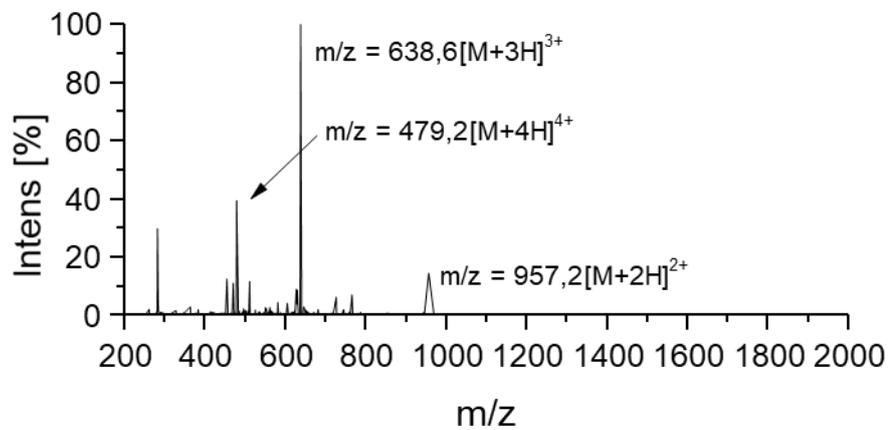


Abbildung 96: ESI-MS von Verbindung ZS-8.

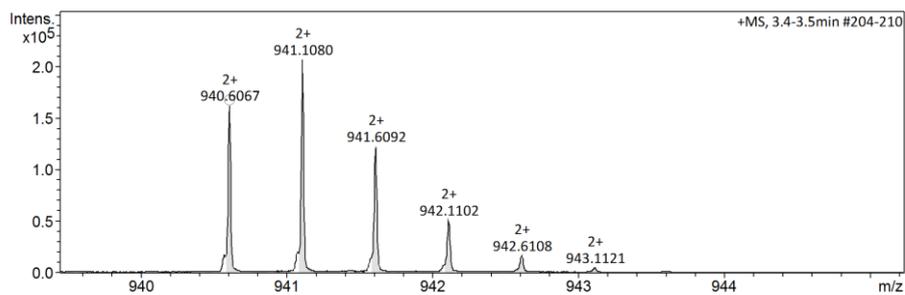


Abbildung 97: HR-MS Spektrum von Verbindung ZS-8.

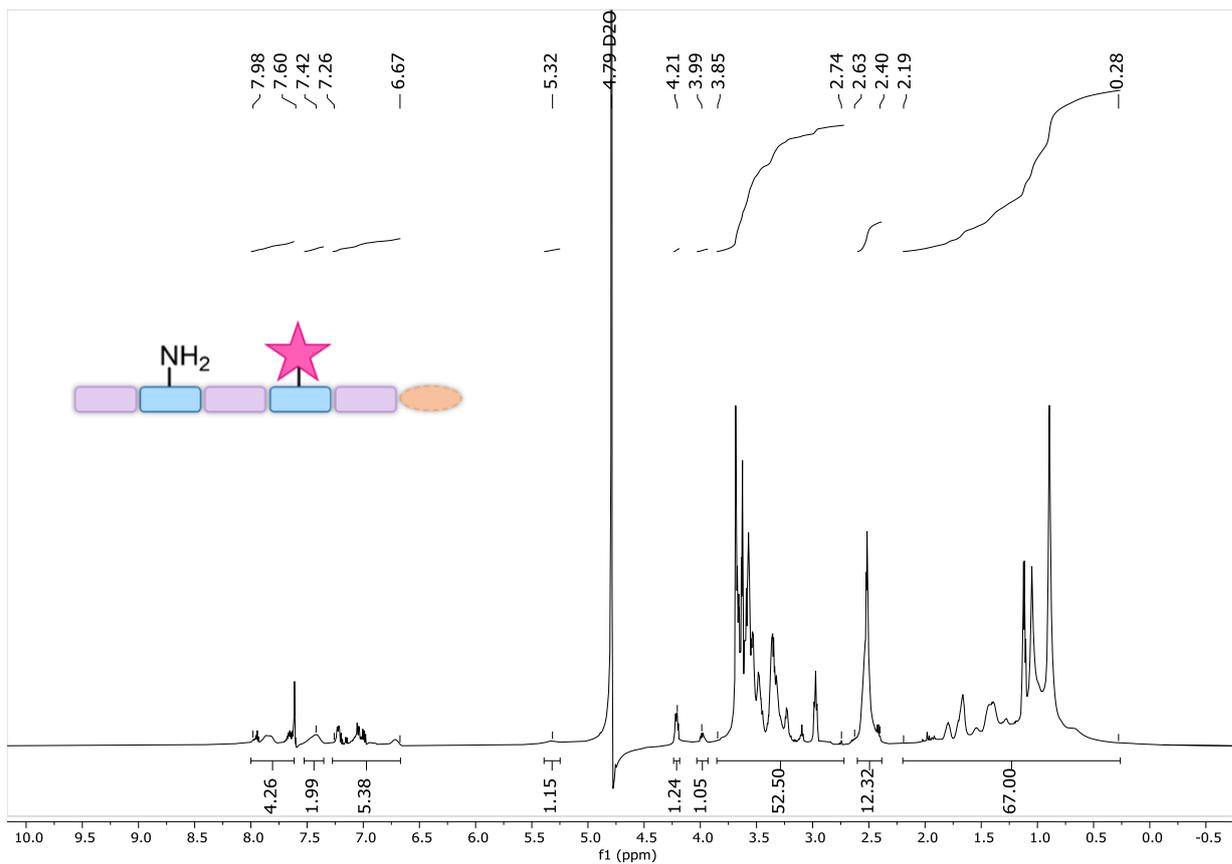
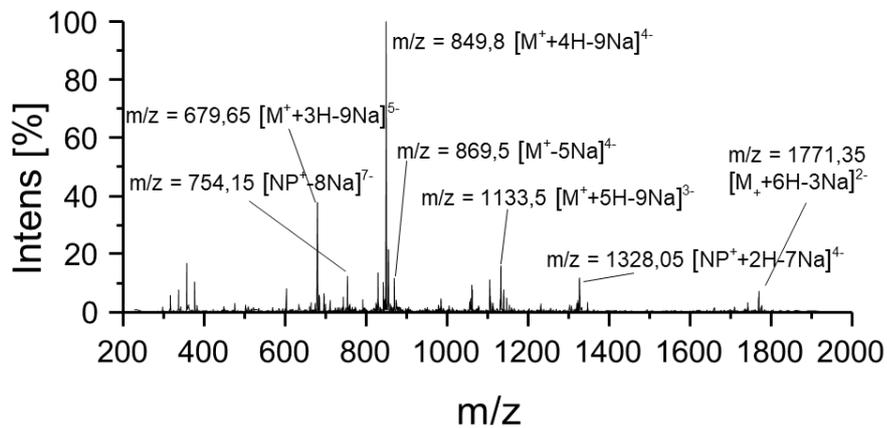
Abbildung 98: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung ZS-8.

Abbildung 99: ESI-MS von Verbindung 7, Negativionenmodus.

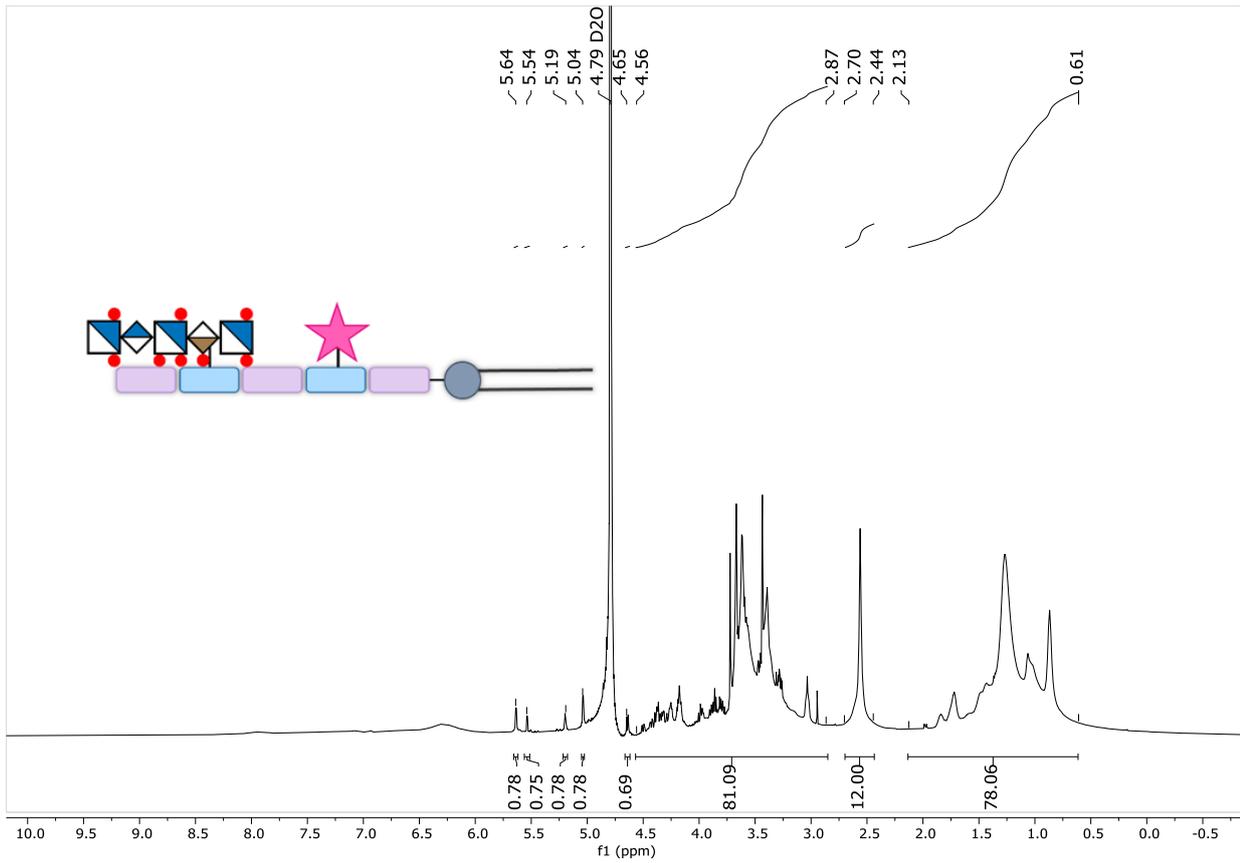


Abbildung 100: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung **7**.

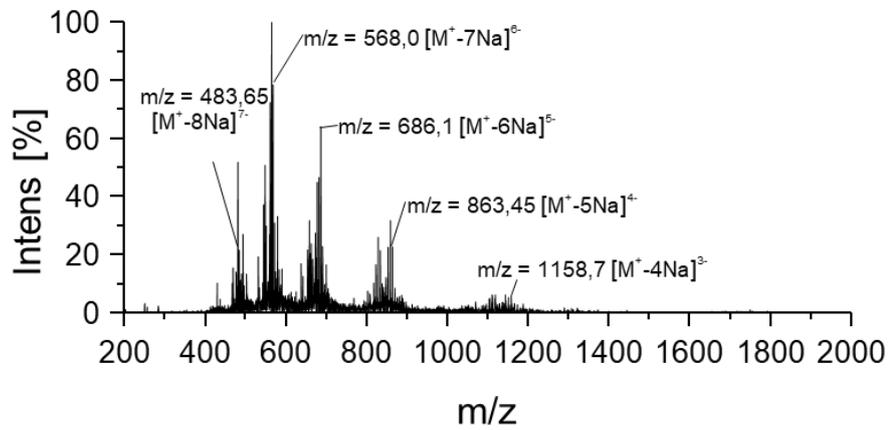


Abbildung 101: ESI-MS von Verbindung **8-1**, Negativionenmodus.

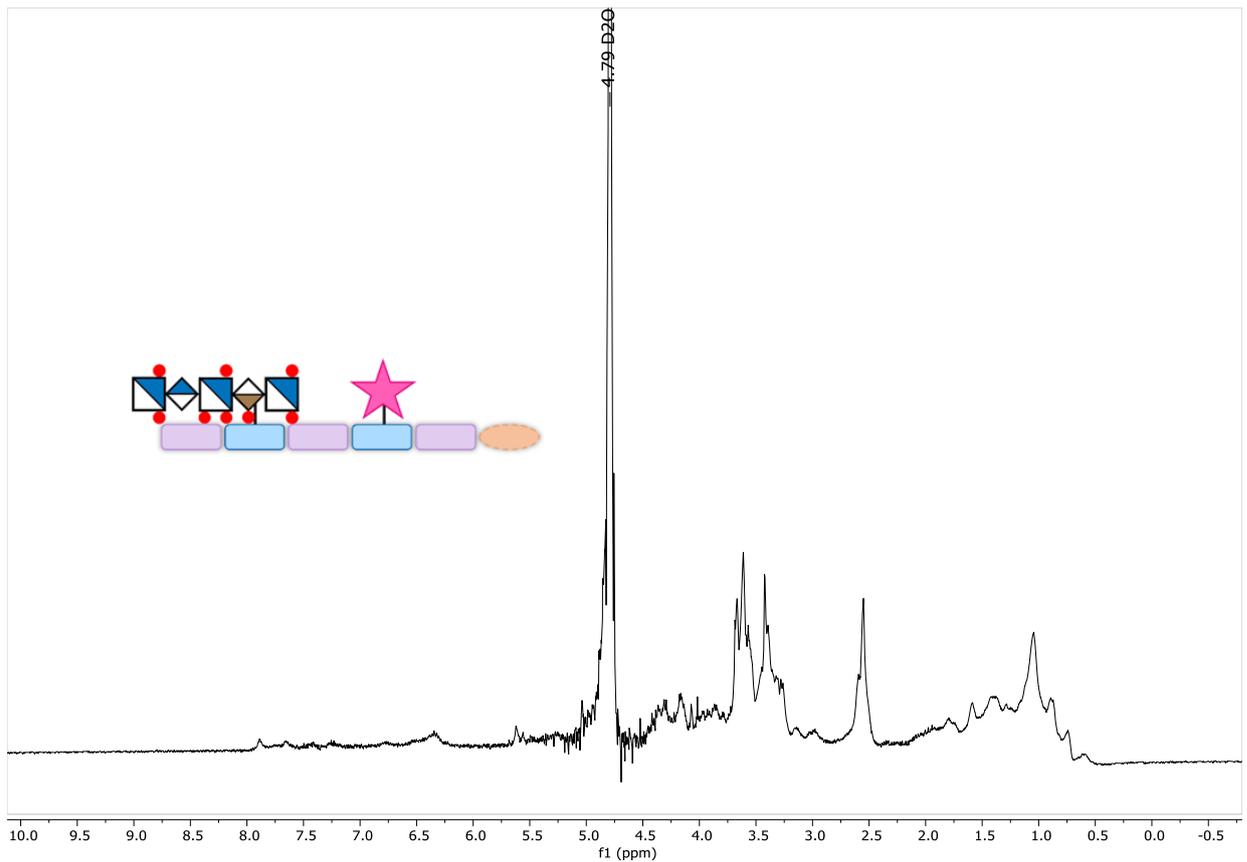


Abbildung 102: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung **8-1**.

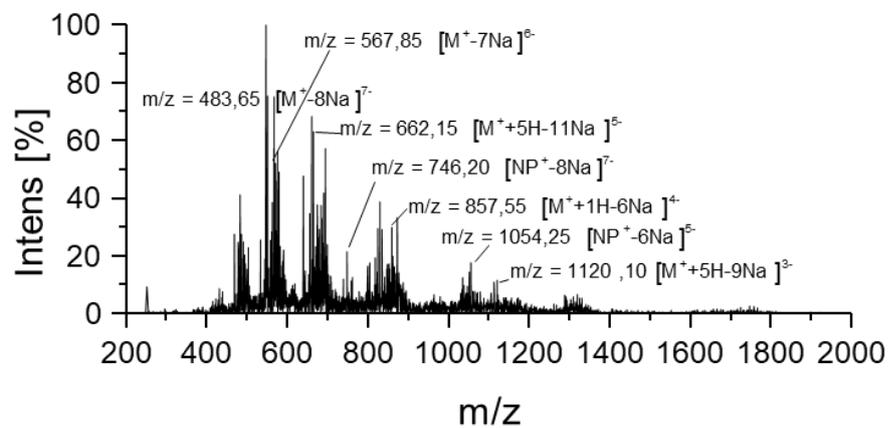


Abbildung 103: ESI-MS von Verbindung **8**, Negativionenmodus.

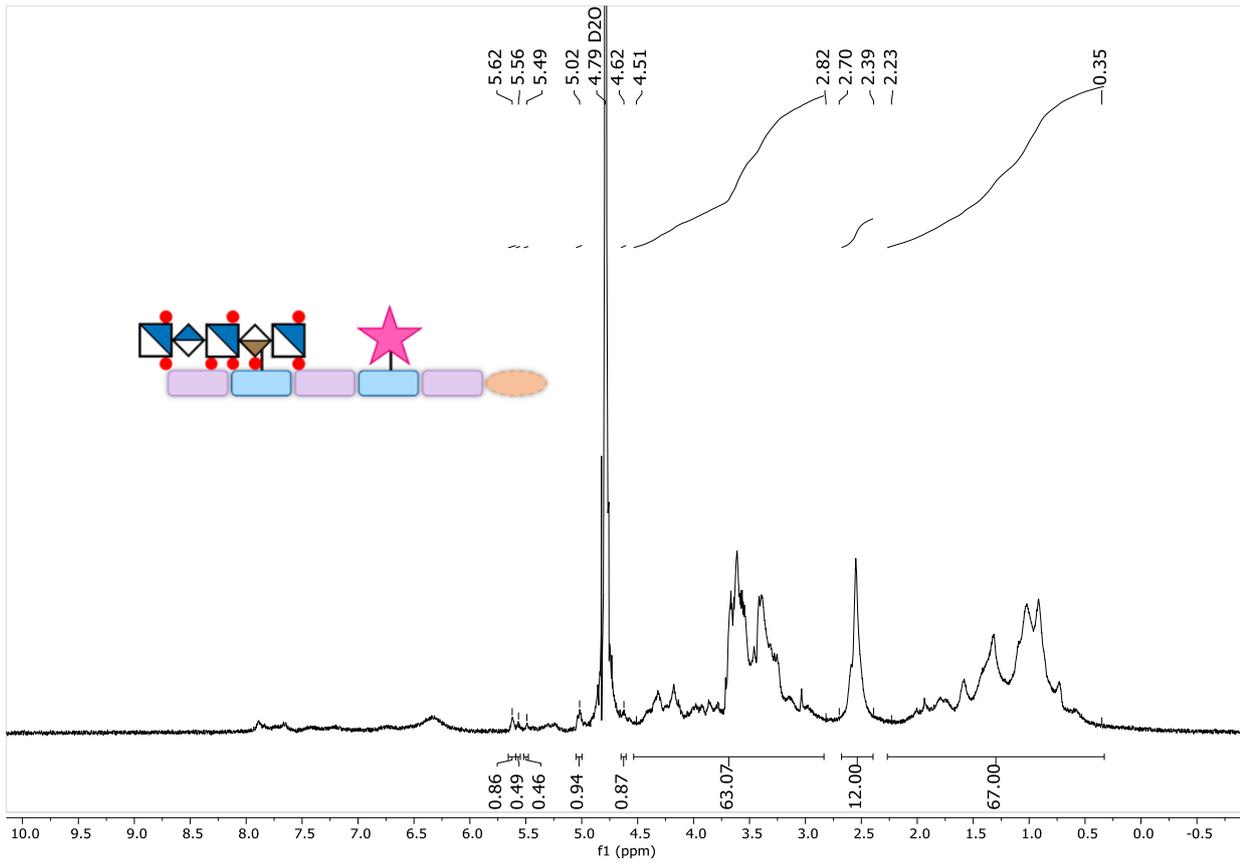


Abbildung 104: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung **8**.

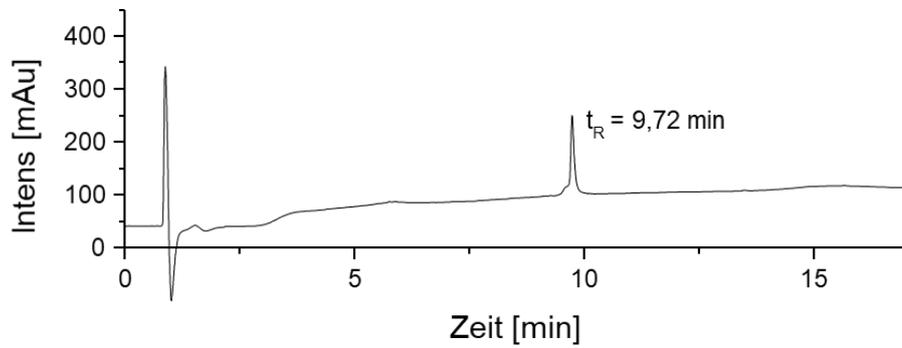


Abbildung 105: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 17 min bei 25 °C) von Verbindung **ZS-Oligomerrückgrat**.

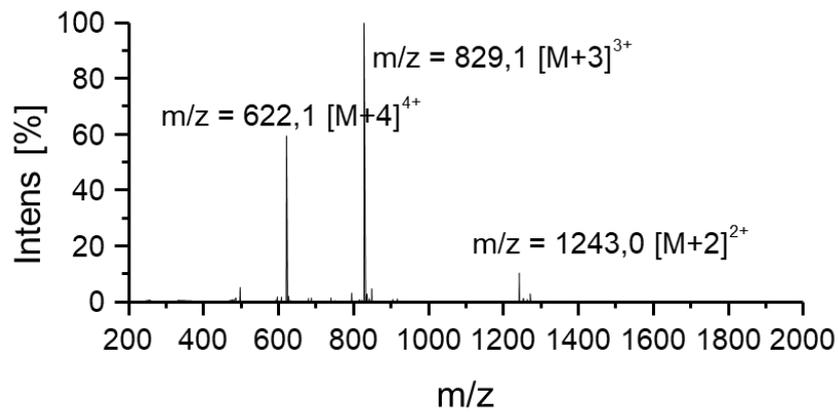


Abbildung 106: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 9,72$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung **ZS-Oligomerrückgrat**.

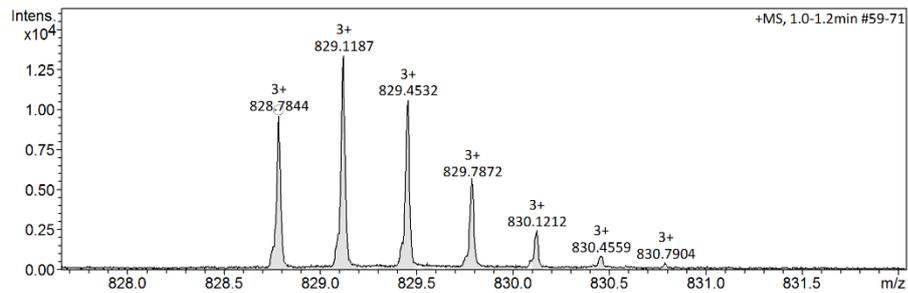


Abbildung 107: HR-MS Spektrum von Verbindung ZS-Oligomerrückgrat.

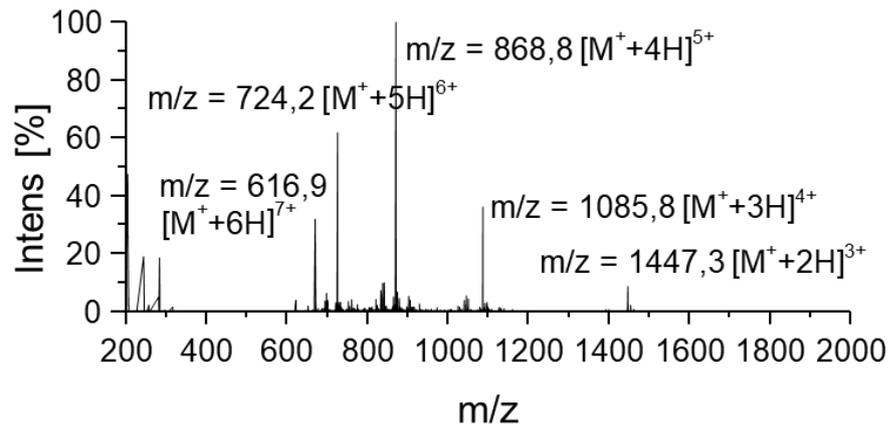


Abbildung 108: ESI-MS Spektrum von Verbindung 9.

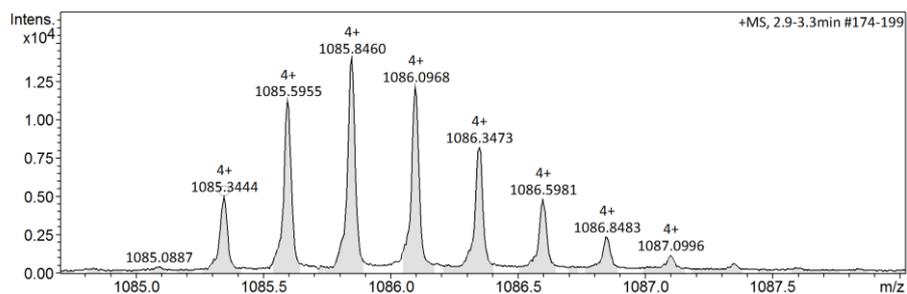


Abbildung 109: HR-MS Spektrum von Verbindung 9.

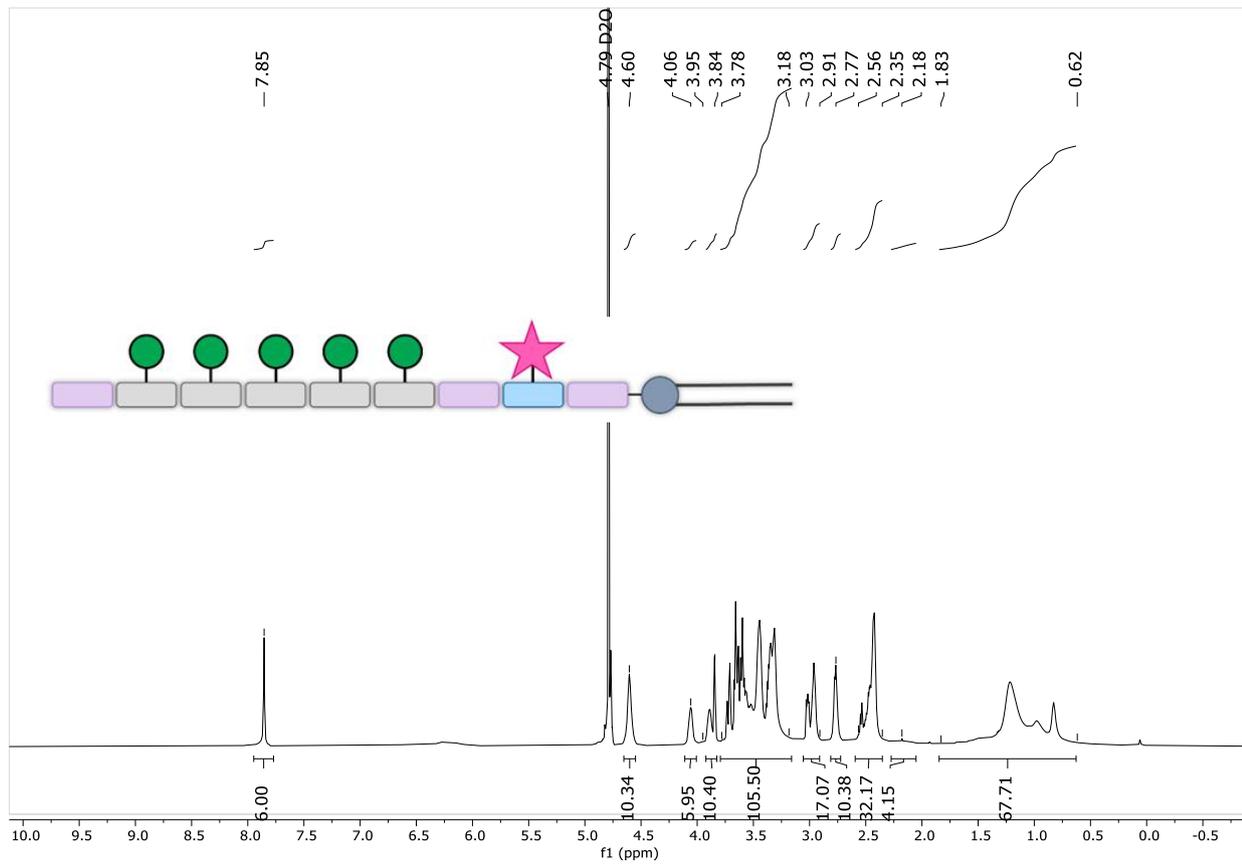


Abbildung 110: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 9.

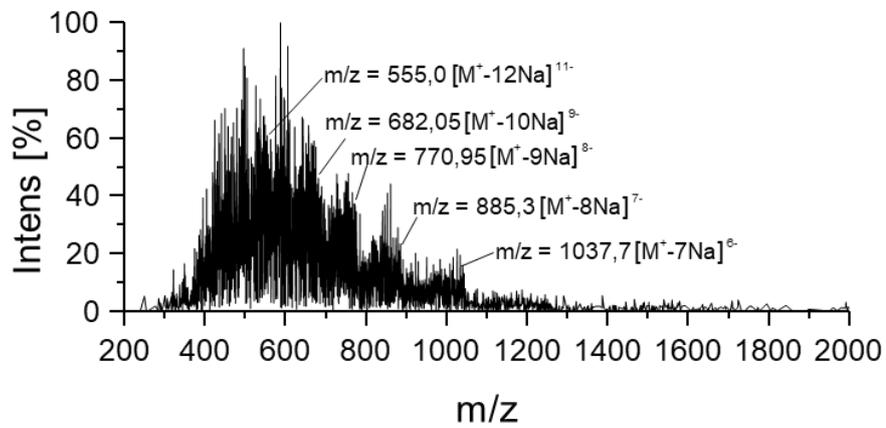
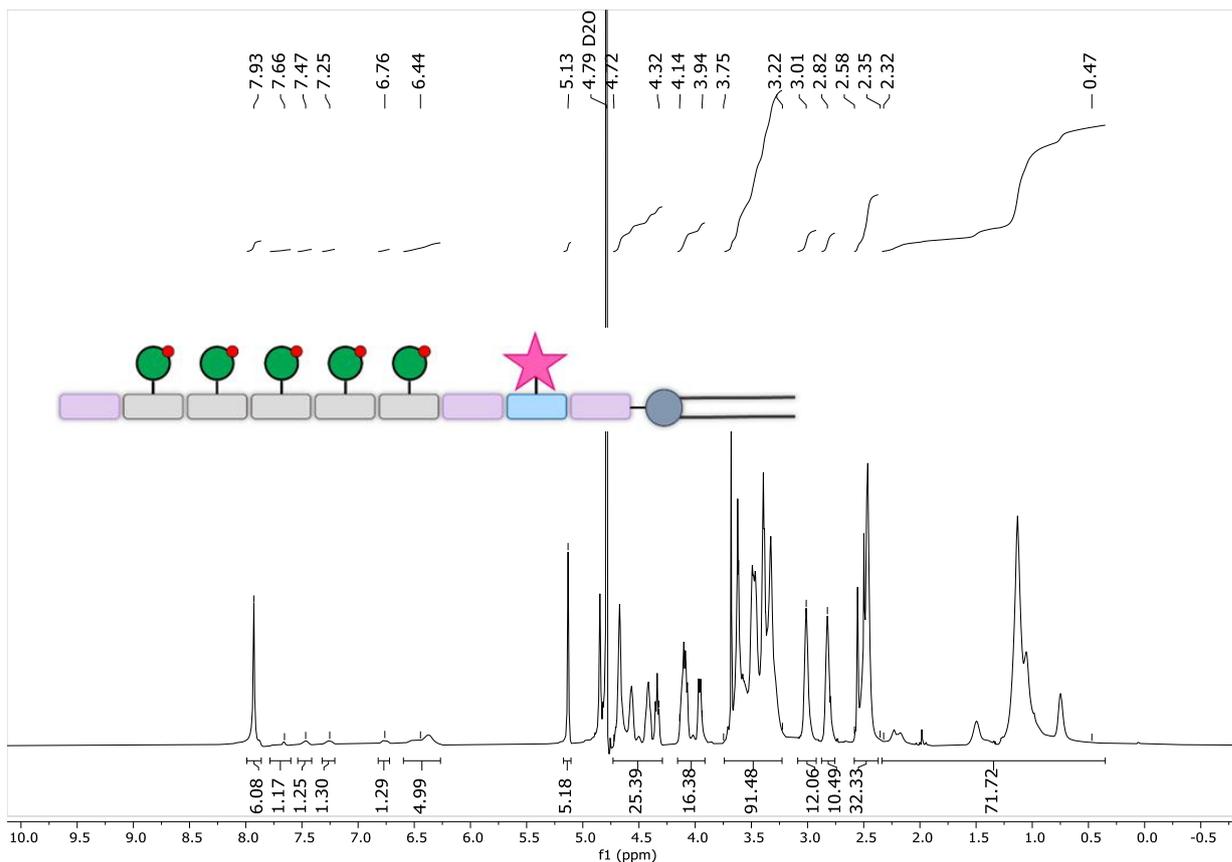
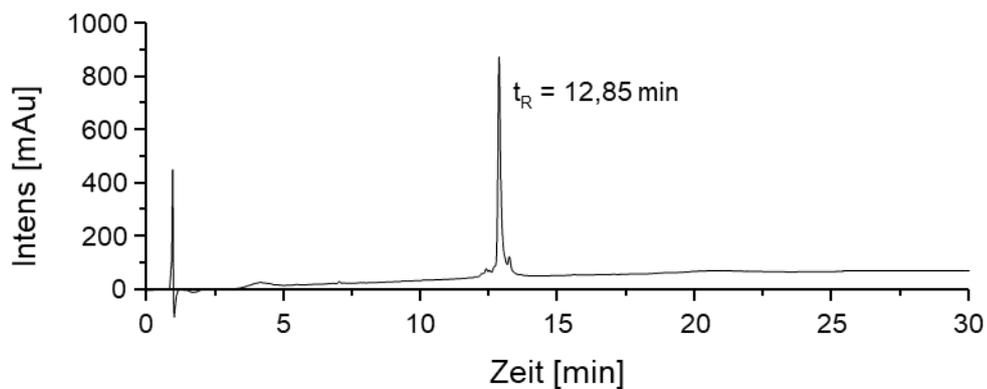
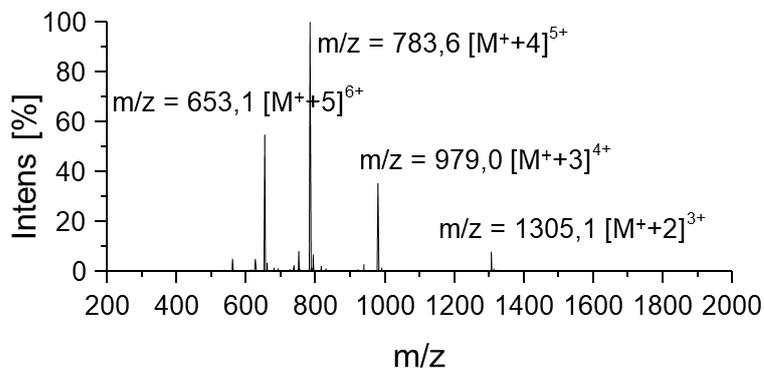


Abbildung 111: ESI-MS von Verbindung 9S, Negativionenmodus.

Abbildung 112: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung **95**.Abbildung 113: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung **ZS-10**.Abbildung 114: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 12,85$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung **ZS-10**.

Anhang

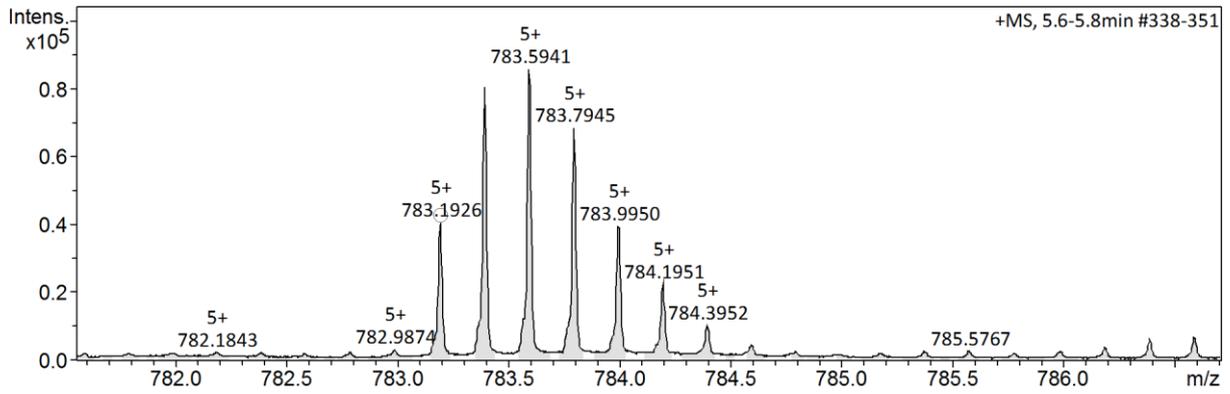


Abbildung 115: HR-MS Spektrum von Verbindung ZS-10.

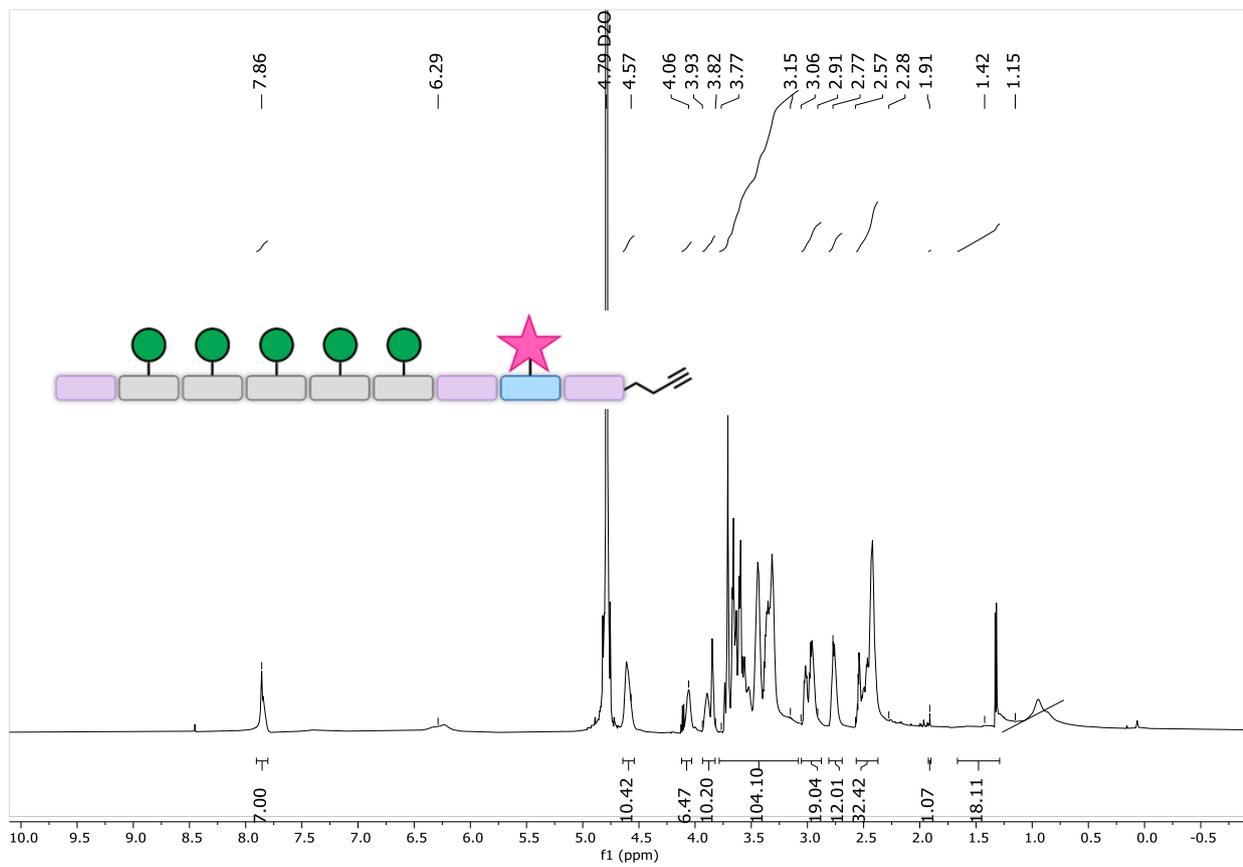


Abbildung 116: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (300 MHz, D_2O) von Verbindung ZS-10.

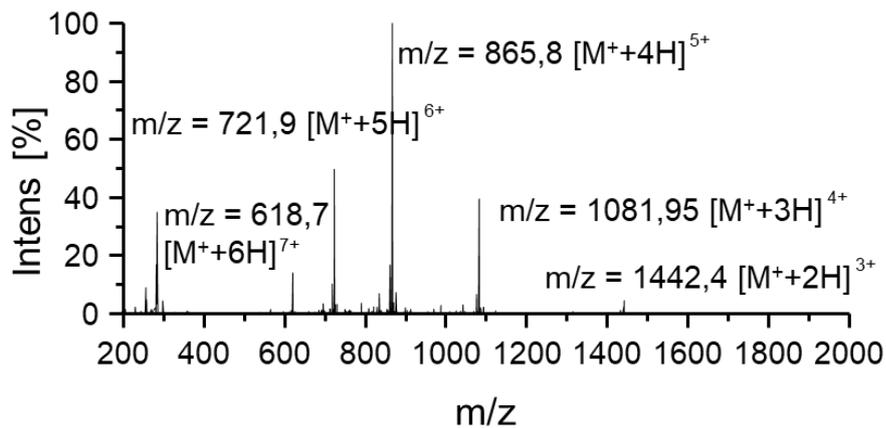


Abbildung 117: ESI-MS Spektrum von Verbindung 10.

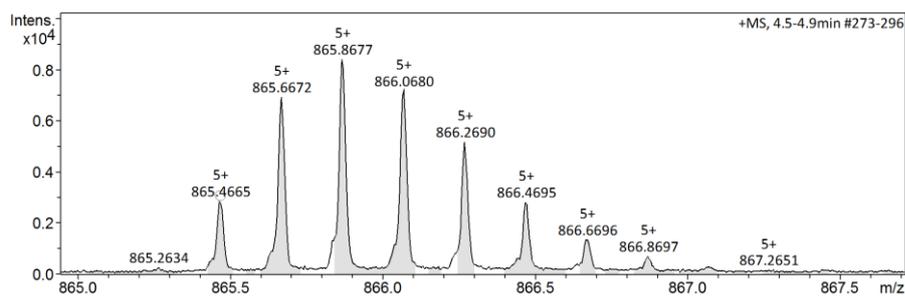
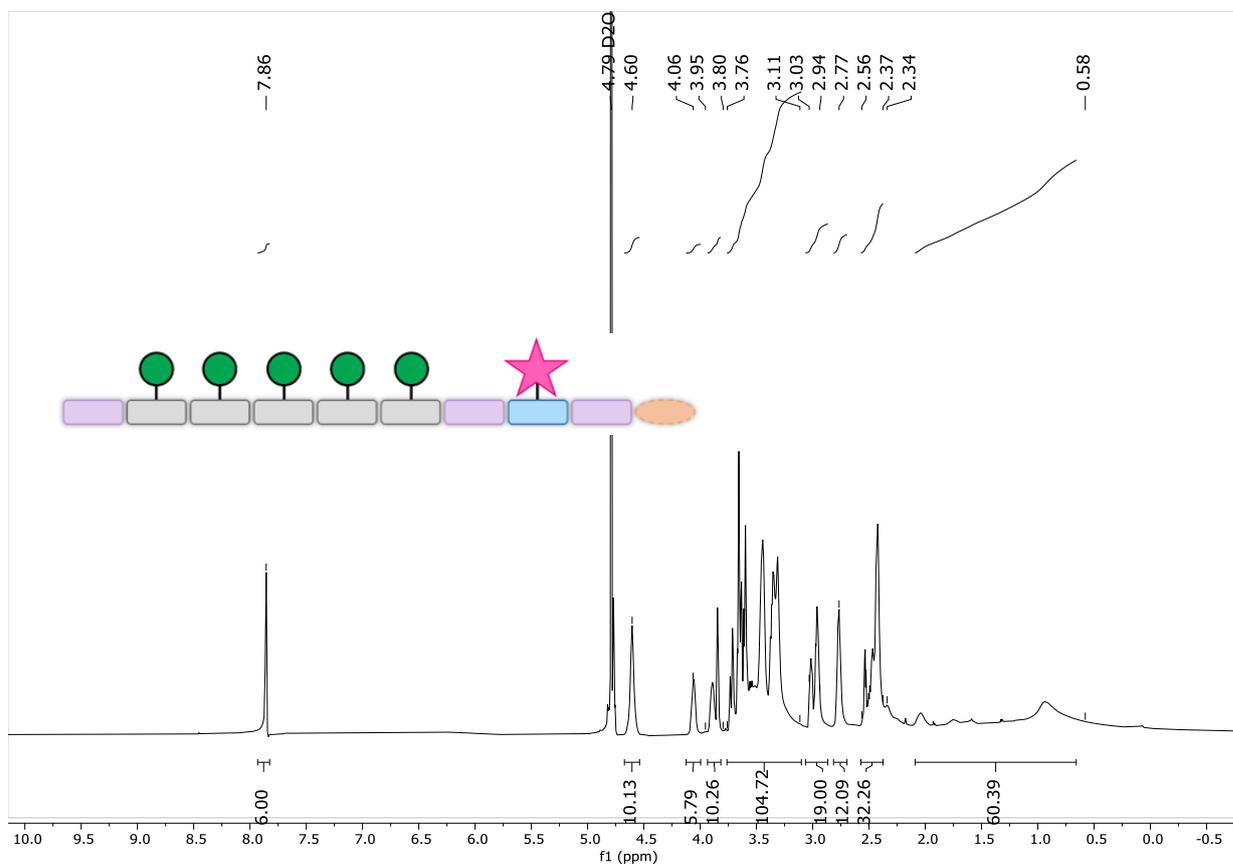


Abbildung 118: HR-MS Spektrum von Verbindung 10.

Abbildung 119: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 10.

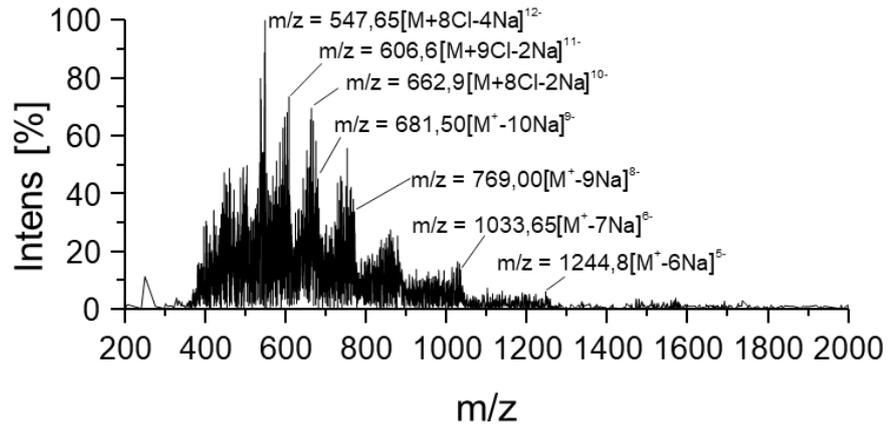


Abbildung 120: ESI-MS von Verbindung **10S**, Negativionenmodus.

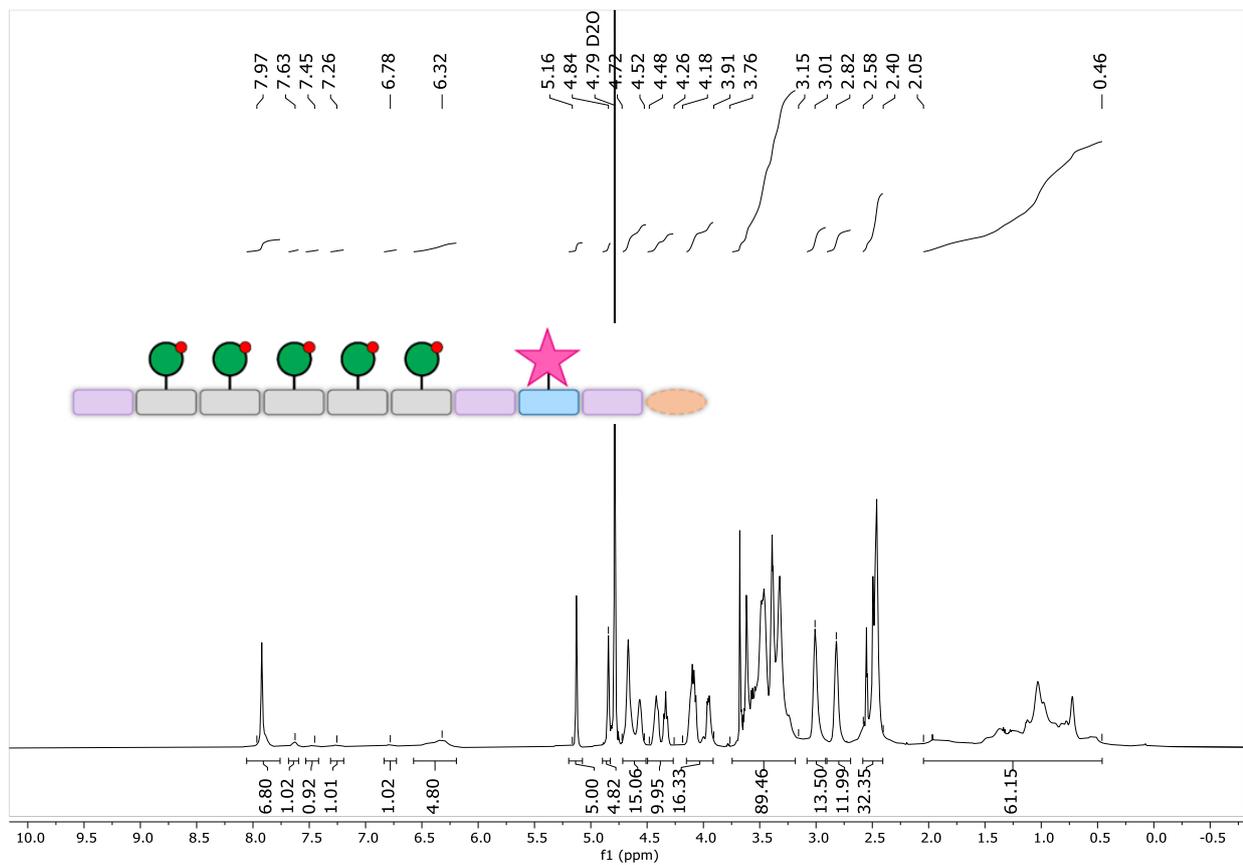
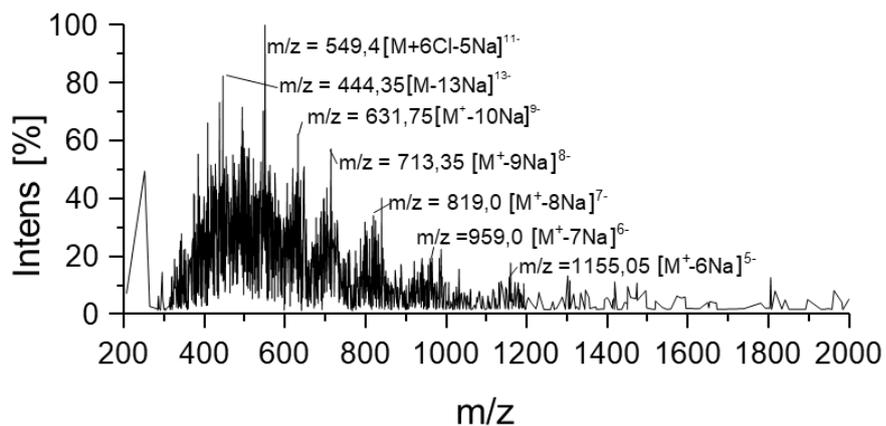
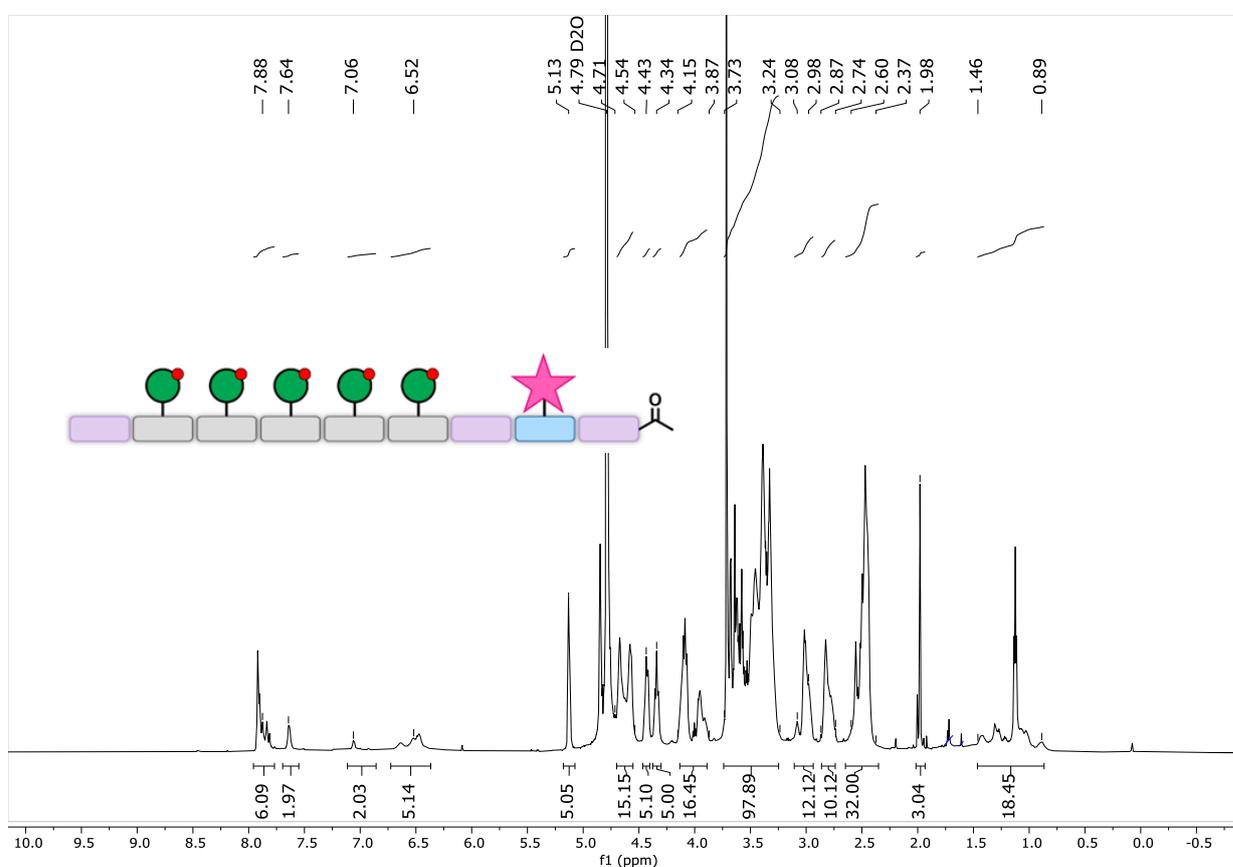


Abbildung 121: 1H -NMR Spektrum (300 MHz, D_2O) von Verbindung **10S**.

Abbildung 122: ESI-MS von Verbindung **115**, Negativionenmodus.Abbildung 123: 1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung **115**.

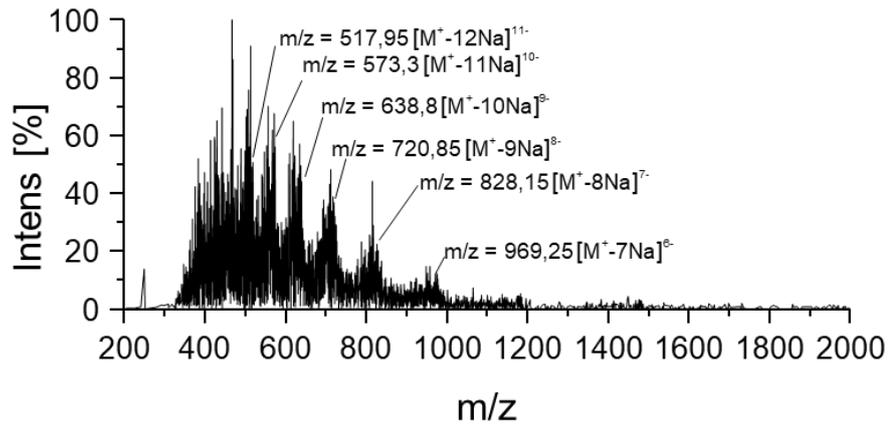


Abbildung 124: ESI-MS von Verbindung **125**, Negativionenmodus.

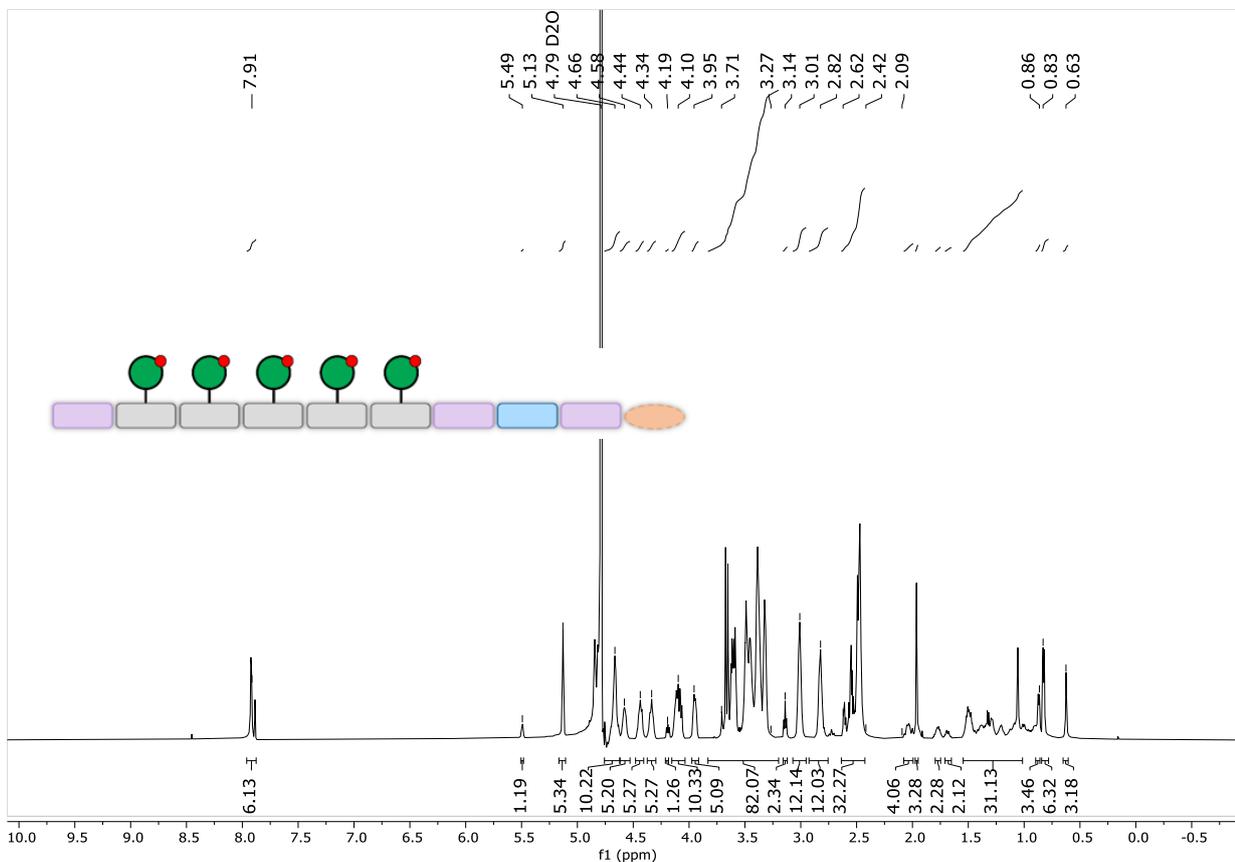


Abbildung 125: ^1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung **125**.

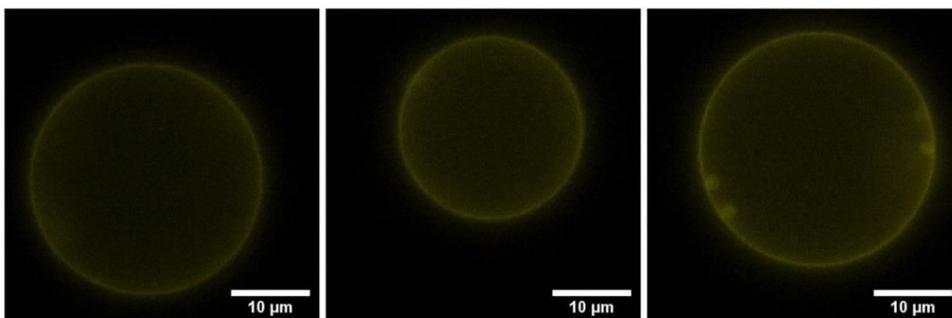


Abbildung 126: Fluoreszenzmikroskopiebilder aufgenommen im Kanal des Rhodamin B für drei beispielhafte GUVs funktionalisiert mit **9S**.

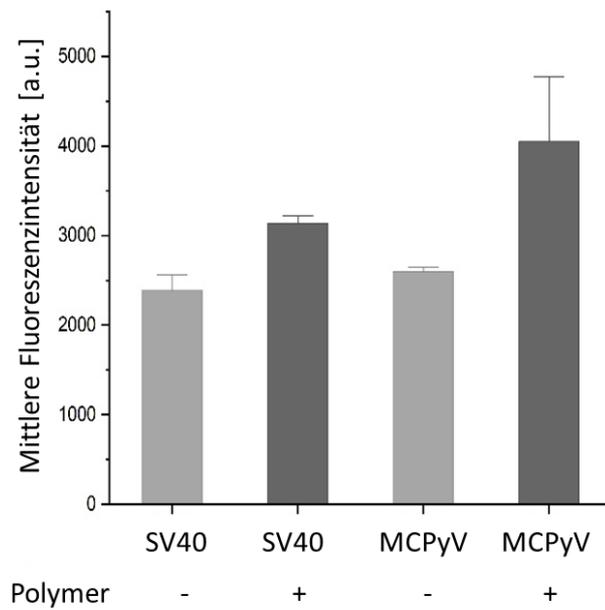


Abbildung 127: Quantifizierung der mittleren Fluoreszenz für Gm-95-Zellen nach der Inkubation mit SV40 bzw. MCPyV-VLPs.

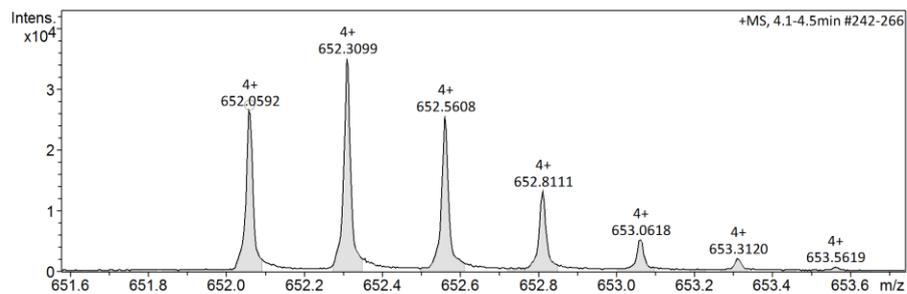


Abbildung 128: HR-MS Spektrum von Verbindung 13.

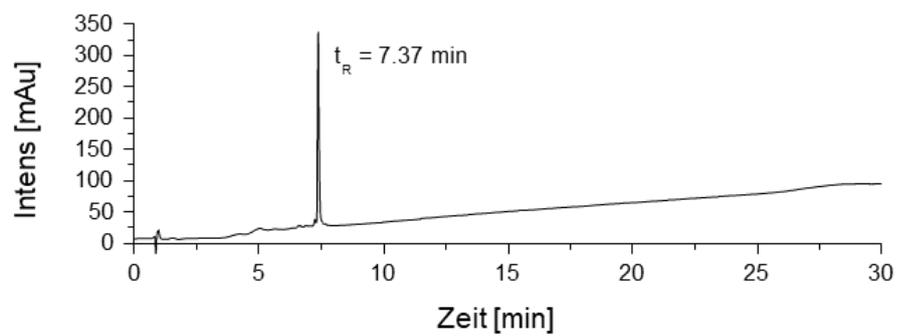


Abbildung 129: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 50 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 13.

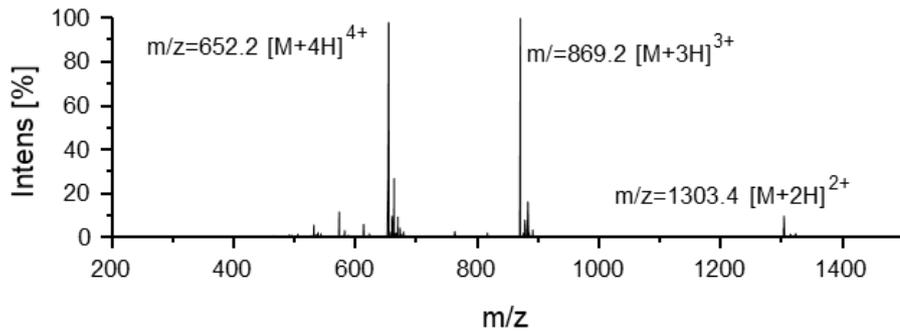


Abbildung 130: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 7.37$ min (von 100 bis 50 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung **13**.

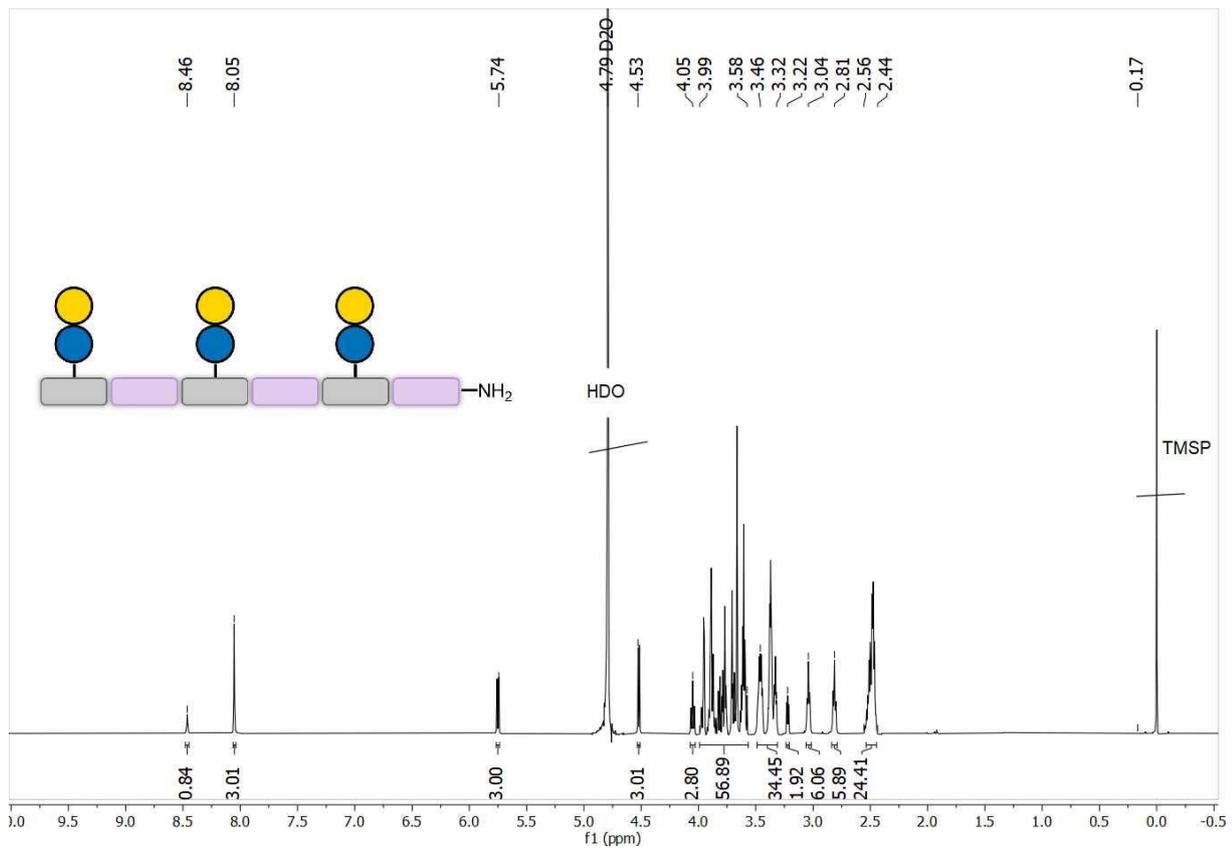


Abbildung 131: 1H -NMR Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung **13**.

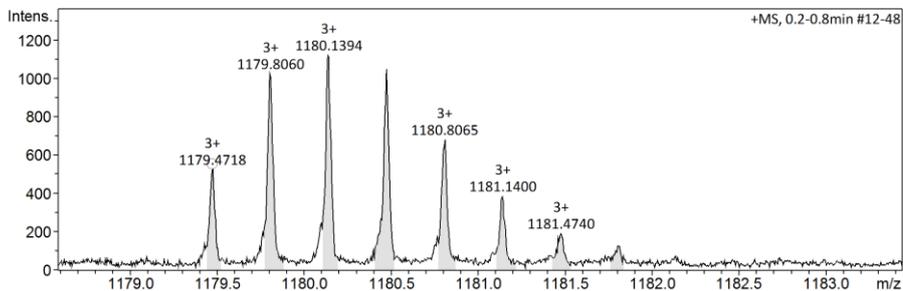


Abbildung 132: HR-MS Spektrum von Verbindung **14**.

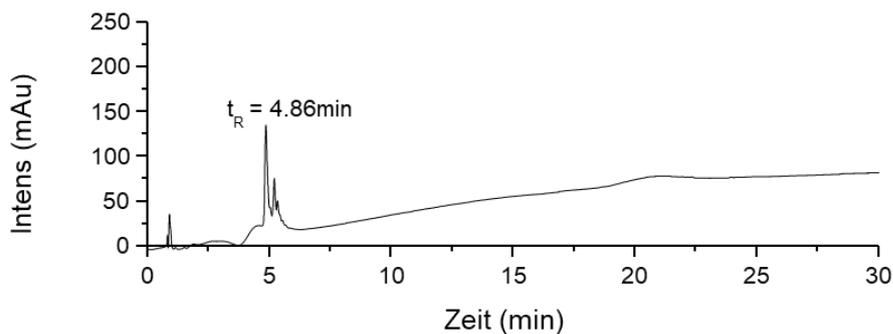


Abbildung 133: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung **14**.

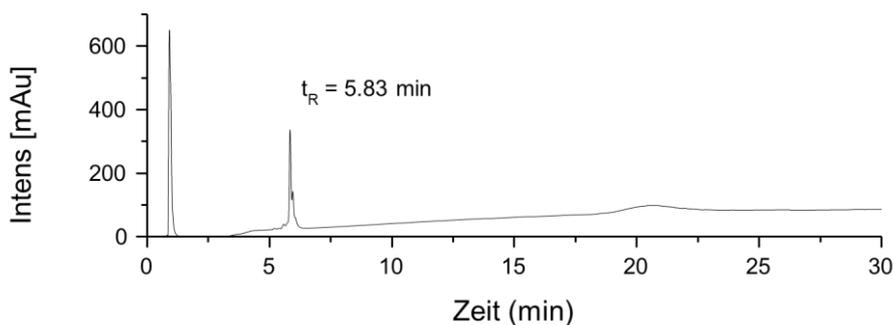


Abbildung 134: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung **14** nach der Inkubation mit TFA. Die Peaks sind schmäler und schärfer im Vergleich zum Lauf aus Abbildung 133. Der Injektionspeak wird durch entstandene Salze vergrößert.

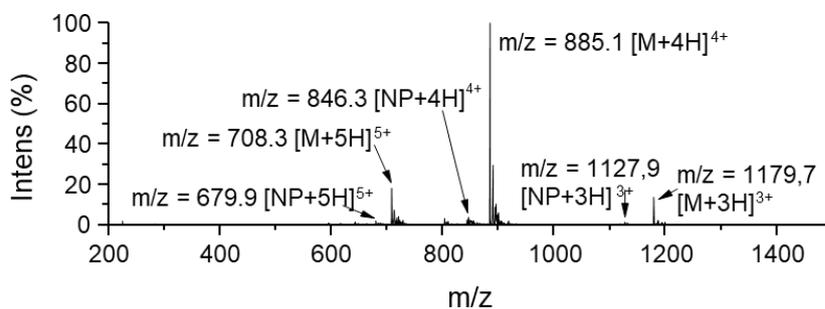


Abbildung 135: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 4.86$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung **14**. Zugeordnet sind auch die Massen des Nebenprodukts mit einem fehlenden *p*-Benzolsulfonsäurerest.

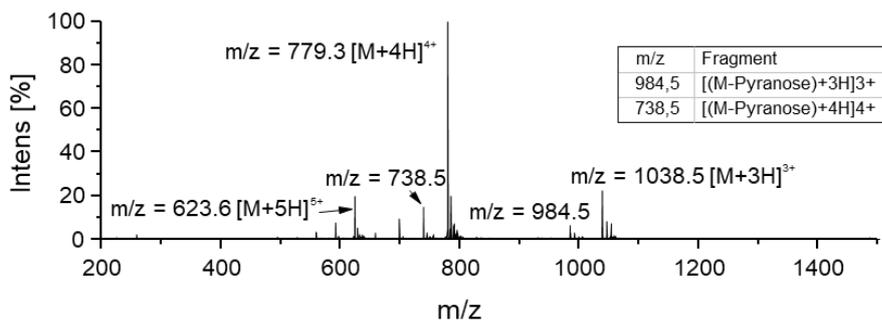
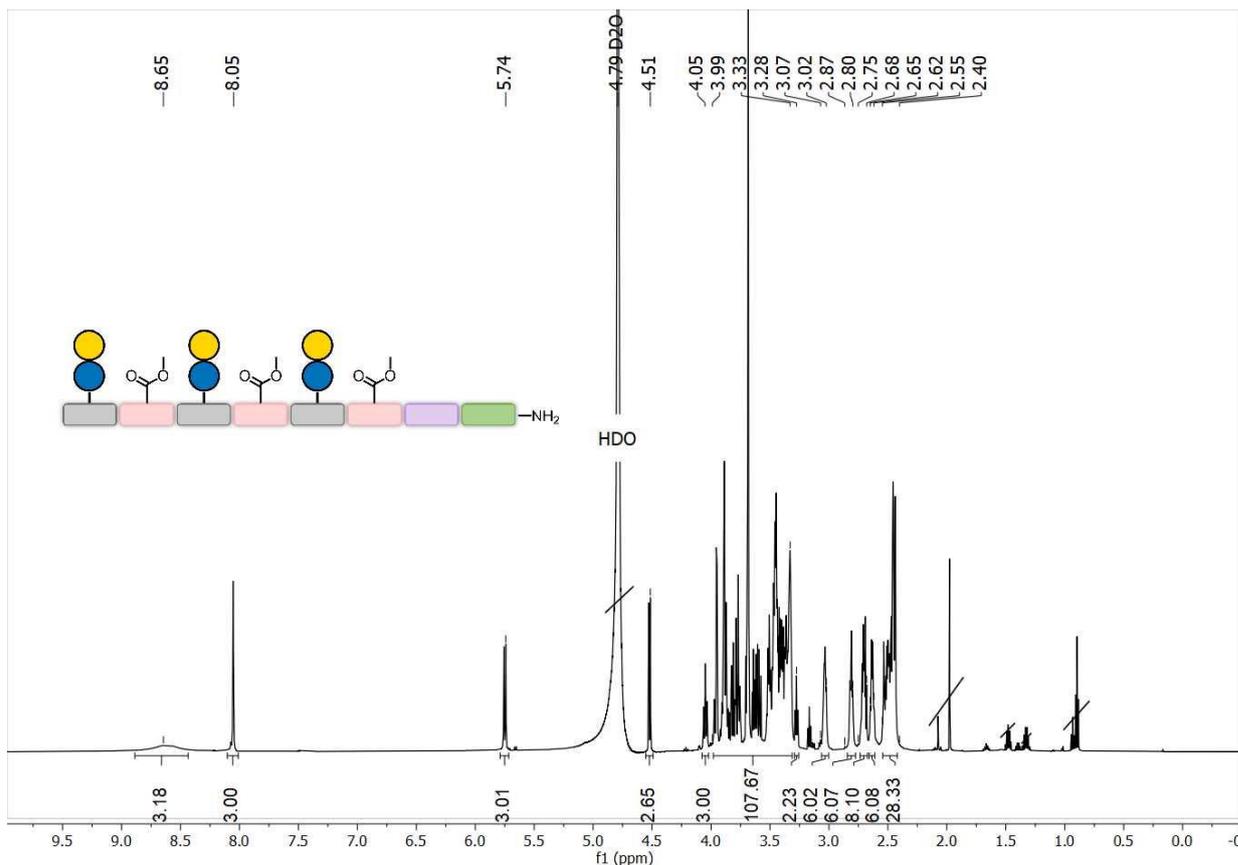
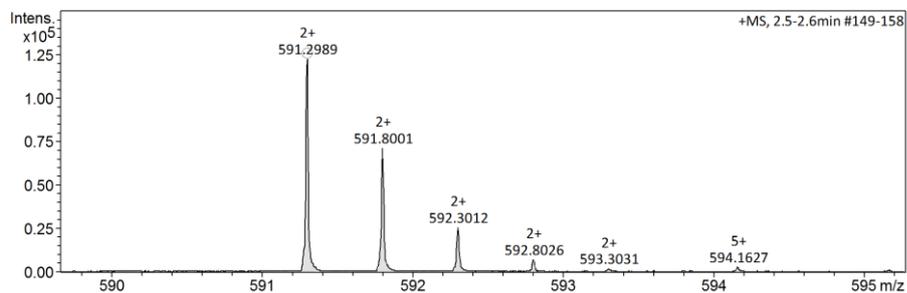
Abbildung 139: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 13.32$ min (von 100 bis 75 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 15.Abbildung 140: ¹H-NMR Spektrum (600 MHz, D₂O) von Verbindung 15.

Abbildung 141: HR-MS Spektrum von Verbindung 16.

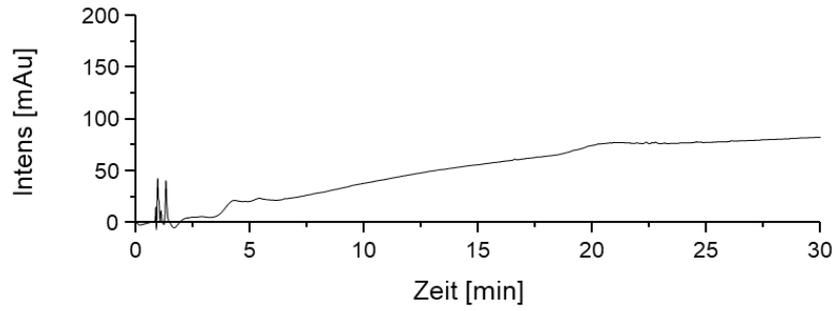


Abbildung 142: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 16.

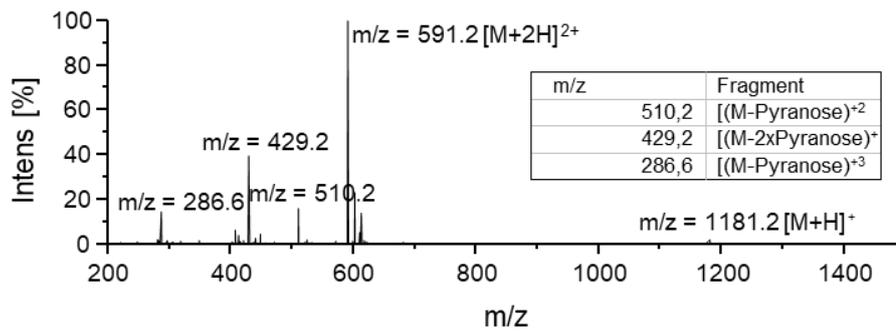


Abbildung 143: ESI-MS Spektrum des Injektionspeaks (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 16.

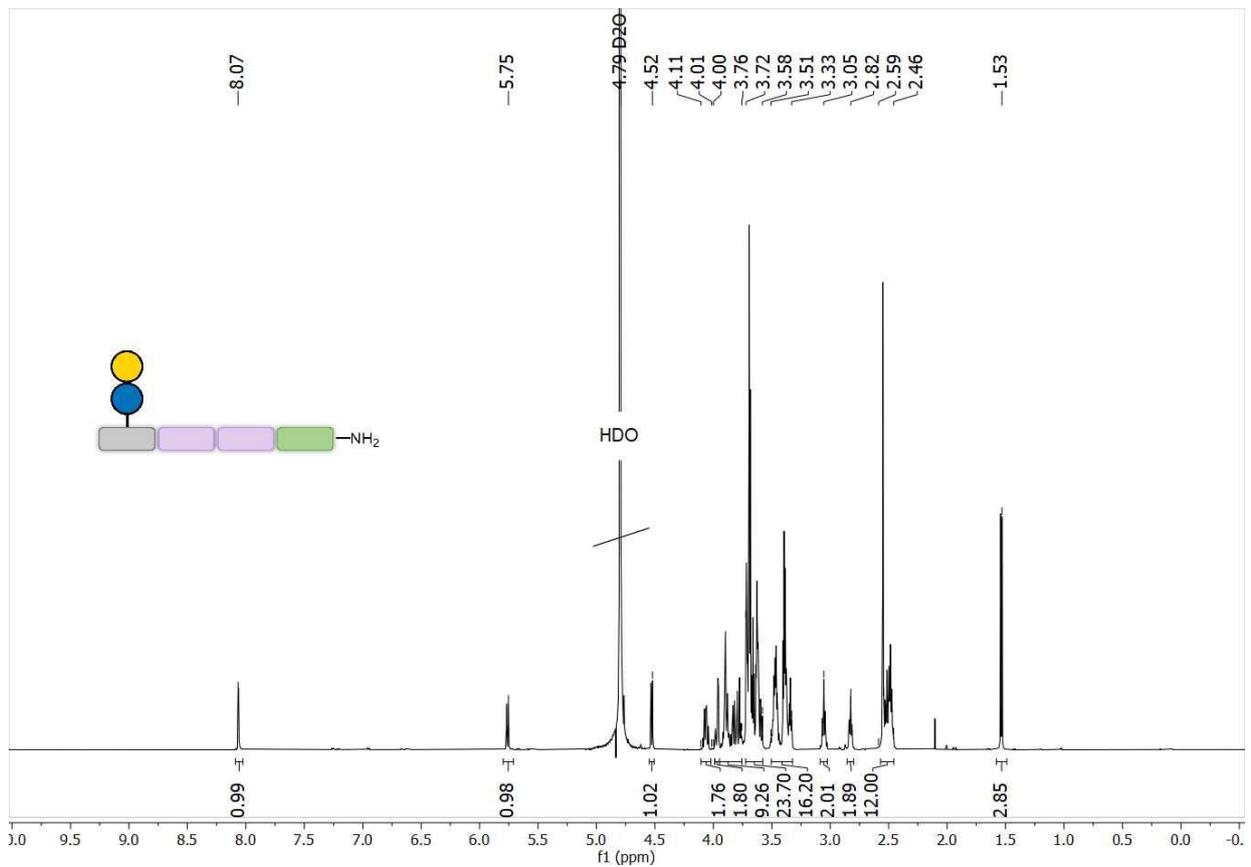


Abbildung 144: ¹H-NMR Spektrum (600 MHz, D₂O) von Verbindung 16.

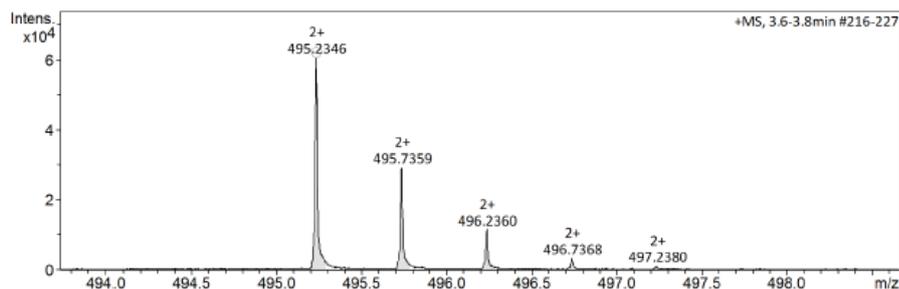


Abbildung 145: HR-MS Spektrum von Verbindung 17.

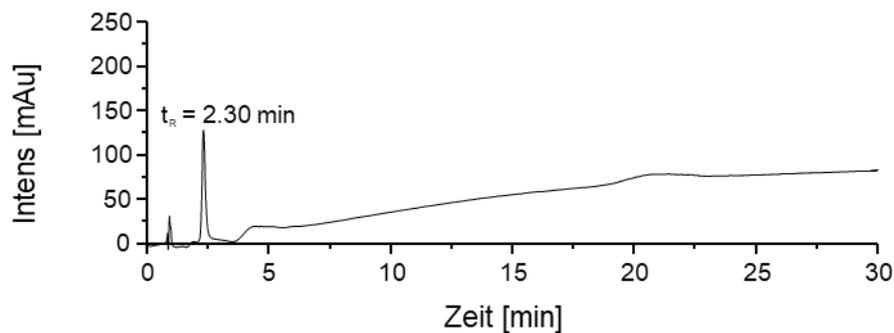
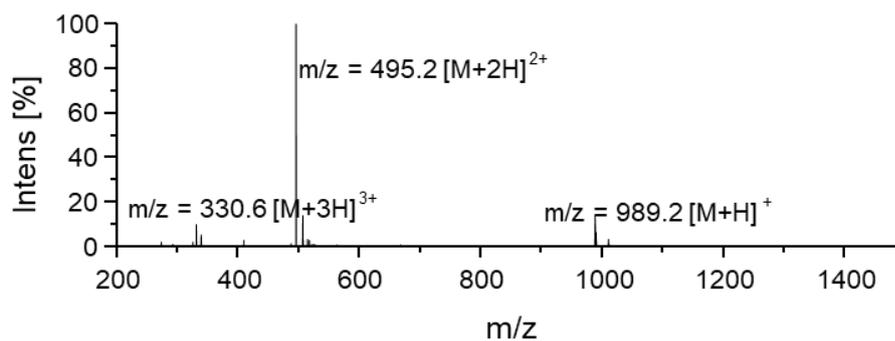


Abbildung 146: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 17.

Abbildung 147: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 2.30$ min (von 100 bis 0 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 17.

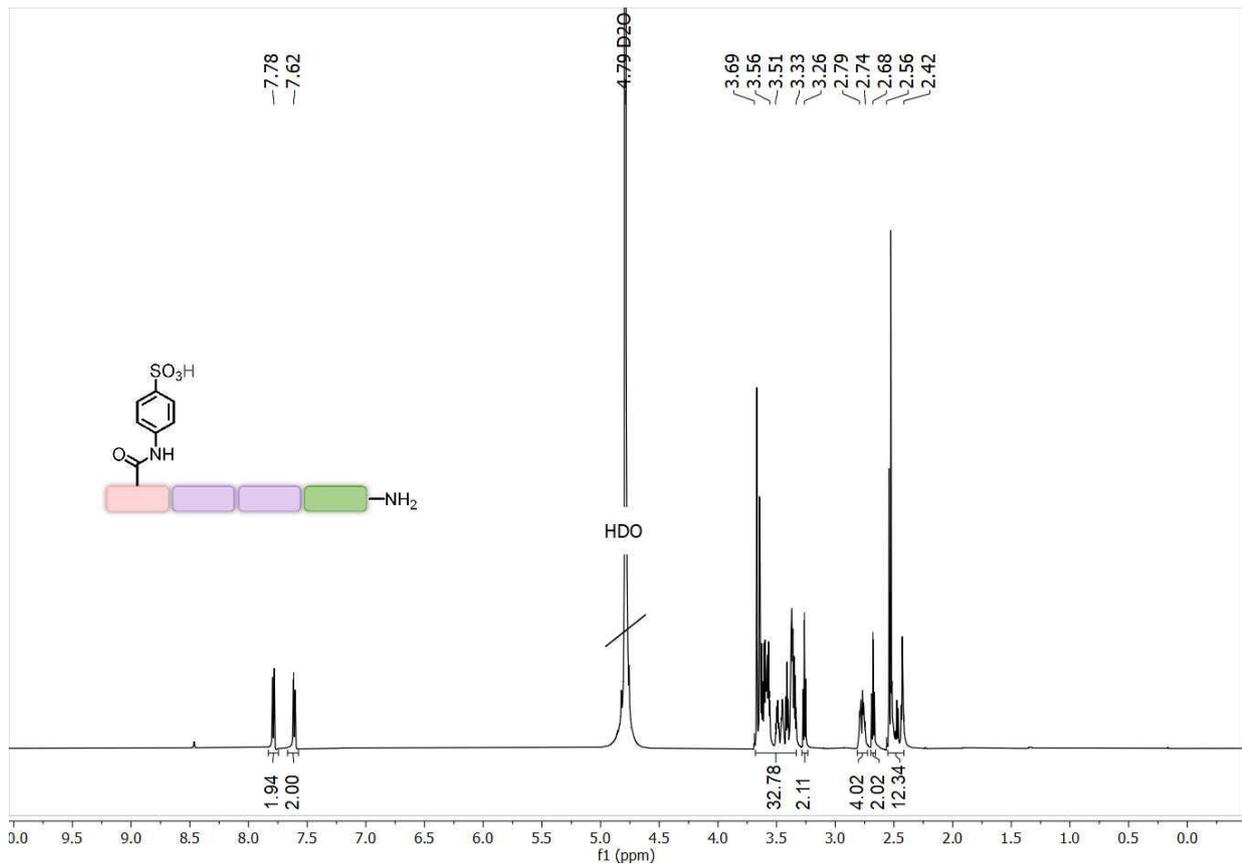


Abbildung 148: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (600 MHz, D_2O) von Verbindung 17.

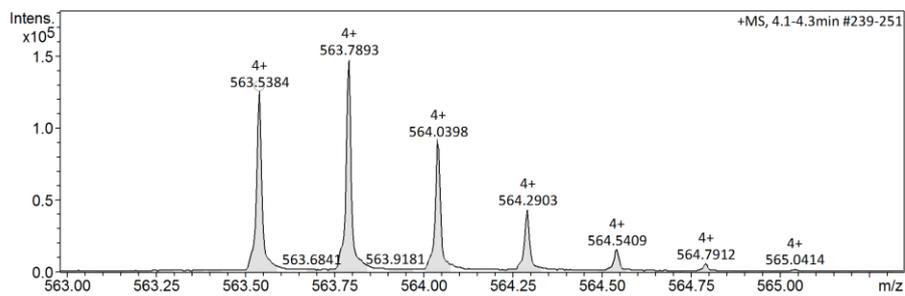


Abbildung 149: HR-MS Spektrum von Verbindung 18.

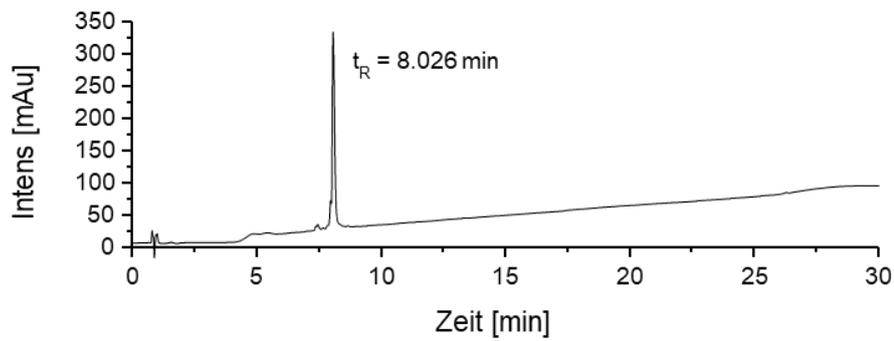


Abbildung 150: RP-HPLC Chromatogramm (von 100 bis 50 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung 18.

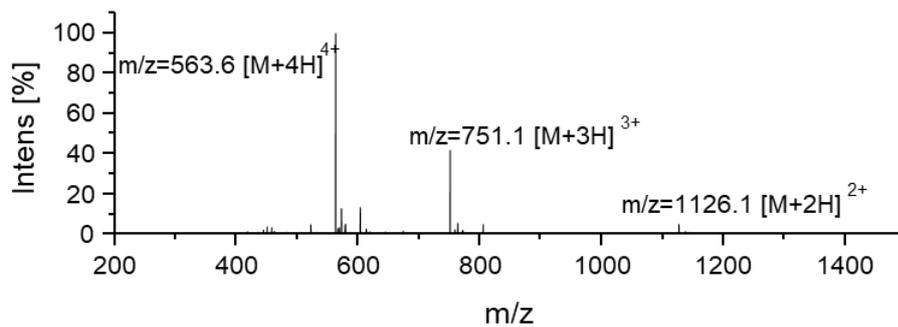


Abbildung 151: ESI-MS Spektrum bei $t_R = 8.03$ min (von 100 bis 50 Vol. % A in 30 min bei 25 °C) von Verbindung **18**.

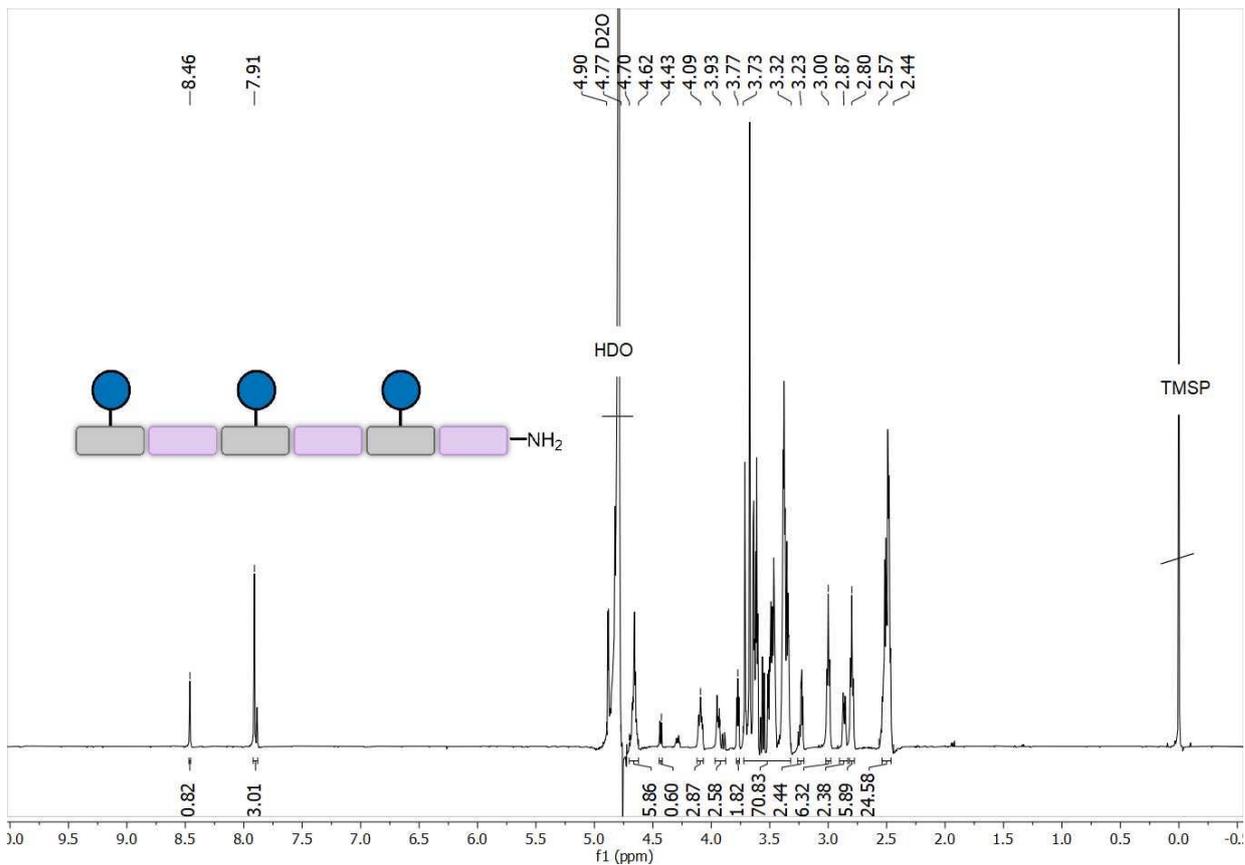


Abbildung 152: ¹H-NMR Spektrum (600 MHz, D₂O) von Verbindung **18**.

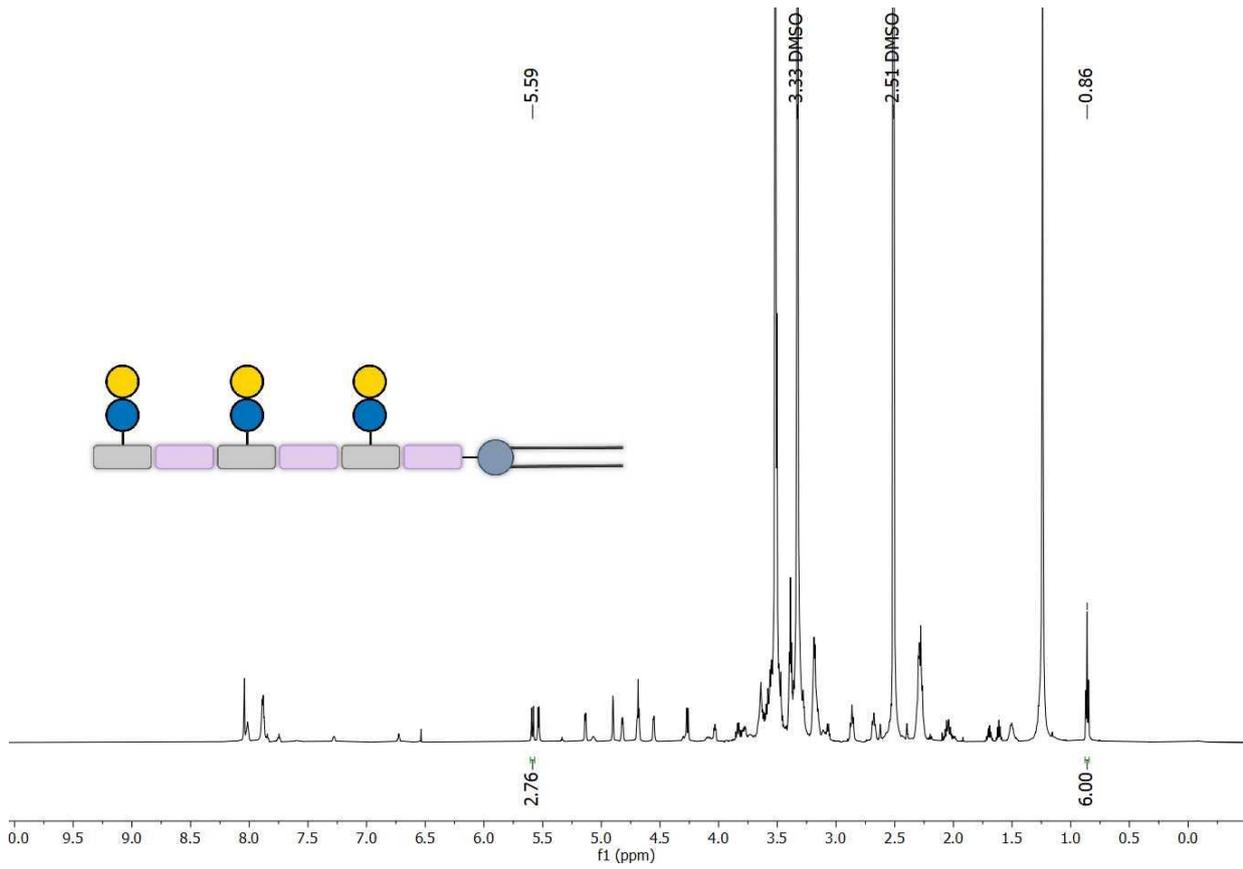


Abbildung 153: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Verbindung **L13**.

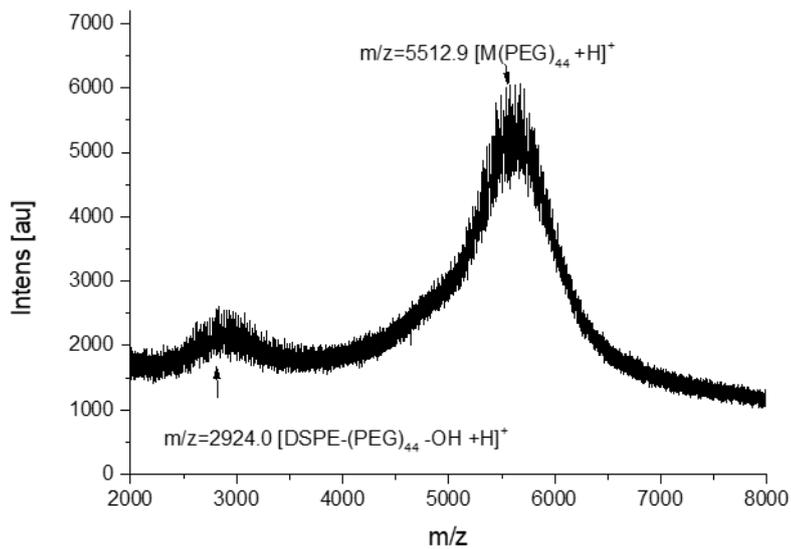
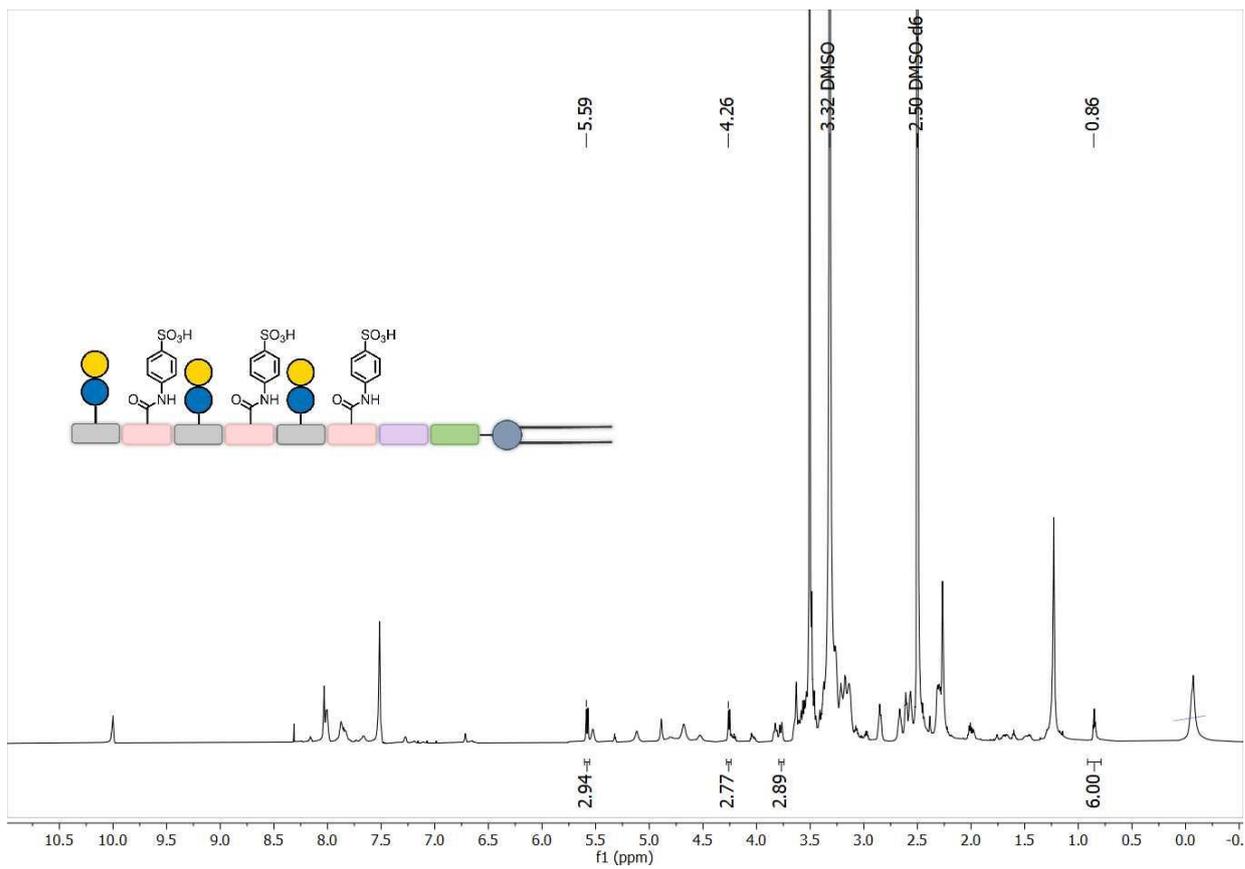
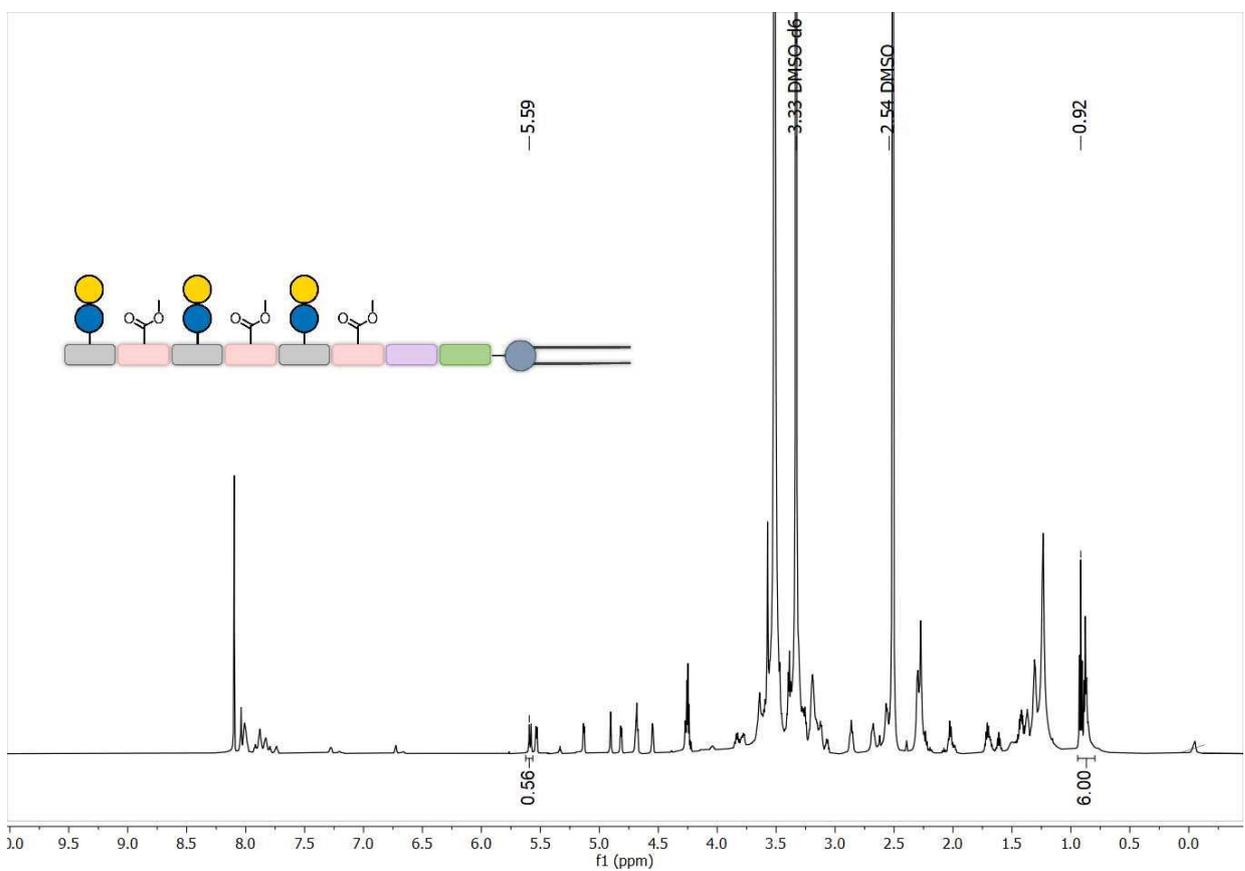


Abbildung 154: MALDI-TOF-MS Spektrum von Verbindung **L13**.

Abbildung 155: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Verbindung L14.Abbildung 156: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Verbindung L15.

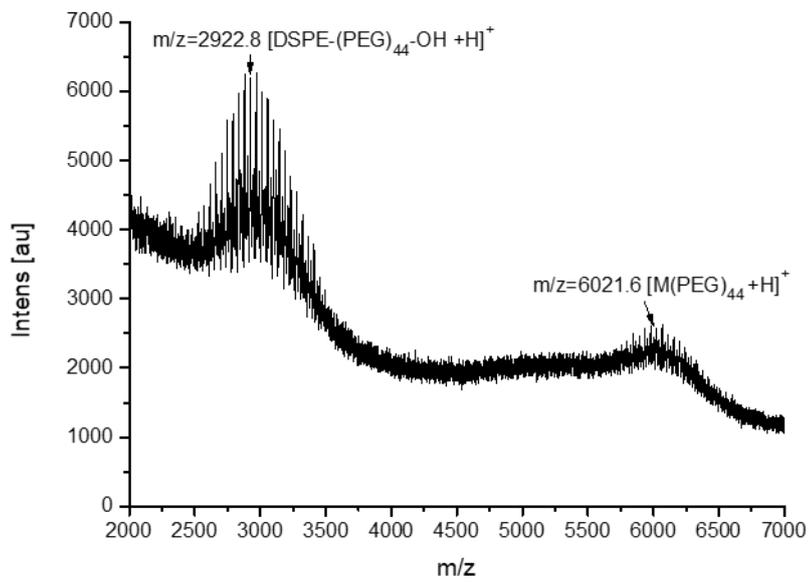


Abbildung 157: MALDI-TOF-MS Spektrum von Verbindung L15.

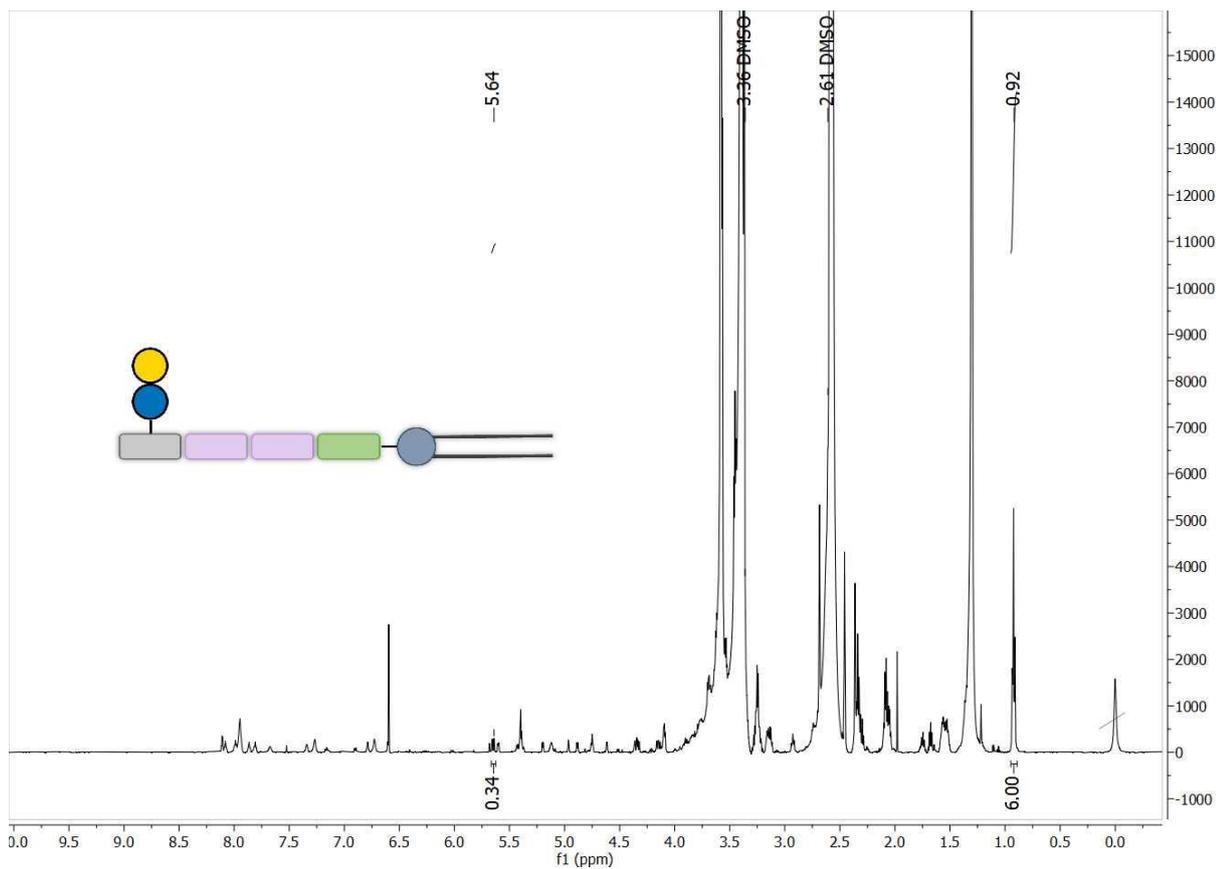


Abbildung 158: ¹H-NMR Spektrum von Verbindung L16.

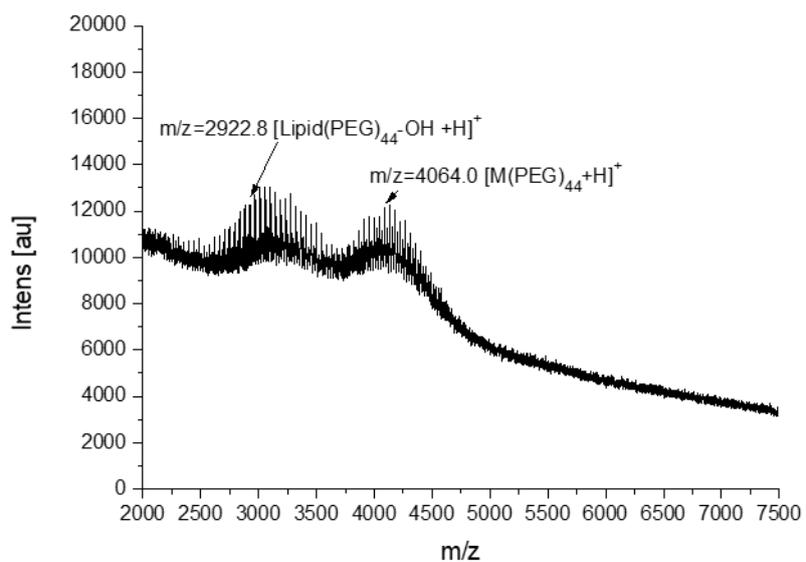
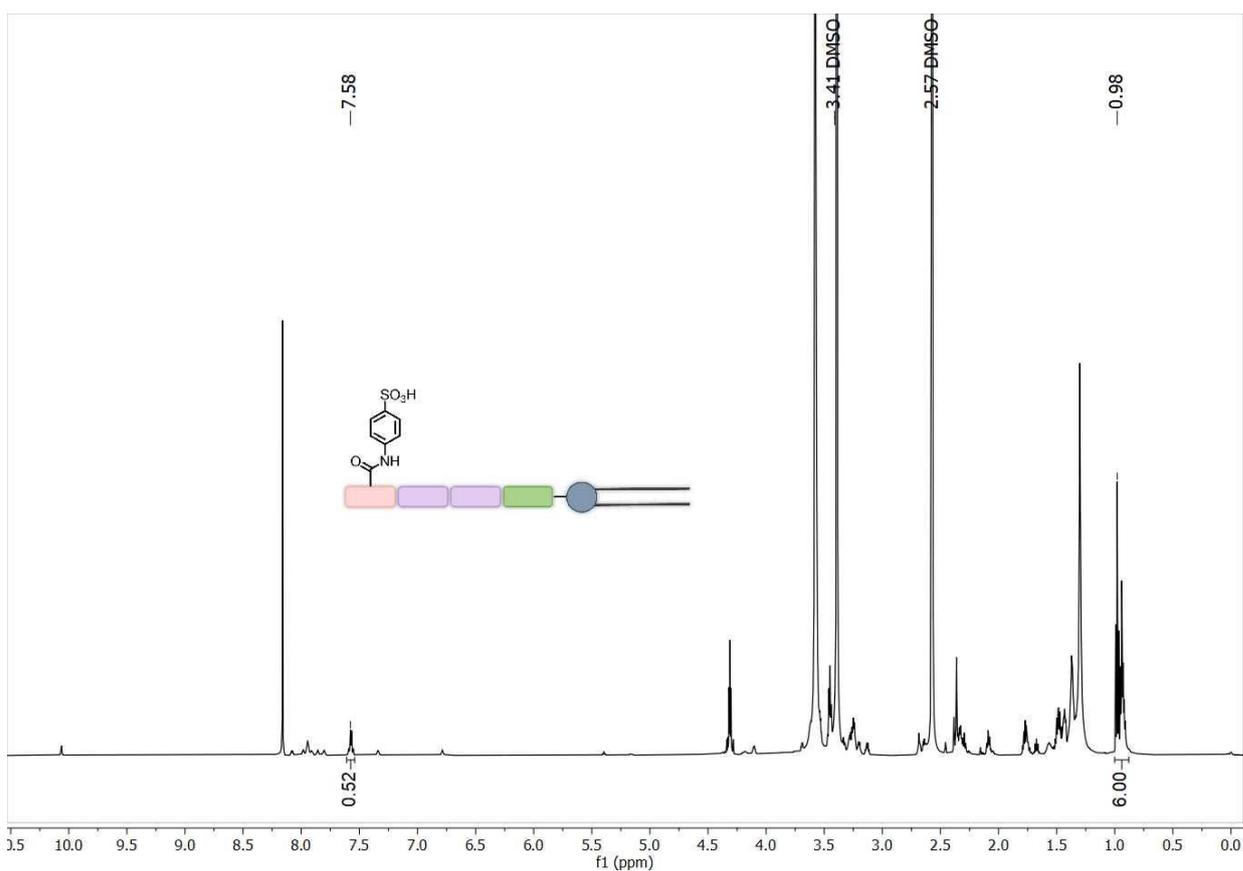


Abbildung 159: MALDI-TOF-MS Spektrum von Verbindung L16.

Abbildung 160: ¹H-NMR Spektrum von Verbindung L17.

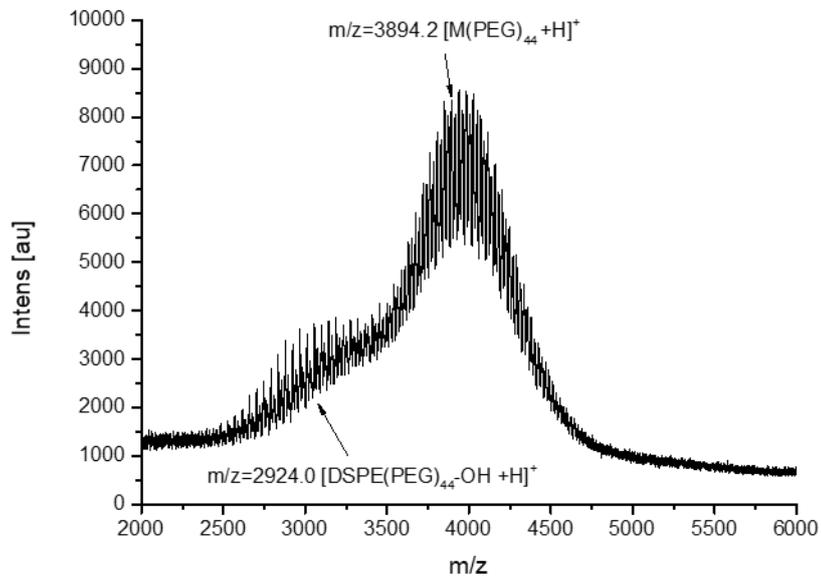


Abbildung 161: MALDI-TOF-MS Spektrum von Verbindung L17.

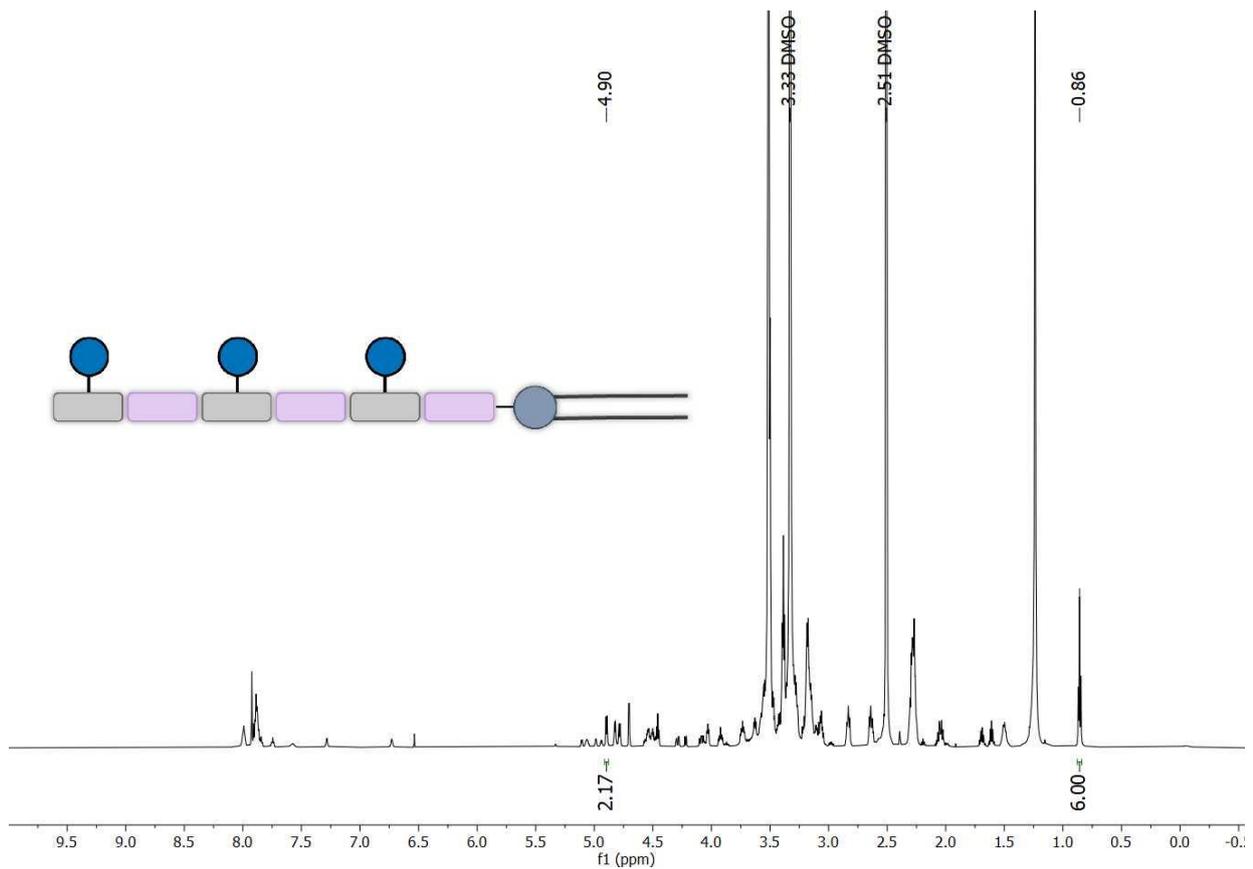


Abbildung 162: 1H -NMR Spektrum von Verbindung L18.

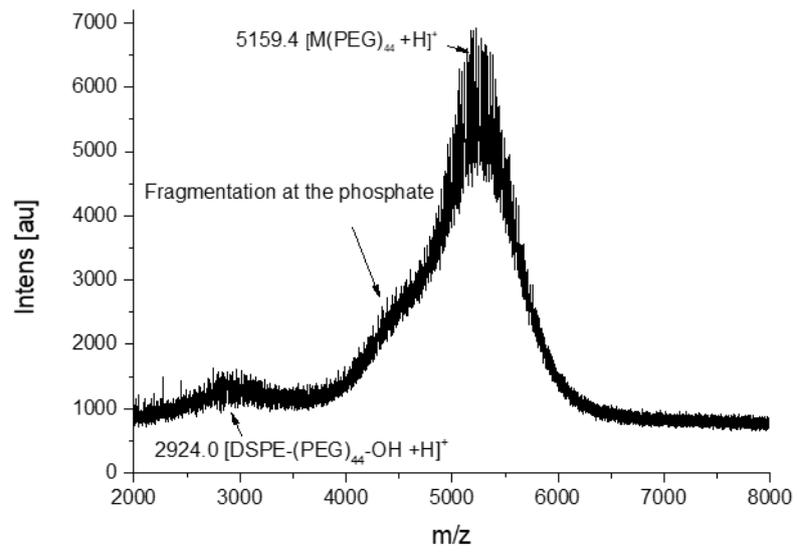


Abbildung 163: MALDI-TOF-MS Spektrum von Verbindung L18.

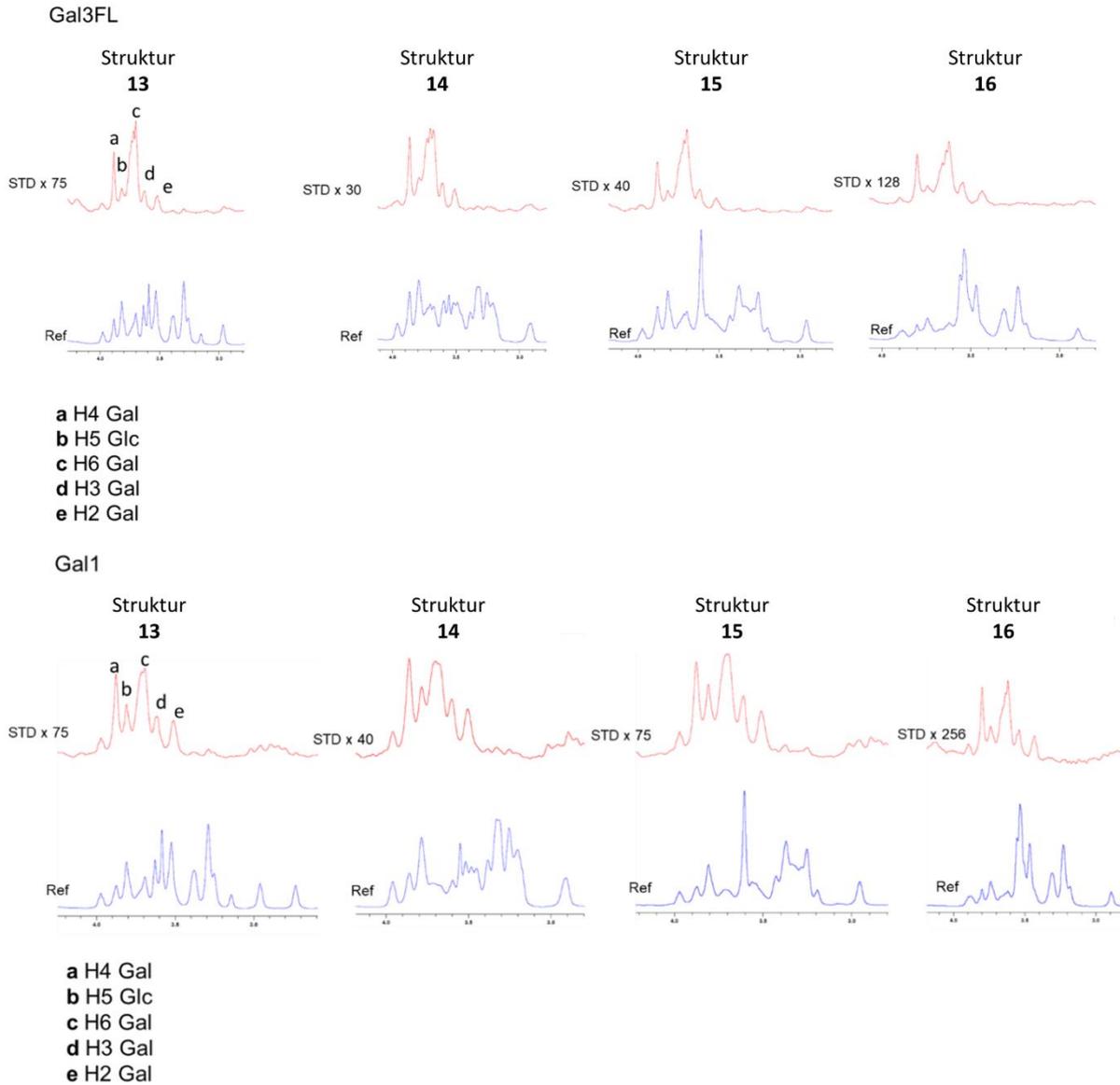


Abbildung 164: ^1H -STD-NMR-Spektren der Interaktion der Glykomakromoleküle mit Gal-3 (volle Länge) (oben) und Gal-1 (unten) (Daten erstellt am CICbioGUNE).

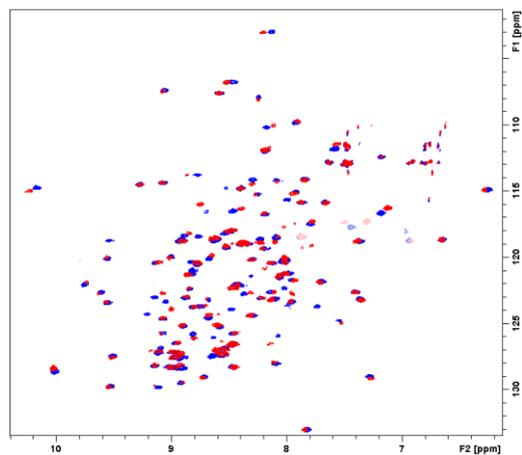


Abbildung 165: ^1H - ^{15}N -TROSY-NMR-Spektrum von Gal-1 (106 μM) nach Zugabe von 10 Äq. von 3-Lac-3- SO_3H (**14**) (Daten erstellt am CICbioGUNE).

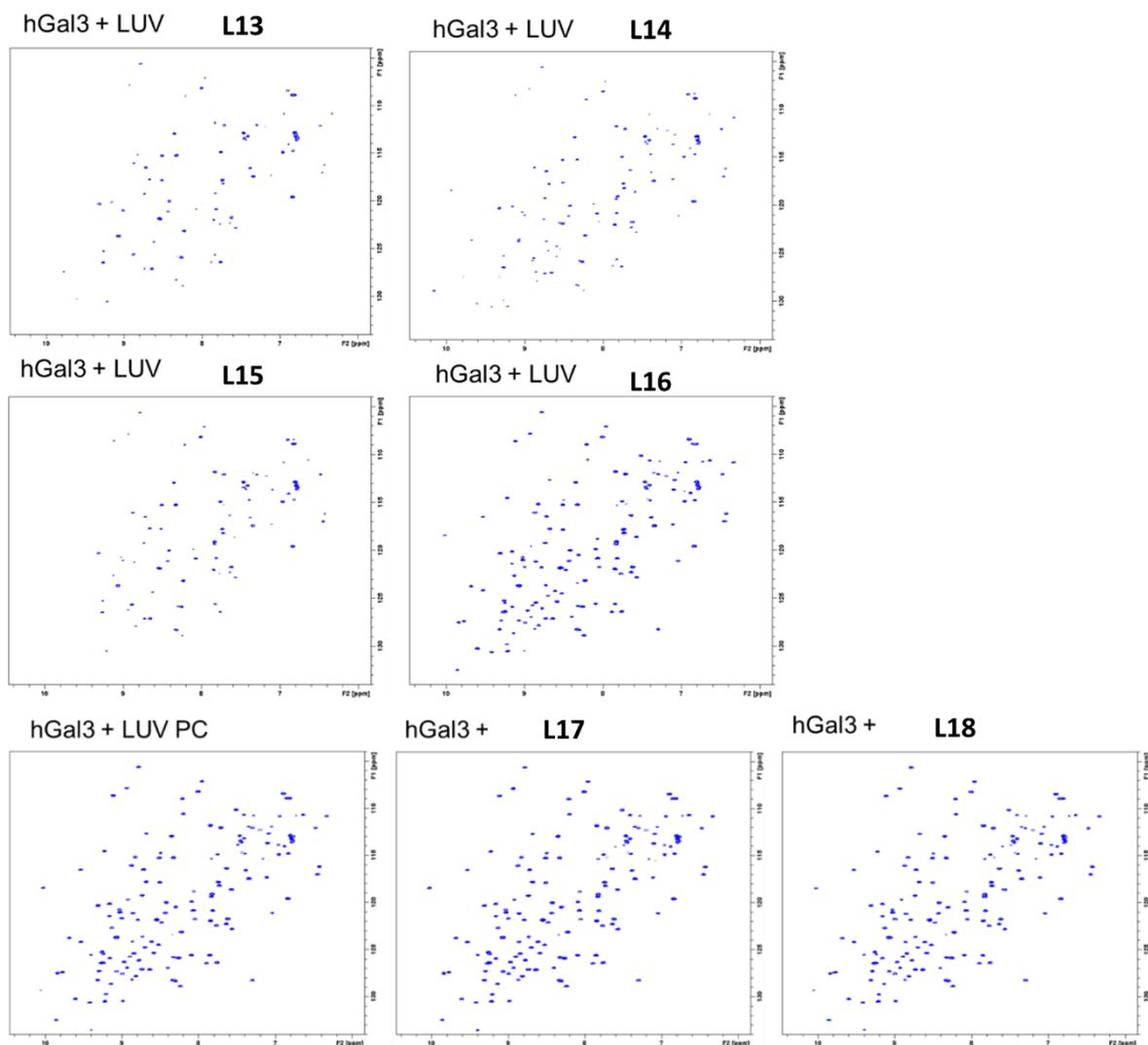


Abbildung 166: ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrum von Gal-3 ($50\ \mu\text{M}$) nach Zugabe von nackten Liposomen (PC LUV) bzw. von Liposomen funktionalisiert mit: **L13**, **L14**, **L15**, **L16**, **L17** und **L18** (Daten erstellt am CICbioGUNE).

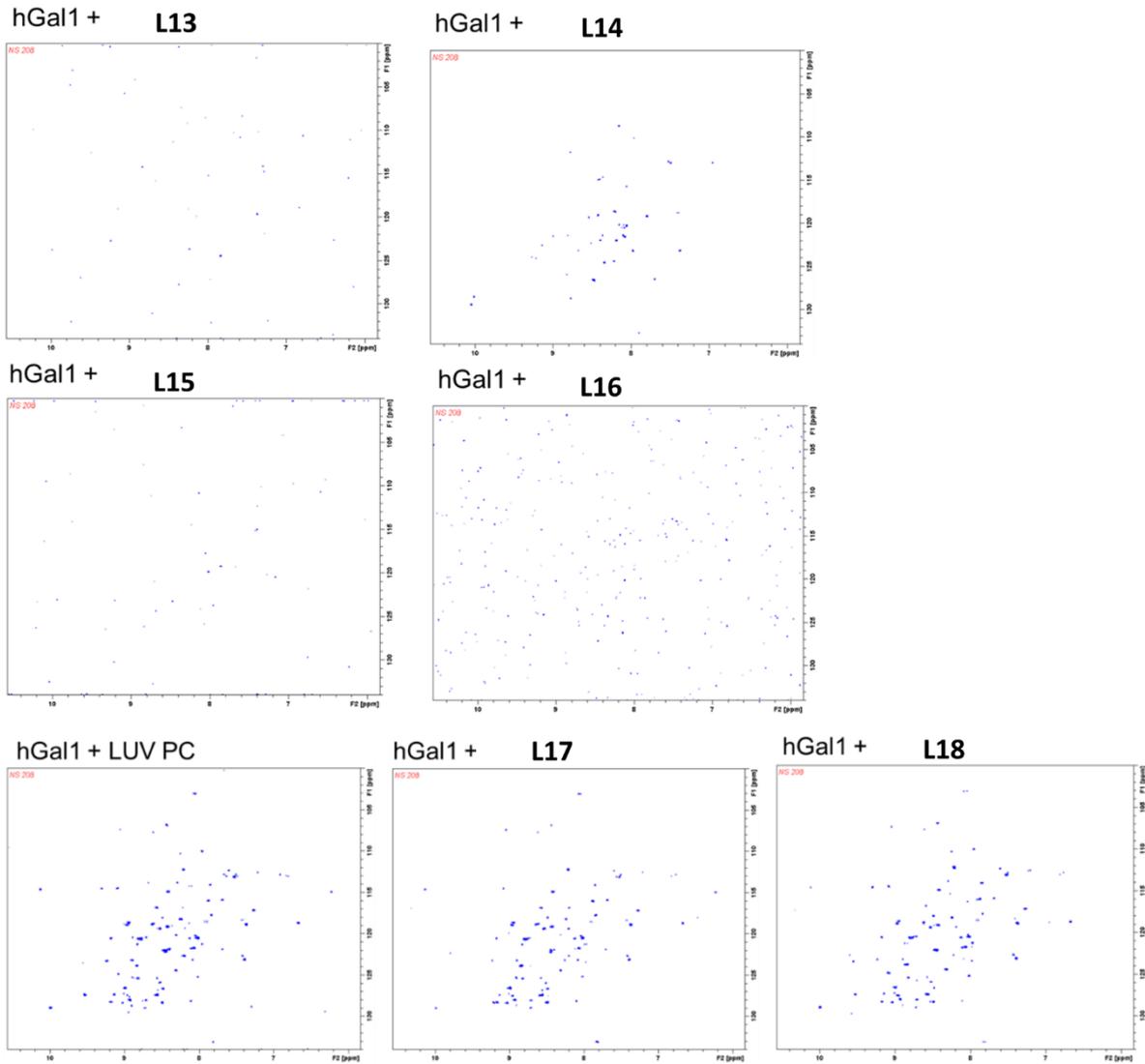


Abbildung 167: ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrum von Gal-1 ($50\ \mu\text{M}$) nach Zugabe von nackten Liposomen (PC LUV) bzw. von Liposomen funktionalisiert mit: **L13**, **L14**, **L15**, **L16**, **L17** und **L18** (Daten erstellt am CICbioGUNE).

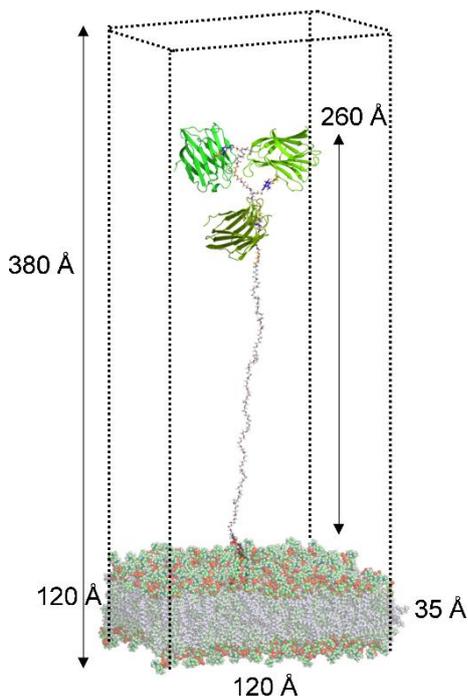


Abbildung 168: Full-atom Modell des Lipidkonjugats **L13** verankert in einer POPC Lipiddoppelschicht und mit drei angebenen Gal-3-Molekülen, die die Laktose-Einheiten binden (Daten erstellt am CICbioGUNE).

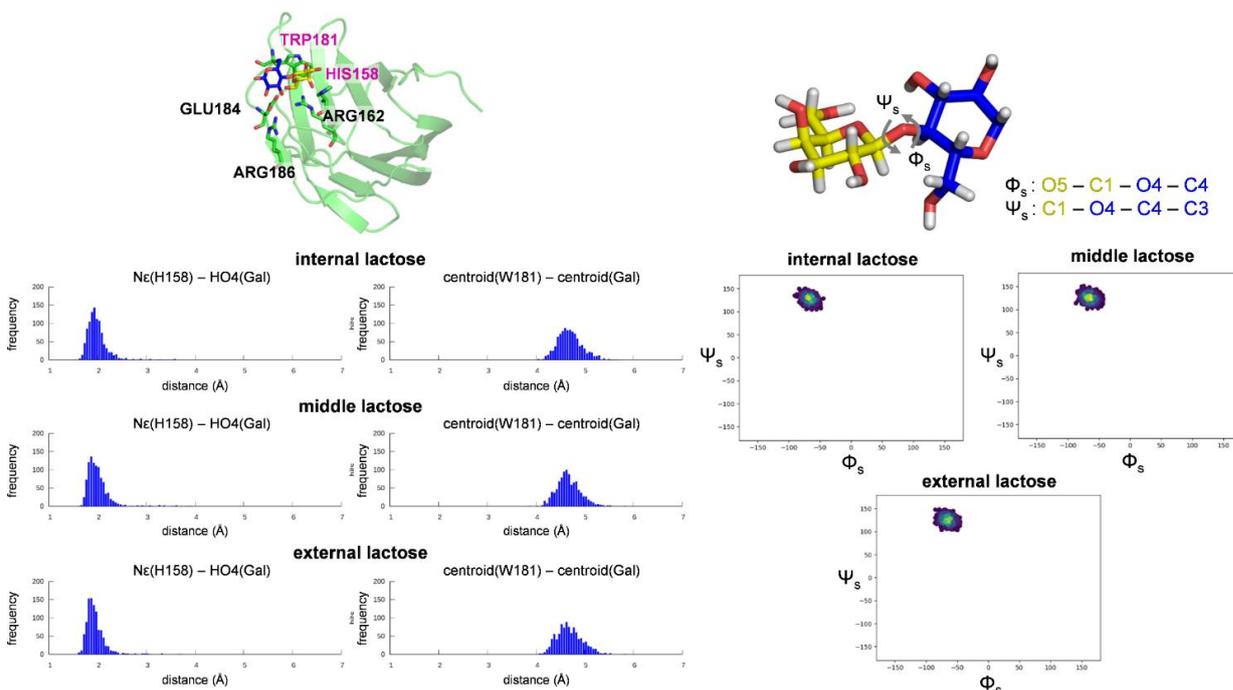


Abbildung 169: Analyse von Gal-3 gebunden an **L13** einer POPC-Doppelschicht durch MD Simulationen. Jede Laktose-Einheit bindet ein Gal-3-Molekül. Links: charakteristische Wasserstoffbrückenbindungen und CH/ π -Interaktionen; Rechts: die Geometrie der β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-glykosidischen Bindung (Daten erstellt am CICbioGUNE).

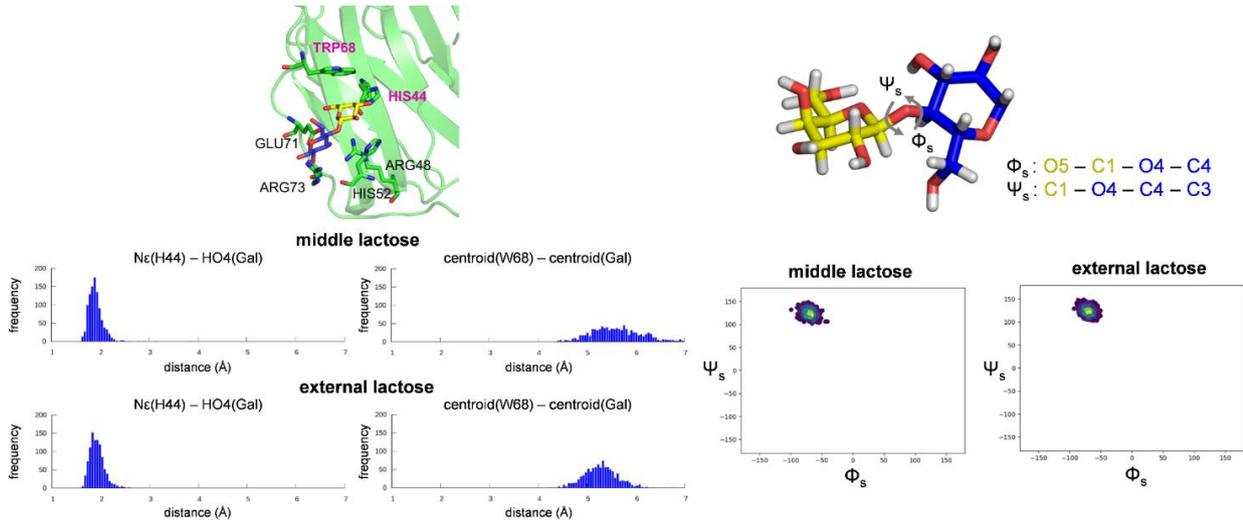


Abbildung 170: Analyse von Gal-1 gebunden an L13 einer POPC-Doppelschicht durch MD Simulationen. Jede Laktose-Einheit bindet ein Gal-3-Molekül. Links: charakteristische Wasserstoffbrückenbindungen und CH/ π -Interaktionen; Rechts: die Geometrie der β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-glykosidischen Bindung (Daten erstellt am CICbioGUNE).

7 Literaturverzeichnis

- (1) Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; et al.; editors. Glycans in Physiology and Disease. In *Essentials of Glycobiology*, 4th ed.; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022; Part V.
- (2) Rademacher, T. W.; Parekh, R. B.; Dwek, R. A. Glycobiology. *Annual Review of Biochemistry* **1988**, *57*, 785-838. DOI: 10.1146/annurev.bi.57.070188.004033
- (3) Dwek, R. A. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chemical Reviews* **1996**, *96* (2), 683-720. DOI: 10.1021/Cr940283b
- (4) Lee, Y. C.; Lee, R. T. Carbohydrate-Protein Interactions - Basis of Glycobiology. *Accounts of Chemical Research* **1995**, *28* (8), 321-327. DOI: 10.1021/Ar00056a001
- (5) Kobata, A. Glycobiology: An Expanding Research Area in Carbohydrate Chemistry. *Accounts of Chemical Research* **1993**, *26* (6), 319-324. DOI: 10.1021/ar00030a004
- (6) Opdenakker, G.; Rudd, P. M.; Ponting, C. P.; Dwek, R. A. Concepts and Principles of Glycobiology. *The FASEB Journal* **1993**, *7* (14), 1330-1337. DOI: 10.1096/fasebj.7.14.8224606
- (7) Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; et al.; editors. *Essentials of Glycobiology*; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015-2017.
- (8) Sackstein, R.; Stowell, S. R.; Hoffmeister, K. M.; et al. Glycans in Systemic Physiology. In *Essentials of Glycobiology*, 4th ed.; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., et al., editors Eds.; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022; Chapter 41.
- (9) Sackstein, R.; Hoffmeister, K. M.; Stowell, S. R.; et al. Glycans in Acquired Human Diseases. In *Essentials of Glycobiology*, 4th ed.; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., et al., editors Eds.; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022; Chapter 46.
- (10) Varki, A. Biological Roles of Oligosaccharides - All of the Theories Are Correct. *Glycobiology* **1993**, *3* (2), 97-130. DOI: 10.1093/glycob/3.2.97
- (11) Varki, A. Account for the 'Dark Matter' of Biology. *Nature* **2013**, *497* (7451), 565-565. DOI: 10.1038/497565a
- (12) Laine, R. A. Invited Commentary: A Calculation of All Possible Oligosaccharide Isomers Both Branched and Linear Yields 1.05×10^{12} Structures for a Reducing Hexasaccharide: The Isomer Barrier to Development of Single-Method Saccharide Sequencing or Synthesis Systems. *Glycobiology* **1994**, *4* (6), 759-767. DOI: 10.1093/glycob/4.6.759
- (13) Varki, A. Biological Roles of Glycans. *Glycobiology* **2017**, *27* (1), 3-49. DOI: 10.1093/glycob/cww086
- (14) Smith, B. A. H.; Bertozzi, C. R. The Clinical Impact of Glycobiology: Targeting Selectins, Siglecs and Mammalian Glycans. *Nature Reviews Drug Discovery* **2021**, *20* (3), 217-243. DOI: 10.1038/s41573-020-00093-1
- (15) Möckl, L. The Emerging Role of the Mammalian Glycocalyx in Functional Membrane Organization and Immune System Regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2020**, *8*, 253. DOI: 10.3389/fcell.2020.00253
- (16) Tarbell, J. M.; Cancel, L. M. The Glycocalyx and Its Significance in Human Medicine. *Journal of Internal Medicine* **2016**, *280* (1), 97-113. DOI: 10.1111/joim.12465
- (17) Weinbaum, S.; Tarbell, J. M.; Damiano, E. R. The Structure and Function of the Endothelial Glycocalyx Layer. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2007**, *9*, 121-167. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151959

- (18) Villalba, N.; Baby, S.; Yuan, S. Y. The Endothelial Glycocalyx as a Double-Edged Sword in Microvascular Homeostasis and Pathogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2021**, *9*, 711003. DOI: 10.3389/fcell.2021.711003
- (19) Ernst, B.; Magnani, J. L. From Carbohydrate Leads to Glycomimetic Drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, *8* (8), 661-677. DOI: 10.1038/nrd2852
- (20) Imberty, A.; Varrot, A. Microbial Recognition of Human Cell Surface Glycoconjugates. *Current Opinion in Structural Biology* **2008**, *18* (5), 567-576. DOI: 10.1016/j.sbi.2008.08.001
- (21) Werz, D. B.; Seeberger, P. H. Carbohydrates as the Next Frontier in Pharmaceutical Research. *Chemistry - A European Journal* **2005**, *11* (11), 3194-3206. DOI: 10.1002/chem.200500025
- (22) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. Chemical Glycobiology. *Science* **2001**, *291* (5512), 2357-2364. DOI: 10.1126/science.1059820
- (23) Soliman, C.; Yuriev, E.; Ramsland, P. A. Antibody Recognition of Aberrant Glycosylation on the Surface of Cancer Cells. *Current Opinion in Structural Biology* **2017**, *44*, 1-8. DOI: 10.1016/j.sbi.2016.10.009
- (24) Varki, A.; Cummings, R. D.; Aebi, M.; Packer, N. H.; Seeberger, P. H.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G.; Darvill, A.; Kinoshita, T.; Prestegard, J. J.; Schnaar, R. L.; Freeze, H. H.; Marth, J. D.; Bertozzi, C. R.; Etzler, M. E.; Frank, M.; Vliegenthart, J. F.; Lütteke, T.; Perez, S.; Bolton, E.; Rudd, P.; Paulson, J.; Kanehisa, M.; Toukach, P.; Aoki-Kinoshita, K. F.; Dell, A.; Narimatsu, H.; York, W.; Taniguchi, N.; Kornfeld, S. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology* **2015**, *25* (12), 1323-1324. DOI: 10.1093/glycob/cwv091
- (25) Neelamegham, S.; Aoki-Kinoshita, K.; Bolton, E.; Frank, M.; Lisacek, F.; Lütteke, T.; O'Boyle, N.; Packer, N. H.; Stanley, P.; Toukach, P.; Varki, A.; Woods, R. J.; Group, T. S. D. Updates to the Symbol Nomenclature for Glycans Guidelines. *Glycobiology* **2019**, *29* (9), 620-624. DOI: 10.1093/glycob/cwz045
- (26) Taylor, M. E.; Drickamer, K.; Imberty, A.; et al. Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. In *Essentials of Glycobiology*, 4th ed.; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., et al., editors Eds.; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022; Chapter 28.
- (27) Lewis, A. L.; Szymanski, C. M.; Schnaar, R. L.; et al. Bacterial and Viral Infections. In *Essentials of Glycobiology*, 4th ed.; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., et al. Eds.; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022; Chapter 42.
- (28) 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. DOI: 10.1002/cbic.200300753
- (29) Rudiger, H.; Siebert, H. C.; Solis, D.; Jimenez-Barbero, J.; Romero, A.; von der Lieth, C. W.; Diaz-Maurino, T.; Gabius, H. J. Medicinal Chemistry Based on the Sugar Code: Fundamentals of Lectinology and Experimental Strategies with Lectins as Targets. *Current Medicinal Chemistry* **2000**, *7* (4), 389-416. DOI: 10.2174/0929867003375164
- (30) Meiers, J.; Siebs, E.; Zahorska, E.; Titz, A. Lectin Antagonists in Infection, Immunity, and Inflammation. *Current Opinion in Chemical Biology* **2019**, *53*, 51-67. DOI: 10.1016/j.cbpa.2019.07.005
- (31) Bermejo-Jambrina, M.; Eder, J.; Helgers, L. C.; Hertoghs, N.; Nijmeijer, B. M.; Stunnenberg, M.; Geijtenbeek, T. B. H. C-Type Lectin Receptors in Antiviral Immunity and Viral Escape. *Frontiers in Immunology* **2018**, *9*. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00590
- (32) Stillmark, H. Über Ricin, ein Giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus Comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Inaugural Dissertation, Schnackenburg's Buchdruckerei, Dorpat, 1888.
- (33) Drickamer, K.; Taylor, M. E. Biology of Animal Lectins. *Annual Review of Cell Biology* **1993**, *9*, 237-264. DOI: DOI 10.1146/annurev.cb.09.110193.001321

- (34) Rini, J. M. Lectin Structure. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **1995**, *24*, 551-577. DOI: 10.1146/annurev.biophys.24.1.551
- (35) 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, 2008.
- (36) 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. DOI: 10.1021/cr500303t
- (37) Kiessling, L. L.; Grim, J. C. Glycopolymer Probes of Signal Transduction. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (10), 4476-4491. DOI: 10.1039/C3CS60097A
- (38) Lindhorst, T. K. Artificial Multivalent Sugar Ligands to Understand and Manipulate Carbohydrate-Protein Interactions. *Host-Guest Chemistry* **2002**, *218*, 201-235. DOI: 10.1007/3-540-45010-6_7
- (39) 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. DOI: 10.1021/ja027184x
- (40) Cummings, R. D.; Schnaar, R. L.; Esko, J. D.; et al. Principles of Glycan Recognition. In *Essentials of Glycobiology*, 4th ed.; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., et al., editors Eds.; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022; Chapter 29.
- (41) Lis, H.; Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews* **1998**, *98* (2), 637-674. DOI: 10.1021/Cr940413g
- (42) Fasting, C.; Schalley, C. A.; Weber, M.; Seitz, O.; Hecht, S.; Koksche, B.; Dornedde, J.; Graf, C.; Knapp, E. W.; Haag, R. Multivalency as a Chemical Organization and Action Principle. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (42), 10472-10498. DOI: 10.1002/anie.201201114
- (43) Laaf, D.; Bojarová, P.; Elling, L.; Křen, V. Galectin–Carbohydrate Interactions in Biomedicine and Biotechnology. *Trends in Biotechnology* **2019**, *37* (4), 402-415. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.10.001
- (44) Nangia-Makker, P.; Conklin, J.; Hogan, V.; Raz, A. Carbohydrate-Binding Proteins in Cancer, and Their Ligands as Therapeutic Agents. *Trends in Molecular Medicine* **2002**, *8* (4), 187-192. DOI: 10.1016/S1471-4914(02)02295-5
- (45) Klyosov, A. A.; Traber, P. G. Galectins in Disease and Potential Therapeutic Approaches. In *Galectins and Disease Implications for Targeted Therapeutics*, ACS Symposium Series, Vol. 1115; American Chemical Society, 2012; 1.
- (46) Lagana, A.; Goetz, J. G.; Cheung, P.; Raz, A.; Dennis, J. W.; Nabi, I. R. Galectin Binding to Mgat5-Modified N-Glycans Regulates Fibronectin Matrix Remodeling in Tumor Cells. *Molecular and Cellular Biology* **2006**, *26* (8), 3181-3193. DOI: 10.1128/mcb.26.8.3181-3193.2006
- (47) Johannes, L.; Jacob, R.; Leffler, H. Galectins at a Glance. *Journal of Cell Science* **2018**, *131* (9). DOI: 10.1242/jcs.208884
- (48) Cummings, R. D.; Liu, F. T.; Rabinovich, G. A.; et al. Galectins. In *Essentials of Glycobiology*, 4th ed.; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., et al., editors Eds.; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022; Chapter 36.
- (49) Fuster, M. M.; Esko, J. D. The Sweet and Sour of Cancer: Glycans as Novel Therapeutic Targets. *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5* (7), 526-542. DOI: 10.1038/nrc1649
- (50) Sethi, A.; Sanam, S.; Alvala, R.; Alvala, M. An Updated Patent Review of Galectin-1 and Galectin-3 Inhibitors and Their Potential Therapeutic Applications (2016–Present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2021**, *31* (8), 709-721. DOI: 10.1080/13543776.2021.1903430
- (51) Girard, A.; Magnani, J. L. Clinical Trials and Applications of Galectin Antagonists. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **2018**, *30* (172), SE211-SE220. DOI: 10.4052/tigg.1744.1SE

- (52) Smets, L. A.; van Beek, W. P. Carbohydrates of the Tumor Cell Surface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1984**, *738* (4), 237-249. DOI: 10.1016/0304-419X(83)90006-9
- (53) Belardi, B.; O'Donoghue, G. P.; Smith, A. W.; Groves, J. T.; Bertozzi, C. R. Investigating Cell Surface Galectin-Mediated Cross-Linking on Glycoengineered Cells. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (23), 9549-9552. DOI: 10.1021/ja301694s
- (54) Bertuzzi, S.; Quintana, J. I.; Ardá, A.; Gimeno, A.; Jiménez-Barbero, J. Targeting Galectins with Glycomimetics. *Frontiers in Chemistry* **2020**, *8*. DOI: 10.3389/fchem.2020.00593
- (55) Campo, V. L.; Marchiori, M. F.; Rodrigues, L. C.; Dias-Baruffi, M. Synthetic Glycoconjugates Inhibitors of Tumor-Related Galectin-3: An Update. *Glycoconjugate Journal* **2016**, *33* (6), 853-876. DOI: 10.1007/s10719-016-9721-z
- (56) Chen, H. Y.; Liu, F. T.; Yang, R. Y. Roles of Galectin-3 in Immune Responses. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **2005**, *53* (6), 497-504.
- (57) Collins, P. M.; Oberg, C. T.; Leffler, H.; Nilsson, U. J.; Blanchard, H. Taloside Inhibitors of Galectin-1 and Galectin-3. *Chemical Biology & Drug Design* **2012**, *79* (3), 339-346. DOI: 10.1111/j.1747-0285.2011.01283.x
- (58) Ebrahim, A. H.; Alalawi, Z.; Mirandola, L.; Rakhshanda, R.; Dahlbeck, S.; Nguyen, D.; Jenkins, M.; Grizzi, F.; Cobos, E.; Figueroa, J. A.; Chiriva-Internati, M. Galectins in Cancer: Carcinogenesis, Diagnosis and Therapy. *Annals of Translational Medicine* **2014**, *2* (9), 88. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.12
- (59) Henderson, N. C.; Sethi, T. The Regulation of Inflammation by Galectin-3. *Immunological Reviews* **2009**, *230* (1), 160-171. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2009.00794.x
- (60) Rech, C.; Rosencrantz, R. R.; Křenek, K.; Pelantová, H.; Bojarová, P.; Römer, C. E.; Hanisch, F.-G.; Křen, V.; Elling, L. Combinatorial One-Pot Synthesis of Poly-N-Acetyllactosamine Oligosaccharides with Leloir-Glycosyltransferases. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2011**, *353* (13), 2492-2500. DOI: 10.1002/adsc.201100375
- (61) Adamiak, K.; Anders, T.; Henze, M.; Keul, H.; Möller, M.; Elling, L. Chemo-Enzymatic Synthesis of Functionalized Oligomers of N-Acetyllactosamine Glycan Derivatives and Their Immobilization on Biomaterial Surfaces. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2012**, *84*, 108-114. DOI: 10.1016/j.molcatb.2012.02.002
- (62) Peng, W.; Pranskevich, J.; Nycholat, C.; Gilbert, M.; Wakarchuk, W.; Paulson, J. C.; Razi, N. Helicobacter Pylori β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase for Versatile Synthesis of Type 1 and Type 2 Poly-LacNAcs on N-Linked, O-Linked and I-Antigen Glycans. *Glycobiology* **2012**, *22* (11), 1453-1464. DOI: 10.1093/glycob/cws101
- (63) Fischöder, T.; Laaf, D.; Dey, C.; Elling, L. Enzymatic Synthesis of N-Acetyllactosamine (LacNAc) Type 1 Oligomers and Characterization as Multivalent Galectin Ligands. *Molecules* **2017**, *22* (8), 1320. DOI: 10.3390/molecules22081320
- (64) Sörme, P.; Arnoux, P.; Kahl-Knutsson, B.; Leffler, H.; Rini, J. M.; Nilsson, U. J. Structural and Thermodynamic Studies on Cation- π Interactions in Lectin-Ligand Complexes: High-Affinity Galectin-3 Inhibitors through Fine-Tuning of an Arginine-Arene Interaction. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (6), 1737-1743. DOI: 10.1021/ja043475p
- (65) Roy, R.; Cao, Y.; Kaltner, H.; Kottari, N.; Shiao, T. C.; Belkhadem, K.; André, S.; Manning, J. C.; Murphy, P. V.; Gabius, H.-J. Teaming up Synthetic Chemistry and Histochemistry for Activity Screening in Galectin-Directed Inhibitor Design. *Histochemistry and Cell Biology* **2017**, *147* (2), 285-301. DOI: 10.1007/s00418-016-1525-5

- (66) Blanchard, H.; Bum-Erdene, K.; Bohari, M. H.; Yu, X. Galectin-1 Inhibitors and Their Potential Therapeutic Applications: A Patent Review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2016**, *26* (5), 537-554. DOI: 10.1517/13543776.2016.1163338
- (67) Cumpstey, I.; Carlsson, S.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. Synthesis of a Phenyl Thio- β -D-Galactopyranoside Library from 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzene: Discovery of Efficient and Selective Monosaccharide Inhibitors of Galectin-7. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3* (10), 1922-1932. DOI: 10.1039/B502354H
- (68) Atmanene, C.; Ronin, C.; Téletchéa, S.; Gautier, F.-M.; Djedaïni-Pilard, F.; Ciesielski, F.; Vivat, V.; Grandjean, C. Biophysical and Structural Characterization of Mono/Di-Arylated Lactosamine Derivatives Interaction with Human Galectin-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2017**, *489* (3), 281-286. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.150
- (69) Cumpstey, I.; Salomonsson, E.; Sundin, A.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. Double Affinity Amplification of Galectin-Ligand Interactions through Arginine-Arene Interactions: Synthetic, Thermodynamic, and Computational Studies with Aromatic Diamido Thiodigalactosides. *Chemistry - A European Journal* **2008**, *14* (14), 4233-4245. DOI: 10.1002/chem.200701932
- (70) Rajput, V. K.; Leffler, H.; Nilsson, U. J.; Mukhopadhyay, B. Synthesis and Evaluation of Iminocoumaryl and Coumaryl Derivatized Glycosides as Galectin Antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24* (15), 3516-3520. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.05.063
- (71) Peterson, K.; Kumar, R.; Stenstrom, O.; Verma, P.; Verma, P. R.; Hakansson, M.; Kahl-Knutsson, B.; Zetterberg, F.; Leffler, H.; Akke, M.; Logan, D. T.; Nilsson, U. J. Systematic Tuning of Fluoro-Galectin-3 Interactions Provides Thiodigalactoside Derivatives with Single-Digit nM Affinity and High Selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *61* (3), 1164-1175. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b01626
- (72) Noresson, A. L.; Aurelius, O.; Oberg, C. T.; Engstrom, O.; Sundin, A. P.; Hakansson, M.; Stenstrom, O.; Akke, M.; Logan, D. T.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. Designing Interactions by Control of Protein-Ligand Complex Conformation: Tuning Arginine-Arene Interaction Geometry for Enhanced Electrostatic Protein-Ligand Interactions. *Chemical Science* **2018**, *9* (4), 1014-1021. DOI: 10.1039/c7sc04749e
- (73) Hsieh, T.-J.; Lin, H.-Y.; Tu, Z.; Lin, T.-C.; Wu, S.-C.; Tseng, Y.-Y.; Liu, F.-T.; Hsu, S.-T. D.; Lin, C.-H. Dual Thio-Digalactoside-Binding Modes of Human Galectins as the Structural Basis for the Design of Potent and Selective Inhibitors. *Scientific Reports* **2016**, *6* (1), 29457. DOI: 10.1038/srep29457
- (74) Zetterberg, F. R.; Peterson, K.; Johnsson, R. E.; Brimert, T.; Hakansson, M.; Logan, D. T.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. Monosaccharide Derivatives with Low-Nanomolar Lectin Affinity and High Selectivity Based on Combined Fluorine-Amide, Phenyl-Arginine, Sulfur-Pi, and Halogen Bond Interactions. *ChemMedChem* **2018**, *13* (2), 133-137. DOI: 10.1002/cmdc.201700744
- (75) Park, H.; Rosencrantz, R. R.; Elling, L.; Böker, A. Glycopolymer Brushes for Specific Lectin Binding by Controlled Multivalent Presentation of N-Acetyllactosamine Glycan Oligomers. *Macromolecular Rapid Communications* **2015**, *36* (1), 45-54. DOI: 10.1002/marc.201400453
- (76) André, S.; Grandjean, C.; Gautier, F.-M.; Bernardi, S.; Sansone, F.; Gabius, H.-J.; Ungaro, R. Combining Carbohydrate Substitutions at Bioinspired Positions with Multivalent Presentation Towards Optimising Lectin Inhibitors: Case Study with Calixarenes. *Chemical Communications* **2011**, *47* (21), 6126-6128. DOI: 10.1039/C1CC11163A
- (77) André, S.; Sansone, F.; Kaltner, H.; Casnati, A.; Kopitz, J.; Gabius, H.-J.; Ungaro, R. Calix[n]arene-Based Glycoclusters: Bioactivity of Thiourea-Linked Galactose/Lactose Moieties as Inhibitors of Binding of Medically Relevant Lectins to a Glycoprotein and Cell-Surface Glycoconjugates and Selectivity among Human Adhesion/Growth-Regulatory Galectins. *ChemBioChem* **2008**, *9* (10), 1649-1661. DOI: 10.1002/cbic.200800035

- (78) Bojarová, P.; Chytil, P.; Mikulová, B.; Bumba, L.; Konefał, R.; Pelantová, H.; Krejzová, J.; Slámová, K.; Petrásková, L.; Kotrčová, L.; Cvačka, J.; Etrych, T.; Křen, V. Glycan-Decorated HPMA Copolymers as High-Affinity Lectin Ligands. *Polymer Chemistry* **2017**, *8* (17), 2647-2658. DOI: 10.1039/c7py00271h
- (79) André, S.; Pieters, R. J.; Vrasidas, I.; Kaltner, H.; Kuwabara, I.; Liu, F. T.; Liskamp, R. M.; Gabius, H. J. Wedgelike Glycodendrimers as Inhibitors of Binding of Mammalian Galectins to Glycoproteins, Lactose Maxiclusters, and Cell Surface Glycoconjugates. *ChemBioChem* **2001**, *2* (11), 822-830. DOI: 10.1002/1439-7633(20011105)2:11<822::Aid-cbic822>3.0.Co;2-w
- (80) Wolfenden, M.; Cousin, J.; Nangia-Makker, P.; Raz, A.; Cloninger, M. Glycodendrimers and Modified ELISAs: Tools to Elucidate Multivalent Interactions of Galectins 1 and 3. *Molecules* **2015**, *20* (4), 7059-7096. DOI: 10.3390/molecules20047059
- (81) Goodman, C. K.; Wolfenden, M. L.; Nangia-Makker, P.; Michel, A. K.; Raz, A.; Cloninger, M. J. Multivalent Scaffolds Induce Galectin-3 Aggregation into Nanoparticles. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2014**, *10*, 1570-1577. DOI: 10.3762/bjoc.10.162
- (82) Bumba, L.; Laaf, D.; Spiwok, V.; Elling, L.; Kren, V.; Bojarova, P. Poly-N-Acetyllactosamine Neo-Glycoproteins as Nanomolar Ligands of Human Galectin-3: Binding Kinetics and Modeling. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19* (2). DOI: 10.3390/ijms19020372
- (83) Wang, H.; Huang, W.; Orwenyo, J.; Banerjee, A.; Vasta, G. R.; Wang, L.-X. Design and Synthesis of Glycoprotein-Based Multivalent Glyco-Ligands for Influenza Hemagglutinin and Human Galectin-3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21* (7), 2037-2044. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.01.028
- (84) Zhang, H.; Laaf, D.; Elling, L.; Pieters, R. J. Thiodigalactoside–Bovine Serum Albumin Conjugates as High-Potency Inhibitors of Galectin-3: An Outstanding Example of Multivalent Presentation of Small Molecule Inhibitors. *Bioconjugate Chemistry* **2018**, *29* (4), 1266-1275. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00047
- (85) Laaf, D.; Bojarová, P.; Pelantová, H.; Křen, V.; Elling, L. Tailored Multivalent Neo-Glycoproteins: Synthesis, Evaluation, and Application of a Library of Galectin-3-Binding Glycan Ligands. *Bioconjugate Chemistry* **2017**, *28* (11), 2832-2840. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00520
- (86) Glinsky, V. V.; Raz, A. Modified Citrus Pectin Anti-Metastatic Properties: One Bullet, Multiple Targets. *Carbohydrate Research* **2009**, *344* (14), 1788-1791. DOI: 10.1016/j.carres.2008.08.038
- (87) Fan, Y.; Sun, L.; Yang, S.; He, C.; Tai, G.; Zhou, Y. The Roles and Mechanisms of Homogalacturonan and Rhamnogalacturonan I Pectins on the Inhibition of Cell Migration. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *106*, 207-217. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.004
- (88) Guha, P.; Kaptan, E.; Bandyopadhyaya, G.; Kaczanowska, S.; Davila, E.; Thompson, K.; Martin, S. S.; Kalvakolanu, D. V.; Vasta, G. R.; Ahmed, H. Cod Glycopeptide with Picomolar Affinity to Galectin-3 Suppresses T-Cell Apoptosis and Prostate Cancer Metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110* (13), 5052-5057. DOI: 10.1073/pnas.1202653110
- (89) Blanchard, H.; Bum-Erdene, K.; Hugo, M. W. Inhibitors of Galectins and Implications for Structure-Based Design of Galectin-Specific Therapeutics. *Australian Journal of Chemistry* **2014**, *67* (12), 1763-1779. DOI: 10.1071/CH14362
- (90) Freichel, T.; Laaf, D.; Hoffmann, M.; Konietzny, P. B.; Heine, V.; Wawrzinek, R.; Rademacher, C.; Snyder, N. L.; Elling, L.; Hartmann, L. Effects of Linker and Liposome Anchoring on Lactose-Functionalized Glycomacromolecules as Multivalent Ligands for Binding Galectin-3. *RSC Advances* **2019**, *9* (41), 23484-23497. DOI: 10.1039/c9ra05497a
- (91) 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. *Journal of Organic Chemistry* **2017**, *82* (18), 9400-9409. DOI: 10.1021/acs.joc.7b01398

- (92) Freichel, T.; Heine, V.; Laaf, D.; Mackintosh, E. E.; Sarafova, S.; Elling, L.; Snyder, N. L.; Hartmann, L. Sequence-Defined Heteromultivalent Precision Glycomacromolecules Bearing Sulfonated/Sulfated Nonglycosidic Moieties Preferentially Bind Galectin-3 and Delay Wound Healing of a Galectin-3 Positive Tumor Cell Line in an in Vitro Wound Scratch Assay. *Macromolecular Bioscience* **2020**, *20*, 2000163. DOI: 10.1002/Mabi.202000163
- (93) Unione, L.; Gimeno, A.; Valverde, P.; Calloni, I.; Coelho, H.; Mirabella, S.; Poveda, A.; Arda, A.; Jimenez-Barbero, J. Glycans in Infectious Diseases. A Molecular Recognition Perspective. *Current Medicinal Chemistry* **2017**, *24* (36), 4057-4080. DOI: 10.2174/0929867324666170217093702
- (94) del Carmen Fernández-Alonso, M.; Díaz, D.; Berbis, M.; Marcelo, F.; Cañada, J.; Jiménez-Barbero, J. Protein-Carbohydrate Interactions Studied by NMR: From Molecular Recognition to Drug Design. *Current Protein & Peptide Science* **2012**, *13* (8), 816-830. DOI: 10.2174/138920312804871175
- (95) Ardá, A.; Jiménez-Barbero, J. The Recognition of Glycans by Protein Receptors. Insights from NMR Spectroscopy. *Chemical Communications* **2018**, *54* (38), 4761-4769. DOI: 10.1039/C8CC01444B
- (96) Gimeno, A.; Valverde, P.; Ardá, A.; Jiménez-Barbero, J. Glycan Structures and Their Interactions with Proteins. A NMR View. *Current Opinion in Structural Biology* **2020**, *62*, 22-30. DOI: 10.1016/j.sbi.2019.11.004
- (97) Unione, L.; Galante, S.; Díaz, D.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. NMR and Molecular Recognition. The Application of Ligand-Based NMR Methods to Monitor Molecular Interactions. *MedChemComm* **2014**, *5* (9), 1280-1289. DOI: 10.1039/C4MD00138A
- (98) Viegas, A.; Manso, J.; Nobrega, F. L.; Cabrita, E. J. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *Journal of Chemical Education* **2011**, *88* (7), 990-994. DOI: 10.1021/ed101169t
- (99) Marchetti, R.; Perez, S.; Arda, A.; Imberty, A.; Jimenez-Barbero, J.; Silipo, A.; Molinaro, A. "Rules of Engagement" of Protein–Glycoconjugate Interactions: A Molecular View Achievable by Using NMR Spectroscopy and Molecular Modeling. *ChemistryOpen* **2016**, *5* (4), 274-296. DOI: 10.1002/open.201600024
- (100) Williamson, M. P. Using Chemical Shift Perturbation to Characterise Ligand Binding. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2013**, *73*, 1-16. DOI: 10.1016/j.pnmrs.2013.02.001
- (101) Harding, S. *Protein-Ligand Interactions: Structure and Spectroscopy*; Oxford University Press, 2001.
- (102) Becker, W.; Bhattiprolu, K. C.; Gubensäk, N.; Zangger, K. Investigating Protein-Ligand Interactions by Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *ChemPhysChem* **2018**, *19* (8), 895-906. DOI: 10.1002/cphc.201701253
- (103) Daffern, N.; Nordyke, C.; Zhang, M.; Palmer, A. G., III; Straub, J. E. Dynamical Models of Chemical Exchange in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *The Biophysicist* **2021**, *3* (1), 13-34. DOI: 10.35459/tbp.2021.000201
- (104) Kjellén, L.; Lindahl, U. Proteoglycans: Structures and Interactions. *Annual Review of Biochemistry* **1991**, *60* (1), 443-475. DOI: 10.1146/annurev.bi.60.070191.002303
- (105) Xu, D.; Prestegard, J. H.; Linhardt, R. J.; et al. Proteins That Bind Sulfated Glycosaminoglycans. In *Essentials of Glycobiology*, 4th ed.; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., et al. Eds.; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022; Chapter 38.
- (106) Ihrcke, N. S.; Wrenshall, L. E.; Lindman, B. J.; Platt, J. L. Role of Heparan Sulfate in Immune System-Blood Vessel Interactions. *Immunology Today* **1993**, *14* (10), 500-505. DOI: 10.1016/0167-5699(93)90265-m

- (107) Li, J. P.; Kusche-Gullberg, M. Chapter Six - Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, Jeon, K. W. Ed.; Vol. 325; Academic Press, 2016.
- (108) Kjellén, L.; Lindahl, U. Specificity of Glycosaminoglycan–Protein Interactions. *Current Opinion in Structural Biology* **2018**, *50*, 101-108. DOI: 10.1016/j.sbi.2017.12.011
- (109) Kreuger, J.; Spillmann, D.; Li, J.-p.; Lindahl, U. Interactions between Heparan Sulfate and Proteins: The Concept of Specificity. *The Journal of cell biology* **2006**, *174* (3), 323-327. DOI: 10.1083/jcb.200604035
- (110) Lindahl, U.; Kusche-Gullberg, M.; Kjellén, L. Regulated Diversity of Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273* (39), 24979-24982. DOI: 10.1074/jbc.273.39.24979
- (111) Kreuger, J.; Kjellén, L. Heparan Sulfate Biosynthesis: Regulation and Variability. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **2012**, *60* (12), 898-907. DOI: 10.1369/0022155412464972
- (112) Carlsson, P.; Kjellén, L. Heparin Biosynthesis. In *Heparin - a Century of Progress*, Lever, R., Mulloy, B., Page, C. P. Eds.; Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- (113) Sasisekharan, R.; Venkataraman, G. Heparin and Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure and Function. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4* (6), 626-631. DOI: 10.1016/S1367-5931(00)00145-9
- (114) Meneghetti, M. C. Z.; Hughes, A. J.; Rudd, T. R.; Nader, H. B.; Powell, A. K.; Yates, E. A.; Lima, M. A. Heparan Sulfate and Heparin Interactions with Proteins. *Journal of The Royal Society, Interface* **2015**, *12* (110), 20150589. DOI: 10.1098/rsif.2015.0589
- (115) Billings, P. C.; Pacifici, M. Interactions of Signaling Proteins, Growth Factors and Other Proteins with Heparan Sulfate: Mechanisms and Mysteries. *Connective Tissue Research* **2015**, *56* (4), 272-280. DOI: 10.3109/03008207.2015.1045066
- (116) Weiss, R. J.; Esko, J. D.; Tor, Y. Targeting Heparin and Heparan Sulfate Protein Interactions. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2017**, *15* (27), 5656-5668. DOI: 10.1039/C7OB01058C
- (117) Farrugia, B. L.; Lord, M. S.; Melrose, J.; Whitelock, J. M. The Role of Heparan Sulfate in Inflammation, and the Development of Biomimetics as Anti-Inflammatory Strategies. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **2018**, *66* (4), 321-336. DOI: 10.1369/0022155417740881
- (118) Seeberger, P. H.; Freedberg, D. I.; Cummings, R. D. Glycans in Biotechnology and the Pharmaceutical Industry. In *Essentials of Glycobiology*, 4th ed.; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., et al., editors Eds.; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022; Chapter 57.
- (119) Florian, J. A.; Kosky, J. R.; Ainslie, K.; Pang, Z.; Dull, R. O.; Tarbell, J. M. Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Mechanosensor on Endothelial Cells. *Circulation Research* **2003**, *93* (10), e136-e142. DOI: 10.1161/01.RES.0000101744.47866.D5
- (120) Gómez Toledo, A.; Sorrentino, J. T.; Sandoval, D. R.; Malmström, J.; Lewis, N. E.; Esko, J. D. A Systems View of the Heparan Sulfate Interactome. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **2021**, *69* (2), 105-119. DOI: 10.1369/0022155420988661
- (121) Vallet, S. D.; Clerc, O.; Ricard-Blum, S. Glycosaminoglycan-Protein Interactions: The First Draft of the Glycosaminoglycan Interactome. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **2021**, *69* (2), 93-104. DOI: 10.1369/0022155420946403
- (122) Gandhi, N. S.; Mancera, R. L. The Structure of Glycosaminoglycans and Their Interactions with Proteins. *Chemical Biology & Drug Design* **2008**, *72* (6), 455-482. DOI: 10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x
- (123) Gama, C. I.; Hsieh-Wilson, L. C. Chemical Approaches to Deciphering the Glycosaminoglycan Code. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, *9* (6), 609-619. DOI: 10.1016/j.cbpa.2005.10.003

- (124) Gama, C. I.; Tully, S. E.; Sotogaku, N.; Clark, P. M.; Rawat, M.; Vaidehi, N.; Goddard, W. A., 3rd; Nishi, A.; Hsieh-Wilson, L. C. Sulfation Patterns of Glycosaminoglycans Encode Molecular Recognition and Activity. *Nature Chemical Biology* **2006**, *2* (9), 467-473. DOI: 10.1038/nchembio810
- (125) Capila, I.; Linhardt, R. J. Heparin–Protein Interactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41* (3), 390-412. DOI: 10.1002/1521-3773(20020201)41:3<390::AID-ANIE390>3.0.CO;2-B
- (126) El Masri, R.; Seffouh, A.; Lortat-Jacob, H.; Vivès, R. R. The “in and out” of Glucosamine 6-O-sulfation: The 6th Sense of Heparan Sulfate. *Glycoconjugate Journal* **2017**, *34* (3), 285-298. DOI: 10.1007/s10719-016-9736-5
- (127) Raman, R.; Venkataraman, G.; Ernst, S.; Sasisekharan, V.; Sasisekharan, R. Structural Specificity of Heparin Binding in the Fibroblast Growth Factor Family of Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100* (5), 2357-2362. DOI: 10.1073/pnas.0437842100
- (128) Lu, L.-D.; Shie, C.-R.; Kulkarni, S. S.; Pan, G.-R.; Lu, X.-A.; Hung, S.-C. Synthesis of 48 Disaccharide Building Blocks for the Assembly of a Heparin and Heparan Sulfate Oligosaccharide Library. *Organic Letters* **2006**, *8* (26), 5995-5998. DOI: 10.1021/ol062464t
- (129) Hu, Y.-P.; Zhong, Y.-Q.; Chen, Z.-G.; Chen, C.-Y.; Shi, Z.; Zulueta, M. M. L.; Ku, C.-C.; Lee, P.-Y.; Wang, C.-C.; Hung, S.-C. Divergent Synthesis of 48 Heparan Sulfate-Based Disaccharides and Probing the Specific Sugar–Fibroblast Growth Factor-1 Interaction. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (51), 20722-20727. DOI: 10.1021/ja3090065
- (130) Faham, S.; Linhardt, R. J.; Rees, D. C. Diversity Does Make a Difference: Fibroblast Growth Factor–Heparin Interactions. *Current Opinion in Structural Biology* **1998**, *8* (5), 578-586. DOI: 10.1016/S0959-440x(98)80147-4
- (131) Ashikari-Hada, S.; Habuchi, H.; Kariya, Y.; Itoh, N.; Reddi, A. H.; Kimata, K. Characterization of Growth Factor-Binding Structures in Heparin/Heparan Sulfate Using an Octasaccharide Library. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (13), 12346-12354. DOI: 10.1074/jbc.M313523200
- (132) Turnbull, J. E.; Gallagher, J. T. Distribution of Iduronate 2-Sulphate Residues in Heparan Sulphate. Evidence for an Ordered Polymeric Structure. *Biochemical Journal* **1991**, *273* (3), 553-559. DOI: 10.1042/bj2730553
- (133) Mah, D.; Zhao, J.; Liu, X.; Zhang, F.; Liu, J.; Wang, L.; Linhardt, R.; Wang, C. The Sulfation Code of Tauopathies: Heparan Sulfate Proteoglycans in the Prion Like Spread of Tau Pathology. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2021**, *8*, 671458-671458. DOI: 10.3389/fmolb.2021.671458
- (134) Wang, Z.; Arnold, K.; Dhurandhare, V. M.; Xu, Y.; Liu, J. Investigation of the Biological Functions of Heparan Sulfate Using a Chemoenzymatic Synthetic Approach. *RSC Chemical Biology* **2021**, *2* (3), 702-712. DOI: 10.1039/d0cb00199f
- (135) Roy, R.; Murphy, P. V.; Gabius, H. J. Multivalent Carbohydrate-Lectin Interactions: How Synthetic Chemistry Enables Insights into Nanometric Recognition. *Molecules* **2016**, *21* (5). DOI: 10.3390/molecules21050629
- (136) Lindahl, U.; Li, J. p. Chapter 3 Interactions between Heparan Sulfate and Proteins—Design and Functional Implications. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol. 276; Academic Press, 2009.
- (137) Linhardt, R. J. 2003 Claude S. Hudson Award Address in Carbohydrate Chemistry. Heparin: Structure and Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46* (13), 2551-2564. DOI: 10.1021/jm030176m
- (138) Imberty, A.; Lortat-Jacob, H.; Pérez, S. Structural View of Glycosaminoglycan–Protein Interactions. *Carbohydrate Research* **2007**, *342* (3), 430-439. DOI: 10.1016/j.carres.2006.12.019

- (139) Fan, P.; Gao, Y.; Zheng, M.; Xu, T.; Schoenhagen, P.; Jin, Z. Recent Progress and Market Analysis of Anticoagulant Drugs. *Journal of Thoracic Disease* **2018**, *10* (3), 2011-2025. DOI: 10.21037/jtd.2018.03.95
- (140) Gray, E.; Mulloy, B.; Barrowcliffe, T. W. Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin. *Thrombosis and Haemostasis* **2008**, *99* (5), 807-818. DOI: 10.1160/th08-01-0032
- (141) Choay, J.; Petitou, M.; Lormeau, J. C.; Sinay, P.; Casu, B.; Gatti, G. Structure-Activity Relationship in Heparin - a Synthetic Pentasaccharide with High-Affinity for Anti-Thrombin-III and Eliciting High Anti-Factor-Xa Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1983**, *116* (2), 492-499. DOI: 10.1016/0006-291x(83)90550-8
- (142) Johnson, D. J.; Li, W.; Adams, T. E.; Huntington, J. A. Antithrombin-S195A Factor Xa-Heparin Structure Reveals the Allosteric Mechanism of Antithrombin Activation. *The EMBO Journal* **2006**, *25* (9), 2029-2037. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601089
- (143) Olson, S. T.; Richard, B.; Izaguirre, G.; Schedin-Weiss, S.; Gettins, P. G. W. Molecular Mechanisms of Antithrombin-Heparin Regulation of Blood Clotting Proteinases. A Paradigm for Understanding Proteinase Regulation by Serpin Family Protein Proteinase Inhibitors. *Biochimie* **2010**, *92* (11), 1587-1596. DOI: 10.1016/j.biochi.2010.05.011
- (144) Li, W.; Johnson, D. J. D.; Esmon, C. T.; Huntington, J. A. Structure of the Antithrombin-Thrombin-Heparin Ternary Complex Reveals the Antithrombotic Mechanism of Heparin. *Nature Structural & Molecular Biology* **2004**, *11* (9), 857-862. DOI: 10.1038/nsmb811
- (145) Olson, S. T.; Chuang, Y. J. Heparin Activates Antithrombin Anticoagulant Function by Generating New Interaction Sites (Exosites) for Blood Clotting Proteinases. *Trends in Cardiovascular Medicine* **2002**, *12* (8), 331-338. DOI: 10.1016/s1050-1738(02)00183-4
- (146) Huntington, J. A. Chapter 13 - Heparin Activation of Serpins. In *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*, Garg, H. G., Linhardt, R. J., Hales, C. A. Eds.; Elsevier Science, 2005.
- (147) Shukla, D.; Liu, J.; Blaiklock, P.; Shworak, N. W.; Bai, X.; Esko, J. D.; Cohen, G. H.; Eisenberg, R. J.; Rosenberg, R. D.; Spear, P. G. A Novel Role for 3-O-Sulfated Heparan Sulfate in Herpes Simplex Virus 1 Entry. *Cell* **1999**, *99* (1), 13-22. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80058-6
- (148) Chopra, P.; Logun, M. T.; White, E. M.; Lu, W. G.; Locklin, J.; Karumbaiah, L.; Boons, G. J. Fully Synthetic Heparan Sulfate-Based Neural Tissue Construct That Maintains the Undifferentiated State of Neural Stem Cells. *ACS Chemical Biology* **2019**, *14* (9), 1921-1929. DOI: 10.1021/acscchembio.9b00401
- (149) Lorente-Gea, L.; Garcia, B.; Martin, C.; Ordiales, H.; Garcia-Suarez, O.; Pina-Batista, K. M.; Merayo-Llodes, J.; Quiros, L. M.; Fernandez-Vega, I. Heparan Sulfate Proteoglycans Undergo Differential Expression Alterations in Alzheimer Disease Brains. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **2020**, *79* (5), 474-483. DOI: 10.1093/jnen/nlaa016
- (150) Elgundi, Z.; Papanicolaou, M.; Major, G.; Cox, T. R.; Melrose, J.; Whitelock, J. M.; Farrugia, B. L. Cancer Metastasis: The Role of the Extracellular Matrix and the Heparan Sulfate Proteoglycan Perlecan. *Frontiers in Oncology* **2020**, *9*. DOI: 10.3389/fonc.2019.01482
- (151) Sasaki, M.; Anindita, P. D.; Ito, N.; Sugiyama, M.; Carr, M.; Fukuhara, H.; Ose, T.; Maenaka, K.; Takada, A.; Hall, W. W.; Orba, Y.; Sawa, H. The Role of Heparan Sulfate Proteoglycans as an Attachment Factor for Rabies Virus Entry and Infection. *Journal of Infectious Diseases* **2018**, *217* (11), 1740-1749. DOI: 10.1093/infdis/jiy081
- (152) Mitra, D.; Hasan, M. H.; Bates, J. T.; Bierdeman, M. A.; Ederer, D. R.; Parmar, R. C.; Fassero, L. A.; Liang, Q.; Qiu, H.; Tiwari, V.; Zhang, F.; Linhardt, R. J.; Sharp, J. S.; Wang, L.; Tandon, R. The Degree of Polymerization and Sulfation Patterns in Heparan Sulfate Are Critical Determinants of Cytomegalovirus Entry into Host Cells. *PLoS Pathogens* **2021**, *17* (8), e1009803. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009803

- (153) Chittum, J. E.; Sankaranarayanan, N. V.; O'Hara, C. P.; Desai, U. R. On the Selectivity of Heparan Sulfate Recognition by SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2021**, *12* (11), 1710-1717. DOI: 10.1021/acsmchemlett.1c00343
- (154) Liu, L.; Chopra, P.; Li, X.; Bouwman, K. M.; Tompkins, S. M.; Wolfert, M. A.; de Vries, R. P.; Boons, G.-J. Heparan Sulfate Proteoglycans as Attachment Factor for SARS-CoV-2. *ACS Central Science* **2021**, *7* (6), 1009-1018. DOI: 10.1021/acscentsci.1c00010
- (155) Condomitti, G.; de Wit, J. Heparan Sulfate Proteoglycans as Emerging Players in Synaptic Specificity. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **2018**, *11* (14). DOI: 10.3389/fnmol.2018.00014
- (156) Schultz, V.; Suflita, M.; Liu, X.; Zhang, X.; Yu, Y.; Li, L.; Green, D. E.; Xu, Y.; Zhang, F.; DeAngelis, P. L.; Liu, J.; Linhardt, R. J. Heparan Sulfate Domains Required for Fibroblast Growth Factor 1 and 2 Signaling through Fibroblast Growth Factor Receptor 1c. *Journal of Biological Chemistry* **2017**, *292* (6), 2495-2509. DOI: 10.1074/jbc.M116.761585
- (157) Shi, D.; Sheng, A.; Chi, L. Glycosaminoglycan-Protein Interactions and Their Roles in Human Disease. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2021**, *8*, 639666-639666. DOI: 10.3389/fmolb.2021.639666
- (158) Aquino, R. S.; Park, P. W. Glycosaminoglycans and Infection. *Frontiers in Bioscience-Landmark* **2016**, *21* (6), 1260-1277. DOI: 10.2741/4455
- (159) Zhu, W.; Li, J.; Liang, G. How Does Cellular Heparan Sulfate Function in Viral Pathogenicity? *Biomedical and Environmental Sciences* **2011**, *24* (1), 81-87. DOI: 10.3967/0895-3988.2011.01.011
- (160) Mulloy, B. *Glycosaminoglycans and Proteoglycans*; MDPI-Printed Edition of the Special Issue Published in Pharmaceuticals, 2018. DOI: 10.3390/books978-3-03842-836-7.
- (161) Agelidis, A.; Shukla, D. Heparanase, Heparan Sulfate and Viral Infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2020**, *1221*, 759-770. DOI: 10.1007/978-3-030-34521-1_32
- (162) Chen, Y.; Götte, M.; Liu, J.; Park, P. W. Microbial Subversion of Heparan Sulfate Proteoglycans. *Molecules and Cells* **2008**, *26* (5), 415-426.
- (163) Koganti, R.; Suryawanshi, R.; Shukla, D. Heparanase, Cell Signaling, and Viral Infections. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2020**, *77* (24), 5059-5077. DOI: 10.1007/s00018-020-03559-y
- (164) Cagno, V.; Tseligka, E. D.; Jones, S. T.; Tapparel, C. Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: True Receptors or Adaptation Bias? *Viruses* **2019**, *11* (7), 596. DOI: 10.3390/v11070596
- (165) De Pasquale, V.; Quiccione, M. S.; Tafuri, S.; Avallone, L.; Pavone, L. M. Heparan Sulfate Proteoglycans in Viral Infection and Treatment: A Special Focus on SARS-CoV-2. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (12), 6574. DOI: 10.3390/ijms22126574
- (166) Koganti, R.; Memon, A.; Shukla, D. Emerging Roles of Heparan Sulfate Proteoglycans in Viral Pathogenesis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **2021**, *47* (03), 283-294. DOI: 10.1055/s-0041-1725068
- (167) Aquino, R. S.; Lee, E. S.; Park, P. W. Diverse Functions of Glycosaminoglycans in Infectious Diseases. *Glycosaminoglycans in Development, Health and Disease* **2010**, *93*, 373-394. DOI: 10.1016/S1877-1173(10)93016-0
- (168) Kamhi, E.; Joo, E. J.; Dordick, J. S.; Linhardt, R. J. Glycosaminoglycans in Infectious Disease. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **2013**, *88* (4), 928-943. DOI: 10.1111/brv.12034
- (169) Bartlett, A. H.; Park, P. W. Heparan Sulfate Proteoglycans in Infection. *Glycans in Diseases and Therapeutics* **2011**, 31-62. DOI: 10.1007/978-3-642-16833-8_2
- (170) Clausen, T. M.; Sandoval, D. R.; Spliid, C. B.; Pihl, J.; Perrett, H. R.; Painter, C. D.; Narayanan, A.; Majowicz, S. A.; Kwong, E. M.; McVicar, R. N.; Thacker, B. E.; Glass, C. A.; Yang, Z.; Torres, J. L.; Golden, G. J.; Bartels, P. L.; Porell, R. N.; Garretson, A. F.; Laubach, L.; Feldman, J.; Yin, X.; Pu, Y.; Hauser, B. M.;

- Caradonna, T. M.; Kellman, B. P.; Martino, C.; Gordts, P. L. S. M.; Chanda, S. K.; Schmidt, A. G.; Godula, K.; Leibel, S. L.; Jose, J.; Corbett, K. D.; Ward, A. B.; Carlin, A. F.; Esko, J. D. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. *Cell* **2020**, *183* (4), 1043-+. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.033
- (171) Schuurs, Z. P.; Hammond, E.; Elli, S.; Rudd, T. R.; Mycroft-West, C. J.; Lima, M. A.; Skidmore, M. A.; Karlsson, R.; Chen, Y.-H.; Bagdonaite, I.; Yang, Z.; Ahmed, Y. A.; Richard, D. J.; Turnbull, J.; Ferro, V.; Coombe, D. R.; Gandhi, N. S. Evidence of a Putative Glycosaminoglycan Binding Site on the Glycosylated SARS-CoV-2 Spike Protein N-terminal Domain. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2021**, *19*, 2806-2818. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.05.002
- (172) du Preez, H. N.; Aldous, C.; Hayden, M. R.; Kruger, H. G.; Lin, J. Pathogenesis of COVID-19 Described through the Lens of an Undersulfated and Degraded Epithelial and Endothelial Glycocalyx. *FASEB Journal* **2022**, *36* (1), e22052. DOI: 10.1096/fj.202101100RR
- (173) Zhang, Q.; Chen, C. Z.; Swaroop, M.; Xu, M.; Wang, L.; Lee, J.; Wang, A. Q.; Pradhan, M.; Hagen, N.; Chen, L.; Shen, M.; Luo, Z.; Xu, X.; Xu, Y.; Huang, W.; Zheng, W.; Ye, Y. Heparan Sulfate Assists SARS-CoV-2 in Cell Entry and Can Be Targeted by Approved Drugs in Vitro. *Cell Discovery* **2020**, *6* (1), 80. DOI: 10.1038/s41421-020-00222-5
- (174) Nie, C.; Sahoo, A. K.; Netz, R. R.; Herrmann, A.; Ballauff, M.; Haag, R. Charge Matters: Mutations in Omicron Variant Favor Binding to Cells. *ChemBioChem* **2022**, e202100681. DOI: 10.1002/cbic.202100681
- (175) Mignani, S.; Shi, X.; Karpus, A.; Lentini, G.; Majoral, J. P. Functionalized Dendrimer Platforms as a New Forefront Arsenal Targeting SARS-CoV-2: An Opportunity. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (9). DOI: 10.3390/pharmaceutics13091513
- (176) Nie, C.; Pouyan, P.; Lauster, D.; Trimpert, J.; Kerkhoff, Y.; Szekeres, G. P.; Wallert, M.; Block, S.; Sahoo, A. K.; Dervede, J.; Pagel, K.; Kaufer, B. B.; Netz, R. R.; Ballauff, M.; Haag, R. Polysulfates Block SARS-CoV-2 Uptake through Electrostatic Interactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2021**, *60* (29), 15870-15878. DOI: 10.1002/anie.202102717
- (177) Tandon, R.; Sharp, J. S.; Zhang, F.; Pomin, V. H.; Ashpole, N. M.; Mitra, D.; McCandless, M. G.; Jin, W.; Liu, H.; Sharma, P.; Linhardt, R. J. Effective Inhibition of SARS-CoV-2 Entry by Heparin and Enoxaparin Derivatives. *Journal of Virology* **2021**, *95* (3), e01987-01920. DOI: 10.1128/jvi.01987-20
- (178) Mycroft-West, C. J.; Su, D.; Pagani, I.; Rudd, T. R.; Elli, S.; Gandhi, N. S.; Guimond, S. E.; Miller, G. J.; Meneghetti, M. C. Z.; Nader, H. B.; Li, Y.; Nunes, Q. M.; Procter, P.; Mancini, N.; Clementi, M.; Bisio, A.; Forsyth, N. R.; Ferro, V.; Turnbull, J. E.; Guerrini, M.; Fernig, D. G.; Vicenzi, E.; Yates, E. A.; Lima, M. A.; Skidmore, M. A. Heparin Inhibits Cellular Invasion by SARS-CoV-2: Structural Dependence of the Interaction of the Spike S1 Receptor-Binding Domain with Heparin. *Thrombosis and Haemostasis* **2020**, *120* (12), 1700-1715. DOI: 10.1055/s-0040-1721319
- (179) Kim, S. Y.; Jin, W.; Sood, A.; Montgomery, D. W.; Grant, O. C.; Fuster, M. M.; Fu, L.; Dordick, J. S.; Woods, R. J.; Zhang, F.; Linhardt, R. J. Characterization of Heparin and Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spike Glycoprotein Binding Interactions. *Antiviral Research* **2020**, *181*, 104873. DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104873
- (180) Yu, M.; Zhang, T.; Zhang, W.; Sun, Q.; Li, H.; Li, J.-P. Elucidating the Interactions between Heparin/Heparan Sulfate and SARS-CoV-2-Related Proteins—an Important Strategy for Developing Novel Therapeutics for the COVID-19 Pandemic. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2021**, *7*, 628551. DOI: 10.3389/fmolb.2020.628551
- (181) Ayerbe, L.; Risco, C.; Ayis, S. The Association between Treatment with Heparin and Survival in Patients with COVID-19. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* **2020**, *50* (2), 298-301. DOI: 10.1007/s11239-020-02162-z

- (182) Chhabra, M.; Doherty, G. G.; See, N. W.; Gandhi, N. S.; Ferro, V. From Cancer to COVID-19: A Perspective on Targeting Heparan Sulfate-Protein Interactions. *The Chemical Record* **2021**, *21* (11), 3087-3101. DOI: 10.1002/tcr.202100125
- (183) Weiss, C.; Carriere, M.; Fusco, L.; Capua, I.; Regla-Nava, J. A.; Pasquali, M.; Scott, J. A.; Vitale, F.; Unal, M. A.; Mattevi, C.; Bedognetti, D.; Merkoçi, A.; Tasciotti, E.; Yilmazer, A.; Gogotsi, Y.; Stellacci, F.; Delogu, L. G. Toward Nanotechnology-Enabled Approaches against the COVID-19 Pandemic. *ACS Nano* **2020**, *14* (6), 6383-6406. DOI: 10.1021/acsnano.0c03697
- (184) Vahedifard, F.; Chakravarthy, K. Nanomedicine for COVID-19: The Role of Nanotechnology in the Treatment and Diagnosis of COVID-19. *Emergent Materials* **2021**, *4* (1), 75-99. DOI: 10.1007/s42247-021-00168-8
- (185) Sharma, A.; Kontodimas, K.; Bosmann, M. Nanomedicine: A Diagnostic and Therapeutic Approach to COVID-19. *Frontiers in Medicine* **2021**, *8*. DOI: 10.3389/fmed.2021.648005
- (186) Guimond, S. E.; Mycroft-West, C. J.; Gandhi, N. S.; Tree, J. A.; Le, T. T.; Spalluto, C. M.; Humbert, M. V.; Buttigieg, K. R.; Coombes, N.; Elmore, M. J.; Wand, M.; Nyström, K.; Said, J.; Setoh, Y. X.; Amarilla, A. A.; Modhiran, N.; Sng, J. D. J.; Chhabra, M.; Young, P. R.; Rawle, D. J.; Lima, M. A.; Yates, E. A.; Karlsson, R.; Miller, R. L.; Chen, Y.-H.; Bagdonaite, I.; Yang, Z.; Stewart, J.; Nguyen, D.; Laidlaw, S.; Hammond, E.; Dredge, K.; Wilkinson, T. M. A.; Watterson, D.; Khromykh, A. A.; Suhrbier, A.; Carroll, M. W.; Trybala, E.; Bergström, T.; Ferro, V.; Skidmore, M. A.; Turnbull, J. E. Synthetic Heparan Sulfate Mimetic Pixatimod (PG545) Potently Inhibits SARS-CoV-2 by Disrupting the Spike-ACE2 Interaction. *ACS Central Science* **2022**, *8* (5), 527-545. DOI: 10.1021/acscentsci.1c01293
- (187) Suenaga, T.; Arase, H. Viral Interactions with Glycans. *Glycoscience: Biology and Medicine* **2014**, 785-794. DOI: 10.1007/978-4-431-54841-6_152
- (188) Shanker, S.; Hu, L.; Ramani, S.; Atmar, R. L.; Estes, M. K.; Venkataram Prasad, B. V. Structural Features of Glycan Recognition among Viral Pathogens. *Current Opinion in Structural Biology* **2017**, *44*, 211-218. DOI: 10.1016/j.sbi.2017.05.007
- (189) Horsfall, F. L., Jr.; McCarty, M. The Modifying Effects of Certain Substances of Bacterial Origin on the Course of Infection with Pneumonia Virus of Mice (PVM). *Journal of Experimental Medicine* **1947**, *85* (6), 623-646. DOI: 10.1084/jem.85.6.623
- (190) Takemoto, K. K.; Liebhauer, H. Virus-Polysaccharide Interactions: I. An Agar Polysaccharide Determining Plaque Morphology of EMC Virus. *Virology* **1961**, *14* (4), 456-462. DOI: 10.1016/0042-6822(61)90338-5
- (191) Liebhauer, H.; Takemoto, K. K. Alteration of Plaque Morphology of EMC Virus with Polycations. *Virology* **1961**, *14* (4), 502-504. DOI: 10.1016/0042-6822(61)90349-X
- (192) Takemoto, K. K.; Spicer, S. S. Effects of Natural and Synthetic Sulfated Polysaccharides on Viruses and Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1965**, *130* (1), 365-373. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1965.tb12570.x
- (193) Baba, M.; Snoeck, R.; Pauwels, R.; de Clercq, E. Sulfated Polysaccharides Are Potent and Selective Inhibitors of Various Enveloped Viruses, Including Herpes Simplex Virus, Cytomegalovirus, Vesicular Stomatitis Virus, and Human Immunodeficiency Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1988**, *32* (11), 1742-1745. DOI: 10.1128/AAC.32.11.1742
- (194) Pirrone, V.; Wigdahl, B.; Krebs, F. C. The Rise and Fall of Polyanionic Inhibitors of the Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Antiviral Research* **2011**, *90* (3), 168-182. DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.03.176
- (195) Bianculli, R. H.; Mase, J. D.; Schulz, M. D. Antiviral Polymers: Past Approaches and Future Possibilities. *Macromolecules* **2020**, *53* (21), 9158-9186. DOI: 10.1021/acs.macromol.0c01273

- (196) Sorin, M. N.; Kuhn, J.; Stasiak, A. C.; Stehle, T. Structural Insight into Non-Enveloped Virus Binding to Glycosaminoglycan Receptors: A Review. *Viruses* **2021**, *13* (5), 800. DOI: 10.3390/v13050800
- (197) Mercer, J.; Schelhaas, M.; Helenius, A. Virus Entry by Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* **2010**, *79* (1), 803-833. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060208-104626
- (198) Akhtar, J.; Shukla, D. Viral Entry Mechanisms: Cellular and Viral Mediators of Herpes Simplex Virus Entry. *FEBS Journal* **2009**, *276* (24), 7228-7236. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07402.x
- (199) Bernard, K. A.; Klimstra, W. B.; Johnston, R. E. Mutations in the E2 Glycoprotein of Venezuelan Equine Encephalitis Virus Confer Heparan Sulfate Interaction, Low Morbidity, and Rapid Clearance from Blood of Mice. *Virology* **2000**, *276* (1), 93-103. DOI: 10.1006/viro.2000.0546
- (200) Kim, S. Y.; Li, B.; Linhardt, R. J. Pathogenesis and Inhibition of Flaviviruses from a Carbohydrate Perspective. *Pharmaceuticals* **2017**, *10* (2), 44. DOI: 10.3390/ph10020044
- (201) Tree, J. A.; Turnbull, J. E.; Buttigieg, K. R.; Elmore, M. J.; Coombes, N.; Hogwood, J.; Mycroft-West, C. J.; Lima, M. A.; Skidmore, M. A.; Karlsson, R.; Chen, Y. H.; Yang, Z.; Spalluto, C. M.; Staples, K. J.; Yates, E. A.; Gray, E.; Singh, D.; Wilkinson, T.; Page, C. P.; Carroll, M. W. Unfractionated Heparin Inhibits Live Wild Type SARS-CoV-2 Cell Infectivity at Therapeutically Relevant Concentrations. *British Journal of Pharmacology* **2021**, *178* (3), 626-635. DOI: 10.1111/bph.15304
- (202) Liu, H.; Zhang, Z.; Linhardt, R. J. Lessons Learned from the Contamination of Heparin. *Natural Product Reports* **2009**, *26* (3), 313-321. DOI: 10.1039/b819896a
- (203) Guerrini, M.; Beccati, D.; Shriver, Z.; Naggi, A.; Viswanathan, K.; Bisio, A.; Capila, I.; Lansing, J. C.; Guglieri, S.; Fraser, B.; Al-Hakim, A.; Gunay, N. S.; Zhang, Z.; Robinson, L.; Buhse, L.; Nasr, M.; Woodcock, J.; Langer, R.; Venkataraman, G.; Linhardt, R. J.; Casu, B.; Torri, G.; Sasisekharan, R. Oversulfated Chondroitin Sulfate Is a Contaminant in Heparin Associated with Adverse Clinical Events. *Nature Biotechnology* **2008**, *26* (6), 669-675. DOI: 10.1038/nbt1407
- (204) Linhardt, R. J.; Liu, J. Synthetic Heparin. *Current Opinion in Pharmacology* **2012**, *12* (2), 217-219. DOI: 10.1016/j.coph.2011.12.002
- (205) Mohamed, S.; Coombe, D. R. Heparin Mimetics: Their Therapeutic Potential. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* **2017**, *10* (4), 78. DOI: 10.3390/ph10040078
- (206) Paluck, S. J.; Nguyen, T. H.; Maynard, H. D. Heparin-Mimicking Polymers: Synthesis and Biological Applications. *Biomacromolecules* **2016**, *17* (11), 3417-3440. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b01147
- (207) Afosah, D. K.; Al-Horani, R. A. Sulfated Non-Saccharide Glycosaminoglycan Mimetics as Novel Drug Discovery Platform for Various Pathologies. *Current Medicinal Chemistry* **2020**, *27* (21), 3412-3447. DOI: 10.2174/0929867325666181120101147
- (208) Hoffmann, M.; Snyder, N. L.; Hartmann, L. Polymers Inspired by Heparin and Heparan Sulfate for Viral Targeting. *Macromolecules* **2022**, *55* (18), 7957-7973. DOI: 10.1021/acs.macromol.2c00675
- (209) Purcell, S. C.; Godula, K. Synthetic Glycoscapes: Addressing the Structural and Functional Complexity of the Glycocalyx. *Interface Focus* **2019**, *9* (2), 20180080. DOI: 10.1098/rsfs.2018.0080
- (210) Critcher, M.; O'Leary, T.; Huang, M. L. Glycoengineering: Scratching the Surface. *Biochemical Journal* **2021**, *478* (4), 703-719. DOI: 10.1042/bcj20200612
- (211) Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S. W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K. Liposome: Classification, Preparation, and Applications. *Nanoscale Research Letters* **2013**, *8* (1), 102. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102
- (212) Maherani, B.; Arab-Tehrany, E.; Mozafari, M. R.; Gaiani, C.; Linder, M. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Current Nanoscience* **2011**, *7* (3), 436-452. DOI: 10.2174/157341311795542453

- (213) Sharma, A.; Sharma, U. S. Liposomes in Drug Delivery: Progress and Limitations. *International Journal of Pharmaceutics* **1997**, *154* (2), 123-140. DOI: 10.1016/S0378-5173(97)00135-X
- (214) Pulsipher, A.; Griffin, M. E.; Stone, S. E.; Brown, J. M.; Hsieh-Wilson, L. C. Directing Neuronal Signaling through Cell-Surface Glycan Engineering. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (19), 6794-6797. DOI: 10.1021/ja5005174
- (215) Huang, M. L.; Smith, R. A. A.; Trieger, G. W.; Godula, K. Glycocalyx Remodeling with Proteoglycan Mimetics Promotes Neural Specification in Embryonic Stem Cells. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (30), 10565-10568. DOI: 10.1021/ja505012a
- (216) Naticchia, M. R.; Laubach, L. K.; Honigfort, D. J.; Purcell, S. C.; Godula, K. Spatially Controlled Glycocalyx Engineering for Growth Factor Patterning in Embryoid Bodies. *Biomaterials Science* **2021**, *9* (5), 1652-1659. DOI: 10.1039/D0BM01434F
- (217) Huang, M. L.; Tota, E. M.; Lucas, T. M.; Godula, K. Influencing Early Stages of Neuromuscular Junction Formation through Glycocalyx Engineering. *ACS Chemical Neuroscience* **2018**, *9* (12), 3086-3093. DOI: 10.1021/acscemneuro.8b00295
- (218) Woods, E. C.; Yee, N. A.; Shen, J.; Bertozzi, C. R. Glycocalyx Engineering with a Recycling Glycopolymer That Increases Cell Survival in Vivo. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (52), 15782-15788. DOI: 10.1002/anie.201508783
- (219) Honigfort, D. J.; Altman, M. O.; Gagneux, P.; Godula, K. Glycocalyx Crowding with Mucin Mimetics Strengthens Binding of Soluble and Virus-Associated Lectins to Host Cell Glycan Receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2021**, *118* (40). DOI: 10.1073/pnas.2107896118
- (220) Jiménez Blanco, J. L.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. Multivalency in Heterogeneous Glycoenvironments: Hetero-Glycoclusters, -Glycopolymers and -Glycoassemblies. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (11), 4518-4531. DOI: 10.1039/C2CS35219B
- (221) Eller, S.; Collot, M.; Yin, J.; Hahm, H. S.; Seeberger, P. H. Automated Solid-Phase Synthesis of Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycans. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (22), 5858-5861. DOI: 10.1002/anie.201210132
- (222) Hölemann, A.; Seeberger, P. H. Carbohydrate Diversity: Synthesis of Glycoconjugates and Complex Carbohydrates. *Current Opinion in Biotechnology* **2004**, *15* (6), 615-622. DOI: 10.1016/j.copbio.2004.10.001
- (223) Seeberger, P. H.; Werz, D. B. Synthesis and Medical Applications of Oligosaccharides. *Nature* **2007**, *446* (7139), 1046-1051. DOI: 10.1038/nature05819
- (224) Sears, P.; Wong, C. H. Carbohydrate Mimetics: A New Strategy for Tackling the Problem of Carbohydrate-Mediated Biological Recognition. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38* (16), 2300-2324. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3773(19990816)38:16<2300::AID-ANIE2300>3.0.CO;2-6
- (225) Tamburrini, A.; Colombo, C.; Bernardi, A. Design and Synthesis of Glycomimetics: Recent Advances. *Medicinal Research Reviews* **2020**, *40* (2), 495-531. DOI: 10.1002/med.21625
- (226) Wang, Z.; Hsieh, P.-H.; Xu, Y.; Thieker, D.; Chai, E. J. E.; Xie, S.; Cooley, B.; Woods, R. J.; Chi, L.; Liu, J. Synthesis of 3-O-sulfated Oligosaccharides to Understand the Relationship between Structures and Functions of Heparan Sulfate. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139* (14), 5249-5256. DOI: 10.1021/jacs.7b01923
- (227) Mende, M.; Bednarek, C.; Wawryszyn, M.; Sauter, P.; Biskup, M. B.; Schepers, U.; Bräse, S. Chemical Synthesis of Glycosaminoglycans. *Chemical Reviews* **2016**, *116* (14), 8193-8255. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00010

- (228) Karlsson, R.; Chopra, P.; Joshi, A.; Yang, Z.; Vakhrushev, S. Y.; Clausen, T. M.; Painter, C. D.; Szekeres, G. P.; Chen, Y.-H.; Sandoval, D. R.; Hansen, L.; Esko, J. D.; Pagel, K.; Dyer, D. P.; Turnbull, J. E.; Clausen, H.; Boons, G.-J.; Miller, R. L. Dissecting Structure-Function of 3-O-sulfated Heparin and Engineered Heparan Sulfates. *Science Advances* **2021**, *7* (52), eabl6026. DOI: 10.1126/sciadv.abl6026
- (229) Fraser-Reid, B. O.; Tatsuta, K.; Thiem, J.; Eds. *Glycoscience - Chemistry and Chemical Biology*; Springer, 2008.
- (230) Becer, C. R. The Glycopolymer Code: Synthesis of Glycopolymers and Multivalent Carbohydrate-Lectin Interactions. *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, *33* (9), 742-752. DOI: 10.1002/marc.201200055
- (231) Boden, S.; Reise, F.; Kania, J.; Lindhorst, T. K.; Hartmann, L. Sequence-Defined Introduction of Hydrophobic Motifs and Effects in Lectin Binding of Precision Glycomacromolecules. *Macromolecular Bioscience* **2019**, *19* (4), 1800425. DOI: 10.1002/mabi.201800425
- (232) Huang, Y.; Shaw, M. A.; Warmin, M. R.; Mullins, E. S.; Ayres, N. Blood Compatibility of Heparin-Inspired, Lactose Containing, Polyureas Depends on the Chemistry of the Polymer Backbone. *Polymer Chemistry* **2016**, *7* (23), 3897-3905. DOI: 10.1039/c6py00616g
- (233) Pagé, D.; Zanini, D.; Roy, R. Macromolecular Recognition: Effect of Multivalency in the Inhibition of Binding of Yeast Mannan to Concanavalin A and Pea Lectins by Mannosylated Dendrimers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, *4* (11), 1949-1961. DOI: 10.1016/S0968-0896(96)00177-0
- (234) Muñoz-Bonilla, A.; León, O.; Bordegé, V.; Sánchez-Chaves, M.; Fernández-García, M. Controlled Block Glycopolymers Able to Bind Specific Proteins. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2013**, *51* (6), 1337-1347. DOI: 10.1002/pola.26501
- (235) Igde, S.; Roblitz, S.; Muller, 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*, 1700198. DOI: 10.1002/mabi.201700206
- (236) 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, 2002.
- (237) 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. DOI: 10.1021/jacs.7b07768
- (238) Ting, S. R. S.; Chen, G. J.; Stenzel, M. H. Synthesis of Glycopolymers and Their Multivalent Recognitions with Lectins. *Polymer Chemistry* **2010**, *1* (9), 1392-1412. DOI: 10.1039/c0py00141d
- (239) Boden, S.; Wagner, K. G.; Karg, M.; Hartmann, L. Presenting Precision Glycomacromolecules on Gold Nanoparticles for Increased Lectin Binding. *Polymers* **2017**, *9* (12). DOI: 10.3390/polym9120716
- (240) Neuhaus, K.; Wamhoff, E. C.; Freichel, T.; Grafmuller, A.; Rademacher, C.; Hartmann, L. Asymmetrically Branched Precision Glycooligomers Targeting Langerin. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (11), 4088-4095. DOI: 10.1021/acs.biomac.9b00906
- (241) 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. DOI: 10.1021/bm300331z
- (242) Baier, M.; Giesler, M.; Hartmann, L. Split-and-Combine Approach Towards Branched Precision Glycomacromolecules and Their Lectin Binding Behavior. *Chemistry - A European Journal* **2018**, *24* (7), 1619-1630. DOI: 10.1002/chem.201704179

- (243) Bücher, K. S.; Yan, H.; Creutzmacher, R.; Ruoff, K.; Mallagaray, A.; Grafmueller, A.; Dirks, J. S.; Kilic, T.; Weickert, S.; Rubailo, A.; Drescher, M.; Schmidt, S.; Hansman, G.; Peters, T.; Uetrecht, C.; Hartmann, L. Fucose-Functionalized Precision Glycomacromolecules Targeting Human Norovirus Capsid Protein. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (9), 3714–3724. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00829
- (244) 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. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b01657
- (245) Jacobi, F.; Camaleño de la Calle, A.; Boden, S.; Grafmüller, A.; Hartmann, L.; Schmidt, S. Multivalent Binding of Precision Glycooligomers on Soft Glycocalyx Mimicking Hydrogels. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (8), 3479-3488. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00790
- (246) Becer, C. R.; Hartmann, L. Glycopolymer Code: Synthesis of Glycopolymers and Their Applications. In *RSC Polymer Chemistry Series No. 15*, Royal Society of Chemistry: 2015.
- (247) Slavin, S.; Burns, J.; Haddleton, D. M.; Becer, C. R. Synthesis of Glycopolymers Via Click Reactions. *European Polymer Journal* **2011**, *47* (4), 435-446. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2010.09.019
- (248) Ting, S. R. S.; Stenzel, M. H. Chapter 2 Direct Synthesis of Glycopolymers Using Glycomonomers. In *Glycopolymer Code: Synthesis of Glycopolymers and Their Applications*, The Royal Society of Chemistry, 2015.
- (249) Lutz, J.-F. Sequence-Controlled Polymerizations: The Next Holy Grail in Polymer Science? *Polymer Chemistry* **2010**, *1* (1), 55-62. DOI: 10.1039/B9PY00329K
- (250) Hill, S. A.; Gerke, C.; Hartmann, L. Recent Developments in Solid-Phase Strategies Towards Synthetic, Sequence-Defined Macromolecules. *Chemistry - An Asian Journal* **2018**, *13* (23), 3611-3622. DOI: 10.1002/asia.201801171
- (251) Lutz, J.-F.; Ouchi, M.; Liu, D. R.; Sawamoto, M. Sequence-Controlled Polymers. *Science* **2013**, *341* (6146), 1238149. DOI: 10.1126/science.1238149
- (252) 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. DOI: 10.1016/S1367-5931(00)00153-8
- (253) Ambrosi, M.; Cameron, N. R.; Davis, B. G. Lectins: Tools for the Molecular Understanding of the Glycocode. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3* (9), 1593-1608. DOI: 10.1039/b414350g
- (254) Miura, Y.; Fukuda, T.; Seto, H.; Hoshino, Y. Development of Glycosaminoglycan Mimetics Using Glycopolymers. *Polymer Journal* **2016**, *48* (3), 229-237. DOI: 10.1038/pj.2015.110
- (255) Rades, N.; Licha, K.; Haag, R. Dendritic Polyglycerol Sulfate for Therapy and Diagnostics. *Polymers* **2018**, *10* (6), 595. DOI: 10.3390/polym10060595
- (256) Ahmadi, V.; Nie, C. X.; Mohammadifar, E.; Achazi, K.; Wedepohl, S.; Kerkhoff, Y.; Block, S.; Osterrieder, K.; Haag, R. One-Pot Gram-Scale Synthesis of Virucidal Heparin-Mimicking Polymers as HSV-1 Inhibitors. *Chemical Communications* **2021**, *57* (90), 11948-11951. DOI: 10.1039/d1cc04703e
- (257) Christman, K. L.; Vázquez-Dorbatt, V.; Schopf, E.; Kolodziej, C. M.; Li, R. C.; Broyer, R. M.; Chen, Y.; Maynard, H. D. Nanoscale Growth Factor Patterns by Immobilization on a Heparin-Mimicking Polymer. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (49), 16585-16591. DOI: 10.1021/ja803676r
- (258) Yoshiko, M.; Hikaru, M. Interaction Analyses of Amyloid β Peptide (1–40) with Glycosaminoglycan Model Polymers. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2010**, *83* (9), 1004-1009. DOI: 10.1246/bcsj.20100094
- (259) Ran, F.; Nie, S.; Yin, Z.; Li, J.; Su, B.; Sun, S.; Zhao, C. Synthesized Negatively Charged Macromolecules (NCMs) for the Surface Modification of Anticoagulant Membrane Biomaterials.

International Journal of Biological Macromolecules **2013**, *55*, 269-275. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.01.014

(260) Nguyen, T. H.; Kim, S. H.; Decker, C. G.; Wong, D. Y.; Loo, J. A.; Maynard, H. D. A Heparin-Mimicking Polymer Conjugate Stabilizes Basic Fibroblast Growth Factor. *Nature Chemistry* **2013**, *5* (3), 221-227. DOI: 10.1038/Nchem.1573

(261) Wang, M. M.; Lyu, Z. L.; Chen, G. J.; Wang, H. W.; Yuan, Y. Q.; Ding, K. G.; Yu, Q.; Yuan, L.; Chen, H. A New Avenue to the Synthesis of GAG-Mimicking Polymers Highly Promoting Neural Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Chemical Communications* **2015**, *51* (84), 15434-15437. DOI: 10.1039/c5cc06944k

(262) Soria-Martinez, L.; Bauer, S.; Giesler, M.; Schelhaas, S.; Materlik, J.; Janus, K.; Pierzyna, P.; Becker, M.; Snyder, N. L.; Hartmann, L.; Schelhaas, M. Prophylactic Antiviral Activity of Sulfated Glycomimetic Oligomers and Polymers. *Journal of the American Chemical Society* **2020**, *142* (11), 5252-5265. DOI: 10.1021/jacs.9b13484

(263) Hill, M. R.; Carmean, R. N.; Sumerlin, B. S. Expanding the Scope of RAFT Polymerization: Recent Advances and New Horizons. *Macromolecules* **2015**, *48* (16), 5459-5469. DOI: 10.1021/acs.macromol.5b00342

(264) Paluck, S. J.; Nguyen, T. H.; Lee, J. P.; Maynard, H. D. A Heparin-Mimicking Block Copolymer Both Stabilizes and Increases the Activity of Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2). *Biomacromolecules* **2016**, *17* (10), 3386-3395. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b01182

(265) Rawat, M.; Gama, C. I.; Matson, J. B.; Hsieh-Wilson, L. C. Neuroactive Chondroitin Sulfate Glycomimetics. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (10), 2959-2961. DOI: 10.1021/ja709993p

(266) Yang, C.; Gao, L.; Shao, M.; Cai, C.; Wang, L.; Chen, Y.; Li, J.; Fan, F.; Han, Y.; Liu, M.; Linhardt, R. J.; Yu, G. End-Functionalised Glycopolymers as Glycosaminoglycan Mimetics Inhibit HeLa Cell Proliferation. *Polymer Chemistry* **2020**, *11* (29), 4714-4722. DOI: 10.1039/D0PY00384K

(267) Oh, Y. I.; Sheng, G. J.; Chang, S. K.; Hsieh-Wilson, L. C. Tailored Glycopolymers as Anticoagulant Heparin Mimetics. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (45), 11796-11799. DOI: 10.1002/anie.201306968

(268) Sheng, G. J.; Oh, Y. I.; Chang, S. K.; Hsieh-Wilson, L. C. Tunable Heparan Sulfate Mimetics for Modulating Chemokine Activity. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (30), 10898-10901. DOI: 10.1021/ja4027727

(269) Silver, J. H.; Hart, A. P.; Williams, E. C.; Cooper, S. L.; Charef, S.; Labarre, D.; Jozefowicz, M. Anticoagulant Effects of Sulphonated Polyurethanes. *Biomaterials* **1992**, *13* (6), 339-344. DOI: 10.1016/0142-9612(92)90037-O

(270) Santerre, J. P.; ten Hove, P.; VanderKamp, N. H.; Brash, J. L. Effect of Sulfonation of Segmented Polyurethanes on the Transient Adsorption of Fibrinogen from Plasma: Possible Correlation with Anticoagulant Behavior. *Journal of Biomedical Materials Research* **1992**, *26* (1), 39-57. DOI: 10.1002/jbm.820260105

(271) Grande, D.; Baskaran, S.; Baskaran, C.; Gnanou, Y.; Chaikof, E. L. Glycosaminoglycan-Mimetic Biomaterials. 1. Nonsulfated and Sulfated Glycopolymers by Cyanoxyl-Mediated Free-Radical Polymerization. *Macromolecules* **2000**, *33* (4), 1123-1125. DOI: 10.1021/ma991579s

(272) Grande, D.; Baskaran, S.; Chaikof, E. L. Glycosaminoglycan Mimetic Biomaterials. 2. Alkene- and Acrylate-Derivatized Glycopolymers Via Cyanoxyl-Mediated Free-Radical Polymerization. *Macromolecules* **2001**, *34* (6), 1640-1646. DOI: 10.1021/ma001680t

- (273) Baskaran, S.; Grande, D.; Sun, X.-L.; Yayon, A.; Chaikof, E. L. Glycosaminoglycan-Mimetic Biomaterials. 3. Glycopolymers Prepared from Alkene-Derivatized Mono- and Disaccharide-Based Glycomonomers. *Bioconjugate Chemistry* **2002**, *13* (6), 1309-1313. DOI: 10.1021/bc0255485
- (274) Sun, X.-L.; Grande, D.; Baskaran, S.; Hanson, S. R.; Chaikof, E. L. Glycosaminoglycan Mimetic Biomaterials. 4. Synthesis of Sulfated Lactose-Based Glycopolymers That Exhibit Anticoagulant Activity. *Biomacromolecules* **2002**, *3* (5), 1065-1070. DOI: 10.1021/bm025561s
- (275) Guan, R.; Sun, X. L.; Hou, S. J.; Wu, P. Y.; Chaikof, E. L. A Glycopolymer Chaperone for Fibroblast Growth Factor-2. *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15* (1), 145-151. DOI: 10.1021/bc034138t
- (276) Rele, S. M.; Cui, W.; Wang, L.; Hou, S.; Barr-Zarse, G.; Tatton, D.; Gnanou, Y.; Esko, J. D.; Chaikof, E. L. Dendrimer-Like PEO Glycopolymers Exhibit Anti-Inflammatory Properties. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (29), 10132-10133. DOI: 10.1021/ja0511974
- (277) Akashi, M.; Sakamoto, N.; Suzuki, K.; Kishida, A. Synthesis and Anticoagulant Activity of Sulfated Glucoside-Bearing Polymer. *Bioconjugate Chemistry* **1996**, *7* (4), 393-395. DOI: 10.1021/bc960031c
- (278) El Khadali, F.; Hélarly, G.; Pavon-Djavid, G.; Migonney, V. Modulating Fibroblast Cell Proliferation with Functionalized Poly(Methyl Methacrylate) Based Copolymers: Chemical Composition and Monomer Distribution Effect. *Biomacromolecules* **2002**, *3* (1), 51-56. DOI: 10.1021/bm015563x
- (279) Bugatti, A.; Urbinati, C.; Ravelli, C.; De Clercq, E.; Liekens, S.; Rusnati, M. Heparin-Mimicking Sulfonic Acid Polymers as Multitarget Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat and gp120 Proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2007**, *51* (7), 2337-2345. DOI: 10.1128/aac.01362-06
- (280) García-Fernández, L.; Aguilar, M. R.; Fernández, M. M.; Lozano, R. M.; Giménez, G.; Román, J. S. Antimitogenic Polymer Drugs Based on AMPS: Monomer Distribution–Bioactivity Relationship of Water-Soluble Macromolecules. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (3), 626-634. DOI: 10.1021/bm901194e
- (281) Nishida, Y.; Uzawa, H.; Toba, T.; Sasaki, K.; Kondo, H.; Kobayashi, K. A Facile Synthetic Approach to L- and P-Selectin Blockers Via Copolymerization of Vinyl Monomers Constructing the Key Carbohydrate Modules of Sialyl LewisX Mimics. *Biomacromolecules* **2000**, *1* (1), 68-74. DOI: 10.1021/bm990011o
- (282) Sasaki, K.; Nishida, Y.; Uzawa, H.; Kobayashi, K. N-Acetyl-6-Sulfo-D-Glucosamine as a Promising Mimic of N-Acetyl Neuraminic Acid. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13* (17), 2821-2823. DOI: 10.1016/S0960-894X(03)00611-5
- (283) Miura, Y.; Yasuda, K.; Yamamoto, K.; Koike, M.; Nishida, Y.; Kobayashi, K. Inhibition of Alzheimer Amyloid Aggregation with Sulfated Glycopolymers. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (7), 2129-2134. DOI: 10.1021/bm0701402
- (284) Nishimura, Y.; Shudo, H.; Seto, H.; Hoshino, Y.; Miura, Y. Syntheses of Sulfated Glycopolymers and Analyses of Their BACE-1 Inhibitory Activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23* (23), 6390-6395. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.09.057
- (285) Nguyen, T. H.; Paluck, S. J.; McGahran, A. J.; Maynard, H. D. Poly(Vinyl Sulfonate) Facilitates bFGF-Induced Cell Proliferation. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (9), 2684-2692. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b00557
- (286) Schandock, F.; Riber, C. F.; Röcker, A.; Müller, J. A.; Harms, M.; Gajda, P.; Zuwala, K.; Andersen, A. H. F.; Løvschall, K. B.; Tolstrup, M.; Kreppel, F.; Münch, J.; Zelikin, A. N. Macromolecular Antiviral Agents against Zika, Ebola, SARS, and Other Pathogenic Viruses. *Advanced Healthcare Materials* **2017**, *6* (23). DOI: 10.1002/adhm.201700748
- (287) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis .1. Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85* (14), 2149-2154. DOI: 10.1021/Ja00897a025

- (288) Merrifield, R. B. Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English* **1985**, *24* (10), 799-810. DOI: 10.1002/anie.198507993
- (289) Stawikowski, M.; Fields, G. B. Introduction to Peptide Synthesis. *Current Protocols in Protein Science* **2012**, *69* (1), 18.11.11-18.11.13. DOI: 10.1002/0471140864.ps1801s69
- (290) Merrifield, B. The Role of the Support in Solid Phase Peptide Synthesis. *British Polymer Journal* **1984**, *16* (4), 173-178. DOI: 10.1002/pi.4980160404
- (291) Santini, R.; Griffith, M. C.; Qi, M. A Measure of Solvent Effects on Swelling of Resins for Solid Phase Organic Synthesis. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (49), 8951-8954. DOI: 10.1016/S0040-4039(98)02069-3
- (292) 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. DOI: 10.1021/cr980040+
- (293) Holmes, C. P.; Jones, D. G. Reagents for Combinatorial Organic-Synthesis - Development of a New O-Nitrobenzyl Photolabile Linker for Solid-Phase Synthesis. *Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60* (8), 2318-2319. DOI: 10.1021/Jo00113a004
- (294) Mikkelsen, R. J. T.; Grier, K. E.; Mortensen, K. T.; Nielsen, T. E.; Qvortrup, K. Photolabile Linkers for Solid-Phase Synthesis. *ACS Combinatorial Science* **2018**, *20* (7), 377-399. DOI: 10.1021/acscombsci.8b00028
- (295) Bochet, C. G. Photolabile Protecting Groups and Linkers. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2002**, (2), 125-142. DOI: 10.1039/B009522M
- (296) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chemical Reviews* **2009**, *109* (6), 2455-2504. DOI: 10.1021/cr800323s
- (297) Lundt, B. F.; Johansen, N. L.; Vølund, A.; Markussen, J. Removal of t-Butyl and t-Butoxycarbonyl Protecting Groups with Trifluoroacetic Acid. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1978**, *12* (5), 258-268. DOI: 10.1111/j.1399-3011.1978.tb02896.x
- (298) Orain, D.; Ellard, J.; Bradley, M. Protecting Groups in Solid-Phase Organic Synthesis. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2002**, *4* (1), 1-16. DOI: 10.1021/cc0001093
- (299) Carpino, L. A. The 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl Family of Base-Sensitive Amino-Protecting Groups. *Accounts of Chemical Research* **1987**, *20* (11), 401-407. DOI: 10.1021/ar00143a003
- (300) Eissler, S.; Kley, M.; Bächle, D.; Loidl, G.; Meier, T.; Samson, D. Substitution Determination of Fmoc-Substituted Resins at Different Wavelengths. *Journal of Peptide Science* **2017**, *23* (10), 757-762. DOI: 10.1002/psc.3021
- (301) Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. Recent Development in Peptide Coupling Reagents. *Journal of Saudi Chemical Society* **2012**, *16* (2), 97-116. DOI: 10.1016/j.jscs.2010.12.006
- (302) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61* (46), 10827-10852. DOI: 10.1016/j.tet.2005.08.031
- (303) Coste, J.; Campagne, J.-M. A Propos De L'estérification Des Acides Carboxyliques Par Le BOP Ou Le PyBOP. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36* (24), 4253-4256. DOI: 10.1016/0040-4039(95)00736-V
- (304) Letsinger, R. L.; Mahadevan, V. Oligonucleotide Synthesis on a Polymer Support. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, *87* (15), 3526-3527. DOI: 10.1021/ja01093a058
- (305) Seeberger, P. H.; Haase, W. C. Solid-Phase Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries. *Chemical Reviews* **2000**, *100* (12), 4349-4393. DOI: 10.1021/cr9903104
- (306) Hartmann, L.; Krause, E.; Antonietti, M.; Borner, H. G. Solid-Phase Supported Polymer Synthesis of Sequence-Defined, Multifunctional Poly(amidoamines). *Biomacromolecules* **2006**, *7* (4), 1239-1244. DOI: 10.1021/bm050884k

- (307) Wojcik, F.; Mosca, S.; Hartmann, L. Solid-Phase Synthesis of Asymmetrically Branched Sequence-Defined Poly/Oligo(amidoamines). *Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77* (9), 4226-4234. DOI: 10.1021/jo202561k
- (308) 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. DOI: 10.1021/ja411582t
- (309) Baier, M.; Giesler, M.; Hartmann, L. Split-and-Combine Approach Towards Branched Precision Glycomacromolecules and Their Lectin Binding Behavior. *Chemistry- A European Journal* **2018**, *24* (7), 1619-1630. DOI: 10.1002/chem.201704179
- (310) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41* (14), 2596-2599. DOI: 10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::Aid-Anie2596>3.0.Co;2-4
- (311) Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. CuI-Catalyzed Alkyne–Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2006* (1), 51-68. DOI: 10.1002/ejoc.200500483
- (312) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. Copper-Free Click Chemistry for Dynamic in Vivo Imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104* (43), 16793-16797. DOI: 10.1073/pnas.0707090104
- (313) Freichel, T.; Snyder, N.; Hartmann, L. Combining Staudinger Ligation and Copper-Catalyzed Click Reactions for the Synthesis of Heteromultivalent Glycomimetics. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2018**, *255*. DOI: 10.1021/acs.joc.7b01398
- (314) Liu, R.; Xu, Y.; Chen, M.; Weïwer, M.; Zhou, X.; Bridges, A. S.; DeAngelis, P. L.; Zhang, Q.; Linhardt, R. J.; Liu, J. Chemoenzymatic Design of Heparan Sulfate Oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285* (44), 34240-34249. DOI: 10.1074/jbc.M110.159152
- (315) Kaltner, H.; Abad-Rodríguez, J.; Corfield, A. P.; Kopitz, J.; Gabius, H.-J. The Sugar Code: Letters and Vocabulary, Writers, Editors and Readers and Biosignificance of Functional Glycan–Lectin Pairing. *Biochemical Journal* **2019**, *476* (18), 2623-2655. DOI: 10.1042/bcj20170853
- (316) Pawar, N. J.; Wang, L.; Higo, T.; Bhattacharya, C.; Kancharla, P. K.; Zhang, F.; Baryal, K.; Huo, C.-X.; Liu, J.; Linhardt, R. J.; Huang, X.; Hsieh-Wilson, L. C. Expedient Synthesis of Core Disaccharide Building Blocks from Natural Polysaccharides for Heparan Sulfate Oligosaccharide Assembly. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58* (51), 18577-18583. DOI: 10.1002/anie.201908805
- (317) Bauer, S. Monodisperse, Sequenzdefinierte N-Acetylglucosaminsulfat-Oligomere und deren Anwendung in der Biologie und Biomedizin. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2020.
- (318) Rich, D. H.; Gurwara, S. K. Removal of Protected Peptides from an Ortho-Nitrobenzyl Resin by Photolysis. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1973**, (17), 610-611. DOI: 10.1039/C39730000610
- (319) Zemplén, G.; Pacsu, E. Über die Verseifung Acetylierter Zucker und Verwandter Substanzen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1929**, *62* (6), 1613-1614. DOI: 10.1002/cber.19290620640
- (320) Bedini, E.; Laezza, A.; Parrilli, M.; Iadonisi, A. A Review of Chemical Methods for the Selective Sulfation and Desulfation of Polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *174*, 1224-1239. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.07.017

- (321) Al-Horani, R. A.; Desai, U. R. Chemical Sulfation of Small Molecules - Advances and Challenges. *Tetrahedron* **2010**, *66* (16), 2907-2918. DOI: 10.1016/j.tet.2010.02.015
- (322) Lee, J.-C.; Lu, X.-A.; Kulkarni, S. S.; Wen, Y.-S.; Hung, S.-C. Synthesis of Heparin Oligosaccharides. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (2), 476-477. DOI: 10.1021/ja038244h
- (323) Hoffmann, M.; Snyder, N. L.; Hartmann, L. Glycosaminoglycan Mimetic Precision Glycomacromolecules with Sequence-Defined Sulfation and Rigidity Patterns. *Biomacromolecules* **2022**, *23* (9), 4004-4014. DOI: 10.1021/acs.biomac.2c00829
- (324) Vázquez-Campos, S.; St. Hilaire, P. M.; Damgaard, D.; Meldal, M. GAG Mimetic Libraries: Sulphated Peptide as Heparin-Like Glycosaminoglycan Mimics in Their Interaction with FGF-1. *QSAR & Combinatorial Science* **2005**, *24* (8), 923-942. DOI: 10.1002/qsar.200420100
- (325) Qvortrup, K.; Komnatnyy, V. V.; Nielsen, T. E. A Photolabile Linker for the Solid-Phase Synthesis of Peptide Hydrazides and Heterocycles. *Organic Letters* **2014**, *16* (18), 4782-4785. DOI: 10.1021/ol502219s
- (326) Wilhelm, P.; Lewandowski, B.; Trapp, N.; Wennemers, H. A Crystal Structure of an Oligoproline PPII-helix, at Last. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (45), 15829-15832. DOI: 10.1021/ja507405j
- (327) Nagel, Y. A.; Kuemin, M.; Wennemers, H. Functionalizable Oligoprolines as Molecular Scaffolds. *Chimia (Aarau)* **2011**, *65* (4), 264-267. DOI: 10.2533/chimia.2011.264
- (328) Northfield, S. E.; Mountford, S. J.; Wielens, J.; Liu, M.; Zhang, L.; Herzog, H.; Holliday, N. D.; Scanlon, M. J.; Parker, M. W.; Chalmers, D. K.; Thompson, P. E. Propargyloxypyrrolidine Regio- and Stereoisomers for Click-Conjugation of Peptides: Synthesis and Application in Linear and Cyclic Peptides. *Australian Journal of Chemistry* **2015**, *68* (9), 1365-1372. DOI: 10.1071/CH15146
- (329) Kroll, C.; Mansi, R.; Braun, F.; Dobitz, S.; Maecke, H. R.; Wennemers, H. Hybrid Bombesin Analogues: Combining an Agonist and an Antagonist in Defined Distances for Optimized Tumor Targeting. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (45), 16793-16796. DOI: 10.1021/ja4087648
- (330) Teien, A. N.; Abildgaard, U.; Höök, M. The Anticoagulant Effect of Heparan Sulfate and Dermatan Sulfate. *Thrombosis Research* **1976**, *8* (6), 859-867. DOI: 10.1016/0049-3848(76)90014-1
- (331) Al Nahain, A.; Ignjatovic, V.; Monagle, P.; Tsanaktsidis, J.; Vamvounis, G.; Ferro, V. Anticoagulant Heparin Mimetics Via RAFT Polymerization. *Biomacromolecules* **2020**, *21* (2), 1009-1021. DOI: 10.1021/acs.biomac.9b01688
- (332) Ferro, V.; Liu, L.; Johnstone, K. D.; Wimmer, N.; Karoli, T.; Handley, P.; Rowley, J.; Dredge, K.; Li, C. P.; Hammond, E.; Davis, K.; Sarimaa, L.; Harenberg, J.; Bytheway, I. Discovery of PG545: A Highly Potent and Simultaneous Inhibitor of Angiogenesis, Tumor Growth, and Metastasis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55* (8), 3804-3813. DOI: 10.1021/jm201708h
- (333) Hammond, E.; Dredge, K. Heparanase Inhibition by Pixatimod (PG545): Basic Aspects and Future Perspectives. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2020**, *1221*, 539-565. DOI: 10.1007/978-3-030-34521-1_22
- (334) Lima, P. H. C. d.; Butera, A. P.; Cabeça, L. F.; Ribeiro-Viana, R. M. Liposome Surface Modification by Phospholipid Chemical Reactions. *Chemistry and Physics of Lipids* **2021**, *237*, 105084. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2021.105084
- (335) Jolck, R. I.; Feldborg, L. N.; Andersen, S.; Moghimi, S. M.; Andresen, T. L. Engineering Liposomes and Nanoparticles for Biological Targeting. *Biofunctionalization of Polymers and Their Applications* **2011**, *125*, 251-280. DOI: 10.1007/10_2010_92

- (336) Schnaar, R. L.; Sandhoff, R.; Tiemeyer, M.; et al. Glycosphingolipids. In *Essentials of Glycobiology*, 4th ed.; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., et al., editors Eds.; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022; Chapter 17.
- (337) D'Este, M.; Eglin, D.; Alini, M. A Systematic Analysis of DMTMM vs EDC/NHS for Ligation of Amines to Hyaluronan in Water. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *108*, 239-246. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.02.070
- (338) Baier, M.; Ruppertz, J. L.; Pfeleiderer, M. M.; Blaum, B. S.; Hartmann, L. Synthesis of Highly Controlled Carbohydrate–Polymer Based Hybrid Structures by Combining Heparin Fragments and Sialic Acid Derivatives, and Solid Phase Polymer Synthesis. *Chemical Communications* **2018**, *54* (74), 10487-10490. DOI: 10.1039/C8CC04898C
- (339) Kunishima, M.; Kawachi, C.; Morita, J.; Terao, K.; Iwasaki, F.; Tani, S. 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-Triazin-2-yl)-4-Methyl-Morpholinium Chloride: An Efficient Condensing Agent Leading to the Formation of Amides and Esters. *Tetrahedron* **1999**, *55* (46), 13159-13170. DOI: Doi 10.1016/S0040-4020(99)00809-1
- (340) Raw, S. A. An Improved Process for the Synthesis of DMTMM-Based Coupling Reagents. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50* (8), 946-948. DOI: 10.1016/j.tetlet.2008.12.047
- (341) Wamhoff, E.-C.; Schulze, J.; Bellmann, L.; Rentzsch, M.; Bachem, G.; Fuchsberger, F. F.; Rademacher, J.; Hermann, M.; Del Frari, B.; van Dalen, R.; Hartmann, D.; van Sorge, N. M.; Seitz, O.; Stoitzner, P.; Rademacher, C. A Specific, Glycomimetic Langerin Ligand for Human Langerhans Cell Targeting. *ACS Central Science* **2019**, *5* (5), 808-820. DOI: 10.1021/acscentsci.9b00093
- (342) Coderch, L.; Fonollosa, J.; Estelrich, J.; De La Maza, A.; Parra, J. L. Influence of Cholesterol on Liposome Fluidity by EPR - Relationship with Percutaneous Absorption. *Journal of Controlled Release* **2000**, *68* (1), 85-95. DOI: 10.1016/S0168-3659(00)00240-6
- (343) Rog, T.; Pasenkiewicz-Gierula, M.; Vattulainen, I.; Karttunen, M. Ordering Effects of Cholesterol and Its Analogues. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **2009**, *1788* (1), 97-121. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.08.022
- (344) Kunishima, M.; Kawachi, C.; Monta, J.; Terao, K.; Iwasaki, F.; Tani, S. 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-Triazin-2-yl)-4-Methyl-Morpholinium Chloride: An Efficient Condensing Agent Leading to the Formation of Amides and Esters. *Tetrahedron* **1999**, *55* (46), 13159-13170. DOI: 10.1016/S0040-4020(99)00809-1
- (345) Sun, Q.; Cai, S.; Peterson, B. R. Practical Synthesis of 3 β -Amino-5-Cholestene and Related 3 β -Halides Involving i-Steroid and Retro-i-Steroid Rearrangements. *Organic Letters* **2009**, *11* (3), 567-570. DOI: 10.1021/ol802343z
- (346) Delaveris, C. S.; Webster, E. R.; Banik, S. M.; Boxer, S. G.; Bertozzi, C. R. Membrane-Tethered Mucin-Like Polypeptides Sterically Inhibit Binding and Slow Fusion Kinetics of Influenza A Virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2020**, *117* (23), 12643-12650. DOI: 10.1073/pnas.1921962117
- (347) Falchi, A.; Giacomelli, G.; Porcheddu, A.; Taddei, M. 4-(4,6-Dimethoxy[1,3,5]Triazin-2-yl)-4-Methyl-Morpholinium Chloride (DMTMM): A Valuable Alternative to PyBOP for Solid Phase Peptide Synthesis. *Synlett* **2000**, (2), 275-277. DOI: 10.1055/s-2000-6490
- (348) Weber, S. Weiterführende Arbeiten zur Synthese Amphiphiler Glykomakromoleküle unter Einbindung eines AIE-Farbstoffs. Bachelor's Thesis, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2022.
- (349) Blawitzki, L.-C. First Studies Towards Conjugation of Sterol Derivatives and Precision Glycooligomers. Master's Thesis, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2019.

- (350) Purcell, S. C.; Zhang, M. H.; Honigfort, D. J.; Ng, H. J. C.; Michalak, A. L.; Godula, K. Cell Surface Photoengineering Enables Modeling of Glycocalyx Shedding Dynamics. *Chemical Science* **2022**, *13* (22), 6626-6635. DOI: 10.1039/D2SC00524G
- (351) Timoszyk, A. Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) to Study the Properties of Liposomes. *IntechOpen*. DOI: 10.5772/intechopen.68522
- (352) Baumstark, D.; Kremer, W.; Boettcher, A.; Schreier, C.; Sander, P.; Schmitz, G.; Kirchhoefer, R.; Huber, F.; Kalbitzer, H. R. ¹H NMR Spectroscopy Quantifies Visibility of Lipoproteins, Subclasses, and Lipids at Varied Temperatures and Pressures. *Journal of Lipid Research* **2019**, *60* (9), 1516-1534. DOI: 10.1194/jlr.M092643
- (353) Ponader, D.; Igde, S.; Wehle, M.; Marker, K.; Santer, M.; Bleger, D.; Hartmann, L. Photoswitchable Precision Glycooligomers and Their Lectin Binding. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2014**, *10*, 1603-1612. DOI: 10.3762/bjoc.10.166
- (354) Jiang, H.; Hu, X.-Y.; Schlesiger, S.; Li, M.; Zellermann, E.; Knauer, S. K.; Schmuck, C. Morphology-Dependent Cell Imaging by Using a Self-Assembled Diacetylene Peptide Amphiphile. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56* (46), 14526-14530. DOI: 10.1002/anie.201708168
- (355) Bar, N.; Chowdhury, P. A Brief Review on Advances in Rhodamine B Based Chromic Materials and Their Prospects. *ACS Applied Electronic Materials* **2022**. DOI: 10.1021/acsaelm.2c00107
- (356) Zhang, G.; Sun, J. Lipid in Chips: A Brief Review of Liposomes Formation by Microfluidics. *International Journal of Nanomedicine* **2021**, *16*, 7391-7416. DOI: 10.2147/ijn.S331639
- (357) Feng, H.; Shuda, M.; Chang, Y.; Moore, P. S. Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* **2008**, *319* (5866), 1096-1100. DOI: 10.1126/science.1152586
- (358) Becker, M.; Dominguez, M.; Greune, L.; Soria-Martinez, L.; Pfeleiderer, M. M.; Schowalter, R.; Buck, C. B.; Blaum, B. S.; Schmidt, M. A.; Schelhaas, M. Infectious Entry of Merkel Cell Polyomavirus. *Journal of Virology* **2019**, *93* (6), e02004-02018. DOI: 10.1128/JVI.02004-18
- (359) Leffler, H.; Carlsson, S.; Hedlund, M.; Qian, Y.; Poirier, F. Introduction to Galectins. *Glycoconjugate Journal* **2002**, *19* (7), 433-440. DOI: 10.1023/b:Glyc.0000014072.34840.04
- (360) Gray, B. P.; Li, S.; Brown, K. C. From Phage Display to Nanoparticle Delivery: Functionalizing Liposomes with Multivalent Peptides Improves Targeting to a Cancer Biomarker. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24* (1), 85-96. DOI: 10.1021/bc300498d
- (361) Patel, D.; Witt, S. N. Ethanolamine and Phosphatidylethanolamine: Partners in Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, *2017*, 4829180. DOI: 10.1155/2017/4829180
- (362) Woodle, M. C.; Lasic, D. D. Sterically Stabilized Liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1992**, *1113* (2), 171-199. DOI: 10.1016/0304-4157(92)90038-C
- (363) Gabizon, A. A. Stealth Liposomes and Tumor Targeting: One Step Further in the Quest for the Magic Bullet. *Clinical Cancer Research* **2001**, *7* (2), 223-225.
- (364) Hermanson, G. T. Chapter 11 - (Strept)Avidin–Biotin Systems. In *Bioconjugate Techniques (Third Edition)*, Hermanson, G. T. Ed.; Academic Press, 2013.
- (365) Schomann, N. Synthese von Lactose-Funktionalisierten Heteromultivalenten Glycooligomer-Lipid-Konjugaten. Master's Thesis, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2020.
- (366) Bertuzzi, S.; Gimeno, A.; Martinez-Castillo, A.; Lete, M. G.; Delgado, S.; Airoidi, C.; Rodrigues Tavares, M.; Bláhová, M.; Chytil, P.; Křen, V.; Abrescia, N. G. A.; Ardá, A.; Bojarová, P.; Jiménez-Barbero, J. Cross-Linking Effects Dictate the Preference of Galectins to Bind LacNAc-Decorated HPMACopolymers. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (11), 6000. DOI: 10.3390/ijms22116000

- (367) van Heteren, J.; Pieters, R. J. Chapter Nine - Carbohydrate-Protein Interactions: Enhancing Multivalency Effects through Statistical Rebinding. In *Carbohydrates in Drug Discovery and Development*, Tiwari, V. K. Ed.; Elsevier, 2020.
- (368) Oh, K. I.; Kim, J.; Park, C. J.; Lee, J. H. Dynamics Studies of DNA with Non-Canonical Structure Using NMR Spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21* (8). DOI: 10.3390/ijms21082673
- (369) Foster, M. P.; McElroy, C. A.; Amero, C. D. Solution NMR of Large Molecules and Assemblies. *Biochemistry* **2007**, *46* (2), 331-340. DOI: 10.1021/bi0621314
- (370) Newberry, R. W.; Raines, R. T. Secondary Forces in Protein Folding. *ACS Chemical Biology* **2019**, *14* (8), 1677-1686. DOI: 10.1021/acscchembio.9b00339
- (371) Cousin, J. M.; Cloninger, M. J. The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, *17* (9), 1566. DOI: 10.3390/ijms17091566
- (372) Wu, J.; Zhao, C.; Lin, W.; Hu, R.; Wang, Q.; Chen, H.; Li, L.; Chen, S.; Zheng, J. Binding Characteristics between Polyethylene Glycol (PEG) and Proteins in Aqueous Solution. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2* (20), 2983-2992. DOI: 10.1039/C4TB00253A
- (373) Su, J.; Zhang, T.; Wang, P.; Liu, F.; Tai, G.; Zhou, Y. The Water Network in Galectin-3 Ligand Binding Site Guides Inhibitor Design. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **2015**, *47* (3), 192-198. DOI: 10.1093/abbs/gmu132
- (374) López-Lucendo, M. F.; Solís, D.; André, S.; Hirabayashi, J.; Kasai, K.; Kaltner, H.; Gabius, H. J.; Romero, A. Growth-Regulatory Human Galectin-1: Crystallographic Characterisation of the Structural Changes Induced by Single-Site Mutations and Their Impact on the Thermodynamics of Ligand Binding. *Journal of Molecular Biology* **2004**, *343* (4), 957-970. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.08.078
- (375) Wu, L. H.; Sampson, N. S. Fucose, Mannose, and Beta-N-Acetylglucosamine Glycopolymers Initiate the Mouse Sperm Acrosome Reaction through Convergent Signaling Pathways. *ACS Chemical Biology* **2014**, *9* (2), 468-475. DOI: 10.1021/cb400550j
- (376) Roy, B.; Mukhopadhyay, B. Sulfuric Acid Immobilized on Silica: An Excellent Catalyst for Fischer Type Glycosylation. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48* (22), 3783-3787. DOI: 10.1016/j.tetlet.2007.03.165
- (377) Chao, C.-S.; Chen, M.-C.; Lin, S.-C.; Mong, K.-K. T. Versatile Acetylation of Carbohydrate Substrates with Bench-Top Sulfonic Acids and Application to One-Pot Syntheses of Peracetylated Thioglycosides. *Carbohydrate Research* **2008**, *343* (5), 957-964. DOI: 10.1016/j.carres.2008.01.014
- (378) Gimeno, A.; Delgado, S.; Valverde, P.; Bertuzzi, S.; Berbis, M. A.; Echavarren, J.; Lacetera, A.; Martin-Santamaria, S.; Surolia, A.; Canada, F. J.; Jimenez-Barbero, J.; Arda, A. Minimizing the Entropy Penalty for Ligand Binding: Lessons from the Molecular Recognition of the Histo Blood-Group Antigens by Human Galectin-3. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58* (22), 7268-7272. DOI: 10.1002/anie.201900723
- (379) Bertuzzi, S.; Gimeno, A.; Nunez-Franco, R.; Bernardo-Seisdedos, G.; Delgado, S.; Jimenez-Oses, G.; Millet, O.; Jimenez-Barbero, J.; Arda, A. Unravelling the Time Scale of Conformational Plasticity and Allostery in Glycan Recognition by Human Galectin-1. *Chemistry - A European Journal* **2020**, *26* (67), 15643-15653. DOI: 10.1002/chem.202003212
- (380) Vranken, W. F.; Boucher, W.; Stevens, T. J.; Fogh, R. H.; Pajon, A.; Llinas, M.; Ulrich, E. L.; Markley, J. L.; Ionides, J.; Laue, E. D. The CCPN Data Model for NMR Spectroscopy: Development of a Software Pipeline. *Proteins* **2005**, *59* (4), 687-696. DOI: 10.1002/prot.20449
- (381) Su, J.; Zhang, T.; Wang, P.; Liu, F.; Tai, G.; Zhou, Y. The Water Network in Galectin-3 Ligand Binding Site Guides Inhibitor Design. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **2015**, *47* (3), 192-198. DOI: 10.1093/abbs/gmu132

- (382) *Amber2020*; D.A. Case, K. B., I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, G. Giambasu, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S.A. Izmailov, K. Kasavajhala, A. Kovalenko, R. Krasny, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, V. Man, K.M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, A. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C. Simmerling, N.R. Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, L. Wilson, R.M. Wolf, X. Wu, Y. Xiong, Y. Xue, D.M. York and P.A. Kollman 2020.
- (383) Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from Ff99sb. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2015**, *11* (8), 3696-3713. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00255
- (384) Kirschner, K. N.; Yongye, A. B.; Tschampel, S. M.; Gonzalez-Outeirino, J.; Daniels, C. R.; Foley, B. L.; Woods, R. J. GLYCAM06: A Generalizable Biomolecular Force Field. Carbohydrates. *Journal of Computational Chemistry* **2008**, *29* (4), 622-655. DOI: 10.1002/jcc.20820
- (385) Dickson, C. J.; Madej, B. D.; Skjevik, A. A.; Betz, R. M.; Teigen, K.; Gould, I. R.; Walker, R. C. Lipid14: The Amber Lipid Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2014**, *10* (2), 865-879. DOI: 10.1021/ct4010307
- (386) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25* (9), 1157-1174. DOI: 10.1002/jcc.20035
- (387) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, *79* (2), 926-935. DOI: 10.1063/1.445869
- (388) Loncharich, R. J.; Brooks, B. R.; Pastor, R. W. Langevin Dynamics of Peptides: The Frictional Dependence of Isomerization Rates of N-Acetylalanyl-N'-Methylamide. *Biopolymers* **1992**, *32* (5), 523-535. DOI: 10.1002/bip.360320508
- (389) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *The Journal of Chemical Physics* **1984**, *81* (8), 3684-3690. DOI: 10.1063/1.448118
- (390) Miyamoto, S.; Kollman, P. A. Settle: An Analytical Version of the Shake and Rattle Algorithm for Rigid Water Models. *Journal of Computational Chemistry* **1992**, *13* (8), 952-962. DOI: 10.1002/jcc.540130805
- (391) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: AnN·Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98* (12), 10089-10092. DOI: 10.1063/1.464397
- (392) Roe, D. R.; Cheatham, T. E., 3rd. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2013**, *9* (7), 3084-3095. DOI: 10.1021/ct400341p
- (393) 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. DOI: 10.1039/c6py01700b
- (394) Roux, S.; Zekri, E.; Rousseau, B.; Paternostre, M.; Cintrat, J. C.; Fay, N. Elimination and Exchange of Trifluoroacetate Counter-Ion from Cationic Peptides: A Critical Evaluation of Different Approaches. *Journal of Peptide Science* **2008**, *14* (3), 354-359. DOI: 10.1002/psc.951