

# Cluster-Glycoside als Bausteine für Selbst- anordnende Monoschichten (SAMs): Glyco- SAMs als Glycocalix-Mimetika



## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Christian–Albrechts–Universität zu Kiel  
vorgelegt von

**Mike Kleinert**

aus Nienstädt

Kiel 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Th. K. Lindhorst

2. Gutachter: Prof. Dr. U. Lüning

Tag der Disputation : 01.07.2005

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

**Erklärung**

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe die Arbeit nicht an anderer Stelle eingereicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

---

Mike Kleinert



Meinen Eltern  
in Liebe gewidmet

Danke Mélanie

*Destiny is not a matter of chance, it is a matter of choice;  
it is not a thing to be waited for, it is a thing to be achieved.*

William Jennings Bryan



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Präludium</b>	<b>1</b>
1.1	Nomenklatur der verwendeten Cluster und Spacer . . . . .	6
1.2	Allgemeine Abkürzungen . . . . .	7
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
2.1	Zelloberfläche – Glycobiologie . . . . .	11
2.1.1	Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen . . . . .	12
2.1.2	Multivalenz in biologischen Systemen . . . . .	16
2.2	SAMs: Potentielle Glycocalix-Mimetika . . . . .	17
2.2.1	Schichtdicke – Ellipsometrie . . . . .	20
2.2.2	Polarität – Kontaktwinkel . . . . .	21
2.2.3	Oberflächenwechselwirkung – Plasmonenresonanz (SPR) . . . . .	23
2.2.4	Biorepulsivität . . . . .	26
2.2.4.1	Biokompatibilität von PEG-Schichten . . . . .	27
2.2.4.2	Biorepulsive Oberflächen durch Ethylenglycolfilme . . . . .	27
2.3	1,3-dipolare Cycloaddition – „Click-Chemie“ . . . . .	28
<b>3</b>	<b>Stand der Forschung</b>	<b>32</b>
3.1	Messung von Multivalenz . . . . .	35
3.1.1	96-Well-Plate – ELISA . . . . .	36
3.1.2	Wafer-Technologie . . . . .	38
3.2	Selbstangeordnete Monoschichten (SAMs) . . . . .	38
3.2.1	SAMs auf vergoldeten Oberflächen . . . . .	39
3.2.2	„SAMs“ auf Nanopartikeln . . . . .	41
3.2.3	Biorepulsivität an Oberflächen . . . . .	41
3.2.4	Funktionalisierung der Oberfläche als SAM . . . . .	42
3.2.4.1	Amid-Verknüpfung . . . . .	43
3.2.4.2	Ester-Verknüpfung . . . . .	44
3.2.4.3	Andere: Diels-Alder, Maleimid . . . . .	44
3.2.4.4	„Click on SAM“ . . . . .	44
3.2.5	Computergestützte Simulation der Oberflächen von SAMs auf Gold . . . . .	45
3.3	1,3-dipolare Cycloaddition . . . . .	45
<b>4</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>47</b>

<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
5.1	Spacer-Bausteine . . . . .	49
5.1.1	Synthese der C <sub>11</sub> -Alkyleinheit . . . . .	49
5.1.2	Synthese der C <sub>11</sub> EG <sub>6</sub> -Einheit . . . . .	50
5.1.3	Verdünnungs-Spacereinheiten . . . . .	55
5.1.4	Entschützung der Thioacetate . . . . .	57
5.2	Glyco-Kopfgruppen . . . . .	58
5.2.1	Synthese der linearen Glycoside . . . . .	58
5.2.2	Synthese der dendritischen Glycoside . . . . .	60
5.2.3	Gemischtfunktionale, dendritische Strukturen . . . . .	63
5.3	Spacer-funktionalisierte Glycomimetika: Bausteine für SAMs . . . . .	64
5.3.1	Monovalente Glycoderivate . . . . .	65
5.3.2	Trivalente Glycoderivate . . . . .	67
5.4	Click-Chemie – 1,3-dipolare Cycloaddition . . . . .	70
5.4.1	Optimierungsansatz zur 1,3-dipolaren Cycloaddition . . . . .	71
5.4.2	Spacer-funktionalisierte Glycomimetika durch Click-Chemie . . . . .	76
5.5	Fluoreszenzmarkierung . . . . .	84
5.6	SAM-Bildung . . . . .	87
5.6.1	Immobilisierung . . . . .	87
5.6.2	Click auf SAM . . . . .	90
5.7	SPR–Untersuchungen . . . . .	100
5.7.1	Allgemeines . . . . .	100
5.7.2	Ergebnisse der SPR-Untersuchungen . . . . .	107
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>126</b>
7.1	Durchführung der SPR–Experimente . . . . .	126
7.2	Vorbemerkungen und Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) . . . . .	127
7.3	Experimentelle Daten . . . . .	132
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>193</b>
	<b>Verzeichnis der Schemata</b>	<b>211</b>
	<b>Verzeichnis der Abbildungen</b>	<b>213</b>
	<b>Anhang A: Quellennachweis der Abbildungen</b>	<b>215</b>
	<b>Anhang B: Sicherheitsdaten</b>	<b>216</b>
	<b>Anhang C: Lebenslauf</b>	<b>220</b>
	<b>Anhang D: Verbindungen</b>	<b>222</b>



# 1 Präludium

## **Schlagworte**

Kohlenhydrate – Zelladhäsion – Glycocalix – Selbstanordnende Monoschichten – 1,3-dipolare Cycloaddition

## **Keywords**

Carbohydrates – Cell adhesion – Glycocalyx – Self Assembled Monolayers – 1,3-dipolar Cycloaddition

## Abstract

Searching for new methods to study carbohydrate-protein interactions between the carbohydrate layer surrounding every cell and the extracellular matrix new approaches have been made. To break new ground regarding the elucidation of the multivalent interactions between this glycocalyx and certain sugar-binding proteins, so-called lectins, a system was required, that allows to mimic such interactions. Therefore a two-dimensional array, which can be fitted with a dense layer of carbohydrates in a defined and well ordered manner, was build up. Self-assembled monolayers (SAMs) on gold-covered glass wafers are very suitable platforms for this purpose as they provide multiple options for analysis like e.g. surface plasmon resonance (SPR).

Utilising the high affinity of sulfur to gold, long aliphatic chains with sulfur-termini were synthesised. These building blocks, that finally were immobilised as SAMs on Au(111), could be equipped with biorelevant head groups. This setup was highly flexible in substitution patterns of the exposed head groups. Furthermore, a moiety that effectively blocks unspecific adhesion of biomolecules was implemented in form of oligoethylene glycol chains. The schematic construction of a SAM is shown in Figure 1.1.

The hexaethylene glycol part plays an important role in suppressing unspecific interactions between the Au-surface and the analyte. As terminal carbohydrates monosaccharides were realised as well as clustered glycosides to address the supramolecular aspects of the receptor-ligand interplay. Thus in a convergent sequence the linear L-fucosides **44** and **45** and the D-mannosides **46** and **47** were synthesised as were the trivalent fucosides **48** – **50** and the respective analogs **51** and **52** with mannose. Additionally the mannotriptide **81** was build up. Besides symmetric trivalent glycoclusters, an even more sophisticated cluster **53** was synthesised, carrying two identical mannose residues as bio-active units as well as an alkyne terminus in the trivalent dendritic backbone. As to this particular part of the molecule a marker could be attached after SAM formation and bio-testing, this is a versatile option to determine the actual density of represented bio-functions upon the monolayer. To exemplify this option eventually, the two azide-functionalised Dansyl-derivatives **87** and **88** were synthesised as fluorescence tags.

To link the sugar unit with the linear spacer segment different solutions were tested. First classical peptide coupling was established and then the 1,3-dipolar cycloaddition of alkynes and azides according to HUISGEN in the copper(I)-catalysed SHARPLESS modification was launched successfully. With this not only the complete construction of such glycocalyx mimetics gets more unitised, but even the preordered monolayer on the gold surface could be modified conveniently.

With this array of functional molecules at hand, SPR measurements were carried out to check the immobilisation of the synthesised compounds on gold wafers. Finally the specific interactions of different lectins with the prepared surfaces as well as multivalency effects were investigated.

## Kurzfassung

Bei der Suche nach neuen Methoden zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen, wie sie zwischen der komplexen Zuckerschicht auf Zellen, der sogenannten Glycocalix, und der sie umgebenden molekularen Matrix auftreten, wurden neue Wege beschritten. Multivalente Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydrat-erkennenden Proteinen, sogenannten Lektinen, und der dichten Zuckerschicht auf jeder Zelloberfläche sollten nachgeahmt und untersucht werden. Es war ein System gesucht, mit dem zweidimensional eine große Anzahl von Zuckereinheiten definiert angeordnet und präsentiert werden kann.

Hierzu wurden selbstanordnende Monoschichten (self-assembled Monolayers, SAMs) verwendet, um saccharidische Strukturen auf einer Goldoberfläche als array exponieren zu können. Die hohe Affinität von Gold zu Schwefel ausnutzend, wurden langkettige, Thiogruppen-tragende Moleküle mit diversen Termini synthetisiert, die als SAM auf Gold immobilisiert werden konnten. Dadurch lassen sich auch biorelevante Kopfgruppen exponieren, was z. B. die Option bietet, mittels Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR) in Echtzeit und berührungsfrei Wechselwirkungen der untersuchten Oberfläche mit einer Analytlösung, z. B. Lektinen, zu studieren. Die prinzipielle Architektur der SAM-bildenden Moleküle ist in Abbildung 1.1 wiedergegeben.

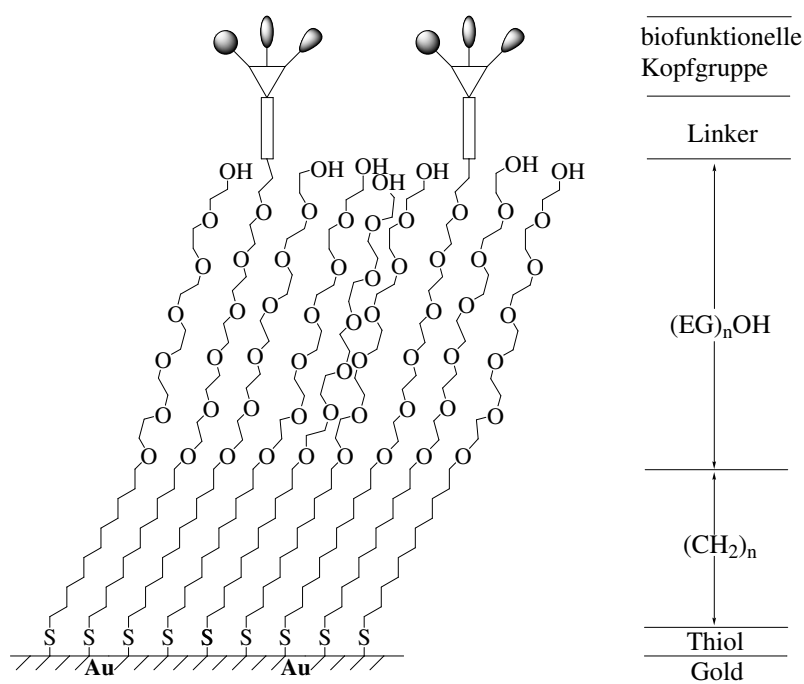


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau eines SAM

Der Oligoethylenglycol-Abschnitt des prinzipiellen Moleküls dient zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Oberfläche. Als Zuckergruppen wurden sowohl Monosaccharide als auch Clusterglycoside der manno- und fucose-Reihe vorgesehen. So konnten die Spacer-funktionalisierten, linearen L-Fucoside **44**, **45** und die D-Mannoside **46**, **47** synthetisiert werden. Zudem wurden die geclusterten Trifucoside **48** – **50**, die analogen Trimannoside **51**, **52** sowie das Mannotriosid **81** in einer konvergenten Synthese aufgebaut.

Neben der klassischen Peptidverknüpfung zwischen der Zuckereinheit und dem linearen Spacerbaustein sollte auch die 1,3-dipolare Cycloaddition nach HUISGEN in der Variante nach SHARPLESS eingesetzt werden, um ein hohes Maß an Flexibilität und möglicher Modularität für den Aufbau und die Untersuchung solcher „Glycocalix-Mimetika“ zu etablieren. Durch die Vorteile dieser Kupfer(I)-katalysierten Cycloaddition konnten auch nach erfolgter Fixierung der Thiokomponenten auf dem Goldsubstrat chemische Modifikationen erfolgreich auf dem SAM durchgeführt werden. So konnten die Oberflächeneigenschaften der Au-Wafer nach dem Baukastenprinzip variiert werden.

Zur Bestimmung der Dichte der exponierten Biofunktionalitäten in einer Monoschicht wurde zusätzlich zu den homogen-trivalenten Clusterglycosiden auch der heterogene Baustein **53** aufgebaut, der neben zwei Kohlenhydrateinheiten ein terminales Alkin trägt, welches sich zur Anbindung von beispielsweise Fluoreszenzmarkern in einer Cycloadditionsreaktion mit einem Azid eignet. Die hierzu passenden UV-aktiven Dansylmarker **87** und **88** mit Azidterminus wurden ebenfalls synthetisiert.

SPR-Untersuchungen wurden durchgeführt und es konnten die spezifischen Wechselwirkungen unterschiedlicher Lektine mit verschiedenen Kohlenhydraten sowie auch die Bindungsverstärkung durch Multivalenz nachgewiesen werden.

## Danksagungen

Der präparative Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Dezember 2001 bis Dezember 2004 am Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Anleitung von Frau Prof. Dr. TH. K. LINDHORST angefertigt.

Für die interessante Themenstellung, die freundliche Betreuung und stets hilfsbereite Unterstützung sowie die hervorragende Förderung während meiner gesamten Promotion danke ich Frau Prof. Dr. TH. K. LINDHORST sehr herzlich.

Herrn Prof. Dr. R. LÜNING danke ich für die spontane Übernahme des Korreferats.

Herrn PD Dr. A. TERFORT möchte ich für die sehr vertrauensvolle und hilfsbereite Kooperation, für viele fruchtbare Anregungen und Diskussionen sowie die kameradschaftliche Aufnahme des „Kieler Organikers“ als Gast im anorganischen Arbeitskreis danken. Auch J. MÜLLER und T. WINKLER aus diesem AK danke ich sehr.

Für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Unterstützung in allen organisatorischen Belangen danke ich C. HAUG, M. KRANNICH und R. MEINLSCHMIDT sehr.

Mein weiterer Dank gilt den hilfsbereiten und engagierten Mitarbeitern der Spektroskopie, von denen ich besonders Frau M. HÖFTMANN, Herrn D. MEYER, Frau G. KOHLMAYER-YILMAZ sowie Herrn Dr. C. WOLFF nennen möchte.

Unserer hervorragenden Laborantin E. KLIMA-BARTCZAK danke ich ganz besonders für ihre stets gute Laune und ihr Interesse an den chemischen wie auch an den nicht-chemischen Dingen des Lebens. Ihre Unterstützung hat nicht nur diese Arbeit bereichert, sondern auch vieles erleichtert und das Leben im Arbeitskreis sehr angenehm gestaltet.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des AKLi, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben, danke ich ganz herzlich. Mein besonderer Dank gilt denjenigen, die mir auch außerhalb des Laboratoriums das Leben in Kiel, Dänemark, Regensburg oder Grenoble durch ihre Freundschaft – jeder auf seine Weise – bereichert haben. Hier möchte ich vor allem nennen K. ELSNER, A. FUCHS und C. HEIDECHE dem auch für die geduldige und kompetente Unterstützung beim Umgang mit  $\LaTeX$  größter Dank zukommt. M. WIEGAND, K. HANTELMANN und der SCHNUCKE danke ich für das Korrekturlesen. Für die unvergessliche Zeit im LüLiLab möchte ich sehr herzlich der Traum-Laborpartnerin S. LÜTHJE danken, die viele Stimmungen und laute Musik ertragen hat und immer ein Lächeln, Geduld und Hilfsbereitschaft zu verschenken hatte. Nicht vergessen möchte ich die Schwerpunktpraktikantin N. SCHWALB, die sehr engagiert und interessiert mitgearbeitet hat.

## 1.1 Nomenklatur der verwendeten Cluster und Spacer

In der vorliegenden Arbeit wurden z. T. abweichend von den Empfehlungen der IUPAC einige Substanzbezeichnungen durch praktische Abkürzungen ersetzt. Insbesondere die Benennung der vorgestellten Dendrimere und Glycodendrimere nach IUPAC ist sehr aufwendig. Hingewiesen sei hier ausdrücklich auf ein von NEWKOME *et al.* vorgeschlagenes Nomenklatursystem, das für alle dendritisch aufgebauten Moleküle geeignet ist.<sup>[1]</sup>

An den Anfang des Namens wird dabei die Anzahl der dendritischen Endgruppen, gefolgt vom Wort „Cascade“, gestellt. Die folgenden Namensteile werden durch Doppelpunkte abgegrenzt und bezeichnen die Struktur eines Astes des Dendrimers, beginnend mit der Struktur am fokalen Punkt bis hin zu den terminalen Endgruppen. Die Multiplizität der Verzweigung wird für jeden Verzweigungspunkt in eckigen Klammern dem Substanznamen nachgestellt. Die gemischt funktionalisierten Glycocluster wurden in Anlehnung an diese Cascaden-Nomenklatur bezeichnet.

Dieses System wird ausschließlich im experimentellen Abschnitt dieser Arbeit verwendet. Im Diskussions- und Ergebnisteil wurde eine weitere Vereinfachung der Nomenklatur vorgenommen, die wegen der Ähnlichkeit der vorgestellten Verbindungen eingängiger und zugleich eindeutig ist (siehe beispielhaft Abbildung 1.2). Es finden hierbei folgende Abkürzungen für Spacersequenzen Verwendung:

C<sub>2</sub>: Ethyl-, C<sub>5</sub>: Pentyl-, C<sub>11</sub>: Undecyl-, suc: Bernsteinsäure, EG<sub>6</sub>: Hexaethylenglycol

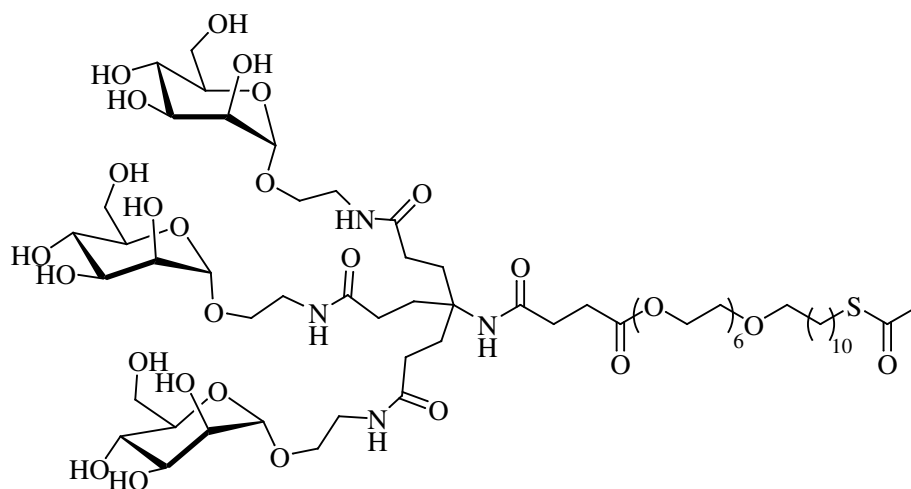


Abbildung 1.2: Nach Newkome-Nomenklatur: 3-Cascade:*N*-(1,4-dioxobutyl-hexaethylenglycol-11-acetylthio-undecyl)-aminomethan[3-1,1,1]:ethyliden-2-amidoethyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid; kurz: (ManC<sub>2</sub>)<sub>3</sub>sucEG<sub>6</sub>C<sub>11</sub>SAc

## 1.2 Allgemeine Abkürzungen

AAL	<i>Aleuria aurantia</i> -Lektin
abs.	absolut
Ac	Acetyl
<i>aq</i>	wässrige Lösung
Ar	Aryl
AFM	Atomic Force Microscopy
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Bovine Serum Albumin
Bz	Benzoyl
c	Konzentration
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CD	Compact Disc
CI	Chemische Ionisation (Massenspektrometrie)
Con A	Concanavalin A
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
$\Delta$	Erwärmen
DC	Dünnschichtchromatogramm
dem.	demineralisiert
DFT	Density Functional Theory
DMP	Dess-Martin Periodinan
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EG	Ethylenglycol
EI	Elektronische Ionisation (Massenspektrometrie)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eq.	Äquivalent (equivalent)
ESI	Electron Spray Ionisation
Et	Ethyl
FAC	Frontal Affinity Chromatography
Fuc	Fucose
FT	Fourier-Transformation
ges.	gesättigt
GPC	Gel Permeation Chromatography
GNL	<i>Galanthus nivalis</i> -Lektin

---

HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure Mononatriumsalz
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HTS	High Throughput Screening
IR	Infrarot
IUPAC	International Union for Pure and Applied Chemistry
kat	katalytisch
KW	Kontaktwinkel
M	molar
M	Molmasse
Man	Mannose
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MBP	Mannose Binding Protein
MD	Molecular Dynamics
Me	Methyl
MPL	<i>Maclura pomifera</i> -Lektin
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PBC	Periodic Boundary Conditions
PEG	Polyethylenglycol
PG	Schutzgruppe
Ph	Phenyl
PP	Polypropylen
Pr	Propyl
PS	Polystyrol
PTC	Phase Transfer Catalysis
quant.	quantitativ
R	Rest
RAFT	Regioselectively Adressable Functionalized Templates
RAIRS	Reflection Absorption Infrared Spectroscopy
REM	Raster Electron Microscopy
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Reversed Phase



---

RT	Raumtemperatur
$R_t$	Retentionszeit
$\uparrow\downarrow$	Reaktion unter Rückfluß
SAM	Self Assembled Monolayer
Ser	Serin
SFM	Scanning Force Microscopy
SPR	Surface Plasmon Resonance
STM	Surface Tunneling Microscopy
Thr	Threonin
ToF	Time of Flight
Tr	Trityl
UV	Ultraviolett

Abkürzungen zu verwendeten Chemikalien und Reagenzien finden sich im Anhang B auf Seite 216.

## 2 Einleitung

Kohlenhydrate stellen neben Lipiden, Proteinen und Nucleinsäuren eine sehr bedeutende Substanzklasse innerhalb der Biomoleküle dar. Im Milliarden-Tonnen Maßstab jährlich durch Photosynthese von Pflanzen und Mikroorganismen hergestellt, bilden sie makroskopisch mit Cellulose und Chitin wichtiges, strukturbildendes Baumaterial in Pflanzen und Tieren.<sup>[2]</sup> Mikroskopisch betrachtet sind sie essentielle Grundbausteine von Zellen und Geweben und spielen in Form von Stärke und Glycogen eine herausragende Rolle als Energiespeicher in allen Lebewesen. Zudem finden sich die Kohlenhydrate Ribose und Desoxyribose als Teile des Grundgerüsts von RNA und DNA, den anerkannten Hauptinformationsträgern der Natur.<sup>[3,4]</sup>

Kohlenhydrate tragen bereits in ihrer monomeren Form eine Vielzahl von Funktionalitäten. Außerdem sind sie mit mehreren Stereozentren ausgestattet. Diese Charakteristika erhöhen die mögliche Vielfalt an verschiedenen Strukturen und Stereoisomeren erheblich gegenüber Nucleosiden, die DNA und RNA aufbauen und Aminosäuren, den Bausteinen von Peptiden und Proteinen.

Ein Monosaccharid besteht aus mindestens einer Carbonyl-, sowie zwei oder mehr Hydroxylgruppen, die allerdings noch durch Amid-, Amin-, Phosphat-, Sulfat- oder Thiolfunktionen substituiert oder funktionalisiert sein können.<sup>[5]</sup> Die anomeren Zentren können mit Alkoholen oder Aminen reagieren und bilden dann *O*-glycosidische bzw. *N*-glycosidische Bindungen aus. Im Falle der Glycosylierung der Proteinseitenketten von Ser, Thr (*O*-glycosidisch) oder Asn (*N*-glycosidisch) spricht man von Glycoproteinen. Linear oder verzweigt zu Oligo- bzw. Polysacchariden verknüpft, stellen die Kohlenhydrate eine bislang kaum überschaubare, hochdiverse Gruppe an Biomolekülen dar.

In komplexen Glycostrukturen vorkommend, werden Kohlenhydrate beispielsweise als Teil aller Zellwände gefunden, wobei deren ganz konkrete Funktion z. T. bis heute nicht vollständig geklärt werden konnte. So sind in Glycolipiden und Glycopeptiden die Saccharide wesentliche Strukturelemente für eine Reihe von biologischen und biochemischen Prozessen wie der Zell-Kommunikation oder Signaltransduktion.

Die Kohlenhydrat-abhängigen Erkennungsphänomene auf zellulärer Ebene bilden die Basis eines ganzen Forschungsfelds, der Glycobiologie.<sup>[6,7]</sup>

## 2.1 Zelloberfläche – Glycobiologie

Die extrazelluläre Oberfläche aller eukariontischen Zellen ist von der *Glycocalix* umgeben, einer dichten, meist mehr als 100 nm dicken Schicht, die maßgeblich aus komplexen Kohlenhydraten aufgebaut ist (Abbildung 2.1).

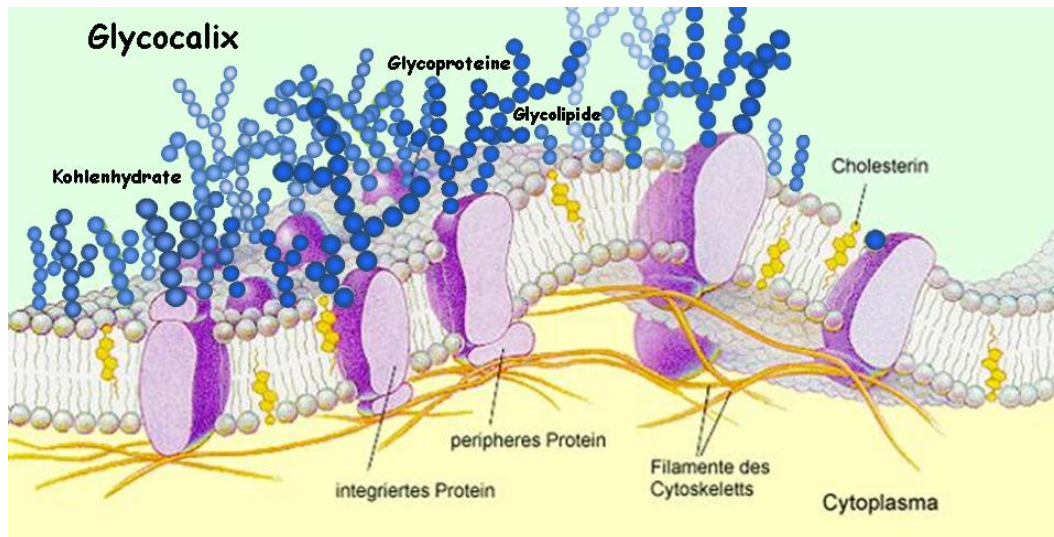


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau einer Zellwand.

Die Glycocalix ist wesentliches Forschungsobjekt der Glycobiologie,<sup>[8]</sup> die sich mit folgenden Kernfragen befaßt:

- Wie beeinflussen oder bestimmen Saccharide die Eigenschaften der Proteine, an die sie kovalent gebunden sind?
- Welche Rolle spielen die Kohlenhydrate bei Erkennungsprozessen zwischen Zellen und Proteinen und welche sind die relevanten Strukturelemente?
- Wie wird die Bildung eines Kohlenhydrat-Rezeptor-Komplexes in einen biologischen Effekt übersetzt?

Die Natur benutzt die Glycosylierung von Proteinen beispielsweise, um Polarität, Löslichkeit und Stabilität zu modifizieren. Der Grad der Glycosylierung reicht dabei von wenigen Prozent im Kollagen bis zum fast vollständig aus Zuckern zusammengesetzten Glycogen. Typische Oligosaccharideinheiten in Glycokonjugaten sind aus bis zu 20 Monomeren aufgebaut. Diese Zucker sind offensichtlich auch im Zusammenhang mit molekularer Information von Bedeutung.

Ein eindrückliches Beispiel für die Wichtigkeit der zellspezifischen Glycosylierung ist die Differenzierung der Blutgruppen, die auf die Existenz von verschiedenen Blutgruppenteterminanten auf der Oberfläche von Erythrozyten zurückzuführen ist (Abbildung 2.2). Ein weiteres Beispiel von zentralem Interesse steht im Kontext der molekularen Prozesse, die zu Entzündungsvorgängen im Körper führen, an denen ebenfalls Saccharide beteiligt sind.<sup>[9]</sup>

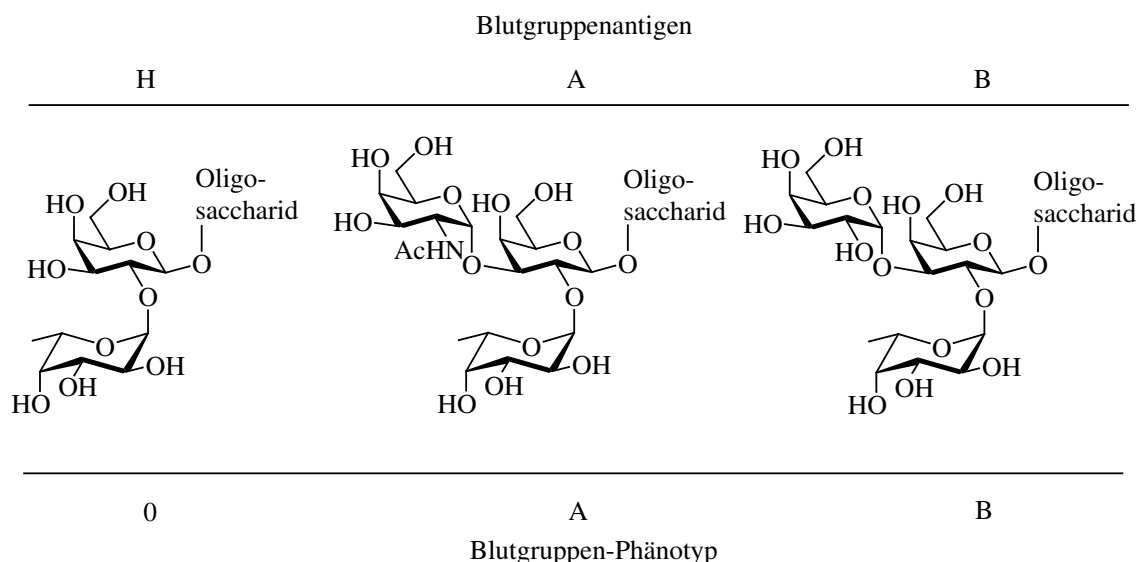


Abbildung 2.2: ABO-Blutgruppensystem und dazugehörige Kohlenhydrat-Determinanten auf Erythrozyten.

### 2.1.1 Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen

Lektine (von lat. *legere* = auflesen, sammeln) sind eine relativ heterogene Gruppe von Proteinen und Glycoproteinen, die Kohlenhydratstrukturen erkennen und binden können, ohne daß es sich dabei um Enzyme oder Antikörper handelt.<sup>[10–12]</sup> Sie sind ubiquitär; man findet sie im Pflanzen- und Tierreich wie auch bei Mikroorganismen. Bei den Pflanzen ist die genaue Funktion der Lektine noch unklar. Rizinus-samen beispielsweise enthalten Lektine in derart hohen Konzentrationen, daß jene für die meisten Lebewesen toxisch sind. Bakterielle Lektine können, wie im Falle von *Escherichia coli*, die Haftung an Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes vermitteln. Bei Säugetieren scheint die wichtigste Funktion der Lektine in der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten zu bestehen. Untersuchungen hinsichtlich des Mechanismus' der molekularen Erkennung und der Wechselwirkung zwischen Kohlenhydrat-Liganden und deren Proteinrezeptoren wie Lektinen oder Selektinen<sup>[13]</sup> sind Gegenstand aktueller Forschung.<sup>[14, 15]</sup>

Lektine binden reversibel an Zuckereinheiten auf der Oberfläche einer Zelle und verursachen auf diese Weise eine Veränderung der Physiologie der Zellmembran. Dies führt letztlich zu verschiedenen biochemischen Reaktionen von der Agglutination über die Entzündung und Immunabwehr bis zur Mitose, um nur einige zu nennen.

Die Lektine stellen damit neben den kohlenhydratspezifischen Enzymen und den Antikörpern eine dritte Klasse von funktionellen Zucker-erkennenden Molekülen im Körper dar. Sie wurden erstmals bereits 1888 von STILLMARK<sup>[16]</sup> nach Untersuchungen der Hämagglutinationswirkung von Extrakten aus *Ricinus communis* beschrieben.<sup>[5,17,18]</sup> Weitere herausragende Arbeiten auf diesem Gebiet wurden von P. EHR- LICH und J. B. SUMNER<sup>[19]</sup> durchgeführt.<sup>[20,21]</sup> Letzterer hat bereits 1919 bei Untersuchungen an der Schwertbohne (*Canavalia ensiformis*) das Pflanzenlektin Con- canavalin A<sup>[22]</sup> isoliert, dessen Kristallstruktur, die erst 1972 aufgeklärt wurde, in Abbildung 2.3 gezeigt ist.<sup>[23,24]</sup>

Viele Lektine besitzen mehr als eine Zucker-Bindungstasche, die sogenannte *Car-bohydrate Recognition Domain* (CRD). Diese Regionen wechselwirken mehr oder weniger selektiv mit Saccharidliganden. Überbrücken die di- oder oligovalenten Lektine im Bindungsprozeß mehrere Zuckereinheiten, so bewirken diese Kreuzkupplungen ein Ausflocken, das sog. Agglutinieren. Dieses Phänomen ist als Hämagglutination im Fall des Verklumpens der hochgradig glycosylierten Erythrozyten bekannt.

Den strukturellen Voraussetzungen einer Bindung im Hinblick auf Bindungswinkel und Distanzen zwischen Liganden und Rezeptoren widmet sich ausführlich ein Review von LINDHORST *et al.*<sup>[25]</sup>

Anhand ihrer Aminosäuresequenzen und biochemischen Eigenschaften lassen sich die Lektine klassifizieren. Es sind fünf Gruppen bekannt, die sich entsprechend der höchsten Substrataffinität gliedern lassen: 1) Man-spezifisch, 2) Gal- und GalNAc-spezifisch, 3) GlcNAc-spezifisch, 4) L-Fuc-spezifisch und 5) *N*-Acetylneuraminsäure-spezifisch. Man unterscheidet bei den tierischen Lektinen weiterhin in S-Typ- (Galektin), P-Typ- und C-Typ-Lektine, wobei der C-Typ die größte Klasse ausmacht.

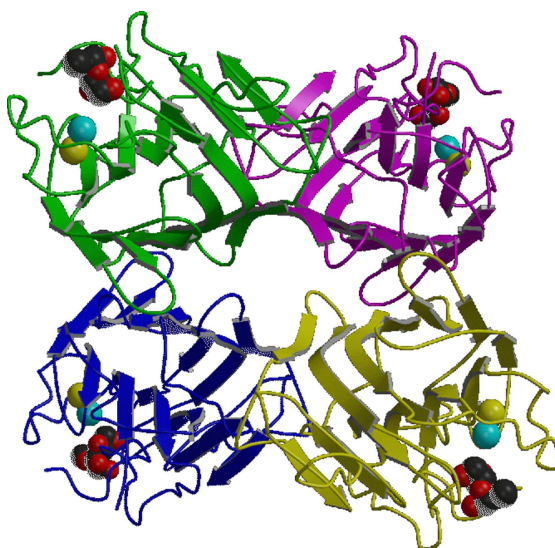


Abbildung 2.3: Con A-Tetramer.  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  (blau/gelb); gebundenes Trimannosid (rot/ schwarz)

C-Typ-Lektine sind calciumabhängig; bei ihnen bildet ein Calciumion in der CRD die Brücke zwischen Protein und Kohlenhydrat. Dies ist am Beispiel des *Mannose Binding Protein-A* (MBP-A) in Abbildung 2.4 gezeigt.

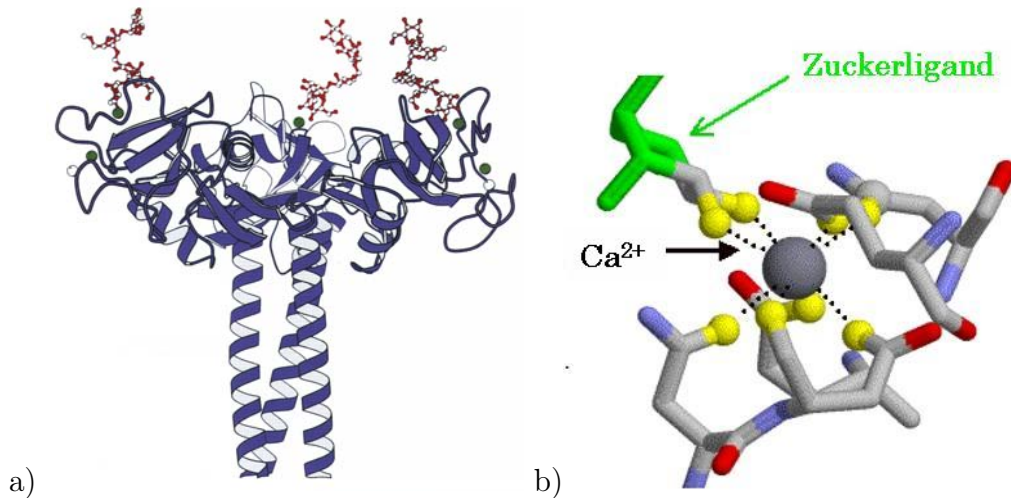


Abbildung 2.4: a) MBP-A mit Calciumionen (grün) und Zuckereinheiten (rot)<sup>[26]</sup>  
 b) CRD mit 3,4-Hydroxylgruppen zu Mannose sowie beteiligtem Ca<sup>2+</sup>

Die Klasse der C-Typ-Lektine ist abermals unterteilt in a) Endocytotische Lektine, b) Collektine und c) Selektine.<sup>[27]</sup> In Tabelle 2.1 sind einige wichtige tierische Lektine aufgeführt.

Tabelle 2.1: Klassifizierung der wichtigsten tierischen Lektine<sup>[5]</sup>

Typ	Ligand	Eigenschaften	Vermutete biologische Funktion
P-Typ	Mannose-6-Phosphat	Ca <sup>2+</sup> -abhängig	regelt Enzymverkehr zum prälysosomalen Compartment
S-Typ (Galaktin)	Galaktoside	Thiol-abhängig	beteiligt bei der Induktion der Apoptose
I-Typ Sialoadhesine	sialylierte Liganden	ähneln Immunglobulinen	Interaktion mit B-Zellen und/oder T-Zellen
C-Typ	variabel	Ca <sup>2+</sup> -abhängig	Gewebezielsuche,
↔ L-Selektin	sialyliert & sulfatiert	Ca <sup>2+</sup> -abhängig	Wechselwirkung von
↔ E-Selektin	sialyliert & sulfatiert	Ca <sup>2+</sup> -abhängig	Blutplättchen mit
↔ P-Selektin	sialyliert & sulfatiert	Ca <sup>2+</sup> -abhängig	Monocyten

Die Selektine sind eine wichtige, ebenfalls an Zell-Zell-Kommunikationsprozessen beteiligte Untergruppe der C-Typ Lektine, bei denen man nach dem Ort ihres Vorkommens Unterklassen definiert: Die L-, E- und P-Typen der Selektine binden spezifisch an Kohlenhydrate der Leukozyten,<sup>[28]</sup> des Endothels<sup>[29]</sup> oder der Blutplättchen.<sup>[29,30]</sup>

Durch Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen werden Selektin-vermittelt Leukozyten aus der Blutbahn „gefischt“. Bei diesem Prozeß verlangsamen sich die Leukozyten aus dem Blutstrom (*Rolling*) und durchdringen schließlich am Entzündungsherd die Gefäßwand (Abbildung 2.5).<sup>[31]</sup>

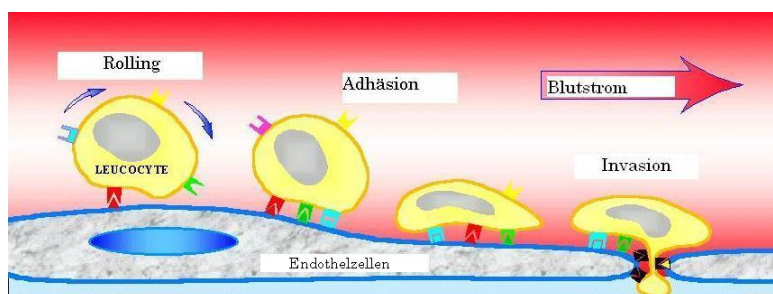


Abbildung 2.5: *Rolling* eines Leukozyten an der Gefäßwand

Die Erkennung von Kohlenhydraten spielt eine zentrale Rolle beim Entstehen und Fortschreiten einer Reihe von Krankheiten. Die Funktionen der bakteriellen Lektine von *E. coli* und *Salmonella typhimurium*, die eine Bindung der Bakterien an körpereigene Zellen bewirken (Epithelzellen und Leukozyten) und damit eine Infektion hervorrufen, verdeutlichen gut die Bedeutung von Glycoproteinen im Zusammenhang mit der Erforschung von Krankheiten.

Pathologisch relevant sind auch die Lektine von *Helicobacter pylori*, die die saccharidischen Blutgruppenderminanten auf Magenschleimhautzellen erkennen und letztlich zu Magengeschwüren führen können. Schließlich kann hier ebenfalls das Hämagglutinin-Glycoprotein des Influenza-Virus genannt werden.<sup>[32,33]</sup> Einen hervorragenden und aktuellen Übersichtsartikel zu Lektinen und deren Verwendung als Werkzeuge der Glycobiologie geben DAVIS *et al.*<sup>[34]</sup>

Bei vielen globalgesundheitlichen Problemen wie Antibiotikaresistenz,<sup>[35]</sup> Autoimmunkrankheiten, AIDS<sup>[36,37]</sup> und auch Krebs<sup>[38,39]</sup> sind ebenfalls Glycokonjugate beteiligt.<sup>[40]</sup>

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß trotz der herausragenden Bedeutung, die Kohlenhydraten in der Biologie zukommt, ein exaktes und umfassendes Verständnis der Ursache-Wirkungsprinzipien komplexer Zucker im Gegensatz zum Zusammenspiel von DNA, RNA und Proteinen noch nicht gefunden werden konnte.

Ein wesentlicher Grund für die Schwierigkeiten, das molekulare und mechanistisch-biologische Geschehen um Saccharide zu verstehen, liegt sicher in der hohen strukturellen Vielfalt von komplexen Kohlenhydraten. Proteine und Nukleinsäuren, die linear aus einer übersichtlichen Zahl von Monomeren aufgebaut sind, gehen definierte und starke molekulare Wechselwirkungen ein. Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkungen dagegen sind vergleichsweise sehr schwach mit Dissoziationskonstanten im millimolaren oder hohen mikromolaren Bereich.<sup>[41]</sup> Die Natur geht mit diesem Phänomen elegant um durch die Ausbildung von multivalenten Interaktionen zwischen zwei oder mehr Zuckereinheiten und den entsprechenden multimeren Proteinen.<sup>[42–44]</sup> Wegen der zentralen Bedeutung des Konzepts der *Multivalenz* für die Biologie von Glycokonjugaten soll darauf im nächsten Kapitel näher eingegangen werden.

### 2.1.2 Multivalenz in biologischen Systemen

Wenn die Natur die molekulare Erkennung zwischen Rezeptor und Ligand optimiert, bedient sie sich dabei häufig multivalenter Wechselwirkungen.<sup>[45]</sup> Prinzipiell bedeutet dies die vielfache Interaktion zwischen mehreren Ligand-erkennenden Einheiten auf einem Rezeptor und den mehreren Liganden oder einem Ligand-Array. Dabei können die Stärke und Spezifität einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung wesentlich erhöht werden. Auch im Fall von Wirt-Gast-Komplexen ist bekannt, daß es zu einer erheblichen Bindungsverstärkung kommt, wenn Gastmoleküle gleichzeitig von mehreren funktionellen Stellen eines Wirtmoleküls erkannt und gebunden werden. Die Ursache dieses Phänomens wird u. a. in der Tatsache vermutet, daß es durch die induzierte räumliche Nähe der Bindungspartner nach einem Erstbindungsprozeß für einen Zweit- oder weiteren Folgebindungsprozeß zu einem verminderten Entropieverlust kommt.<sup>[46–48]</sup>

Es treten bevorzugt viele einzelne Interaktionen mit vergleichsweise schwacher Affinität auf, wobei die daraus resultierende Avidität<sup>[49]</sup> größer als die Summe der einzelnen Wechselwirkungen (Affinitäten) ist. Man spricht vom *Clustereffekt*, wenn die lineare Erhöhung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen zu einer exponentiellen Erhöhung der Bindungsstärke führt.<sup>[42, 50, 51]</sup>

Die Vorteile des Multivalenzprinzips sind zahlreich. Zum einen besteht die Möglichkeit, konformellen Kontakt zwischen großflächigen biologischen Oberflächen zu bilden. Dies resultiert in einer gesteigerten Robustheit gegenüber Scherkräften, die bei Zelladhäsionsprozessen häufig auftreten. Des weiteren können durch Multivalenz auch nur eines Wechselwirkungstyps graduelle biochemische Antworten erzeugt werden. Schließlich ergibt sich die Möglichkeit, die Spezifität und biologischen Effektivität einer molekularen Interaktion zu steigern. So wirken bei der Rekrutierung von



Leukozyten die unterschiedlichen Lektine P-, L- und E-Selektin konzertiert.<sup>[52]</sup> Multivalenz von Wechselwirkungen führt so zu einem biologisch effektiven Signal durch supramolekulare Effekte.<sup>[53]</sup>

So wie Kohlenhydrat-Erkennungsprozesse bei der Entstehung und beim Fortschreiten von Krankheiten beteiligt sind, so können sie entsprechend auch bei der Bekämpfung von Krankheiten helfen. Das Nachahmen der multivalenten Wechselwirkungen zwischen natürlichen Proteinen oder RNA und Sacchariden mittels künstlich verabreichter Kohlenhydrate ist ein potentiell Ziel bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe.<sup>[54, 55]</sup>

Eine geeignete Strategie zur Entwicklung neuartiger Therapeutika umfaßt folgende Punkte:

- Die Synthese von ideal zur CRD eines Rezeptors passenden Mimetika von Kohlenhydraten, die an entscheidenden Erkennungsprozessen beteiligt sind, aber optimierte Eigenschaften bezüglich Spezifität, Affinität oder Stabilität besitzen.
- Die Konstruktion einer passenden Plattform, an der multivalente Wechselwirkungen von relevanten Kohlenhydrat-Lektin-Paaren studiert werden können. Eine solche Plattform sollte
  - die Zelloberfläche, nominell die Glycocalix, geeignet nachahmen können;
  - idealerweise modular eingerichtet sein, so daß verschiedene Einheiten „baukastengleich“ nacheinander aufgebracht oder sogar wieder entfernt werden können;
  - Rezeptoren in einer einstellbaren und bestimmbaren Dichte exponieren;
  - biokompatible Bedingungen zulassen;
  - eine geeignete Analytik der gefundenen Wechselwirkungen erlauben.

Den Überlegungen zur Entwicklung einer solchen Plattform widmet sich der nächste Abschnitt.

## 2.2 SAMs: Potentielle Glycocalix-Mimetika

Durch weltweite Forschung im Bereich der Glycowissenschaften wurden zahllose Kohlenhydratliganden, Glycomimetika und multivalente Neoglycokonjugate synthetisiert, die von einer natürlichen Vorbildstruktur abgeleitet sind. Mit ihnen wurden verschiedene Studien über biologische Bindungsprozesse, Affinitäten und Selektivitäten

durchgeführt.<sup>[56,57]</sup> Dennoch ist es kaum gelungen, die supramolekulare Komponente der Erkennungsphänomene in einer der Glycocalix entsprechenden Größenordnung anzusprechen.

Heutzutage verwenden die meisten Studien über Zell-Adhäsionsprozesse Oberflächen, die mit einer Schicht des zu untersuchenden Biomoleküls, etwa einem Protein, überzogen sind.<sup>[58]</sup> Es werden oft Glas- oder Polystyrolträger benutzt, weil diese sehr leicht mit den gewünschten Substraten beschichtet werden können. Dies geschieht häufig aus wässrigen Medien heraus (siehe Abschnitt 3.1.1). Allerdings sind mit der Verwendung solcher Oberflächen eine Reihe von Nachteilen verbunden.

- Proteine adsorbieren ausgesprochen schnell an nahezu jede Oberfläche. Das Gleichgewicht dieser Physisorption liegt weit auf der Seite der Adsorption, weil die Desorption wesentlich langsamer verläuft.
- Bei diesem Prozeß kann es leicht zu einer Konformationsänderung kommen. Diese Denaturierung hängt von vielen Parametern wie pH, Ionenstärke, Temperatur oder Proteinkonzentration in Lösung ab und ist schwer vorauszusagen, was die Aussage eines Tests prinzipiell einschränkt.<sup>[59]</sup>
- Die molekulare Rezeptoreinheit kann durch die unkontrollierte Adhäsion direkt auf der Substratoberfläche liegen und steht nicht für die zu untersuchende Bindung eines Liganden zur Verfügung.
- Typischerweise ist die Proteinschicht heterogen, und die tatsächliche Verteilung und Dichte auf der Oberfläche sind quasi nicht zerstörungsfrei zu messen.

Selbstorganisierte Monoschichten ('self assembled monolayers', SAMs) ermöglichen die Präsentation dicht gepackter Strukturelemente an einer Oberfläche.<sup>[60,61]</sup> Solche Oberflächen sind hochgradig geordnet und homogen, und die Dichte der exponierten Rezeptoren oder Liganden (z. B. Saccharide) läßt sich bestimmen. Nichtspezifische Adsorption von Proteinen kann wirkungsvoll durch Einbettung von Oligoethylenglycolgruppen unterdrückt werden, so daß die exponierte Struktureinheit nicht durch unerwünschte Adhäsionsprozesse verdeckt und damit die Untersuchung einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung unmöglich wird (siehe Abschnitt 2.2.4).

Für die Bildung von SAMs sind verschiedene Systeme untersucht worden,<sup>[62]</sup> darunter Silane auf Silizium-Oberflächen, Carbonsäuren auf Metalloxiden und Organoschwefelverbindungen auf Gold.<sup>[63-65]</sup> Allen gemeinsam ist ein modularer Aufbau (Abbildung 2.6):

- Eine reaktive Ankerfunktionalität, die eine kovalente oder auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhende Anbindung an die künstliche Oberfläche bewirkt;

- eine „Platzhaltereinheit“, die hochgeordnete Selbstanordnung induziert und einen Abschnitt zur Einführung von Biorepulsivität enthalten kann;
- eine biorelevante Kopfgruppe, an der schließlich die Interaktionen mit diversen Biomolekülen getestet werden können.

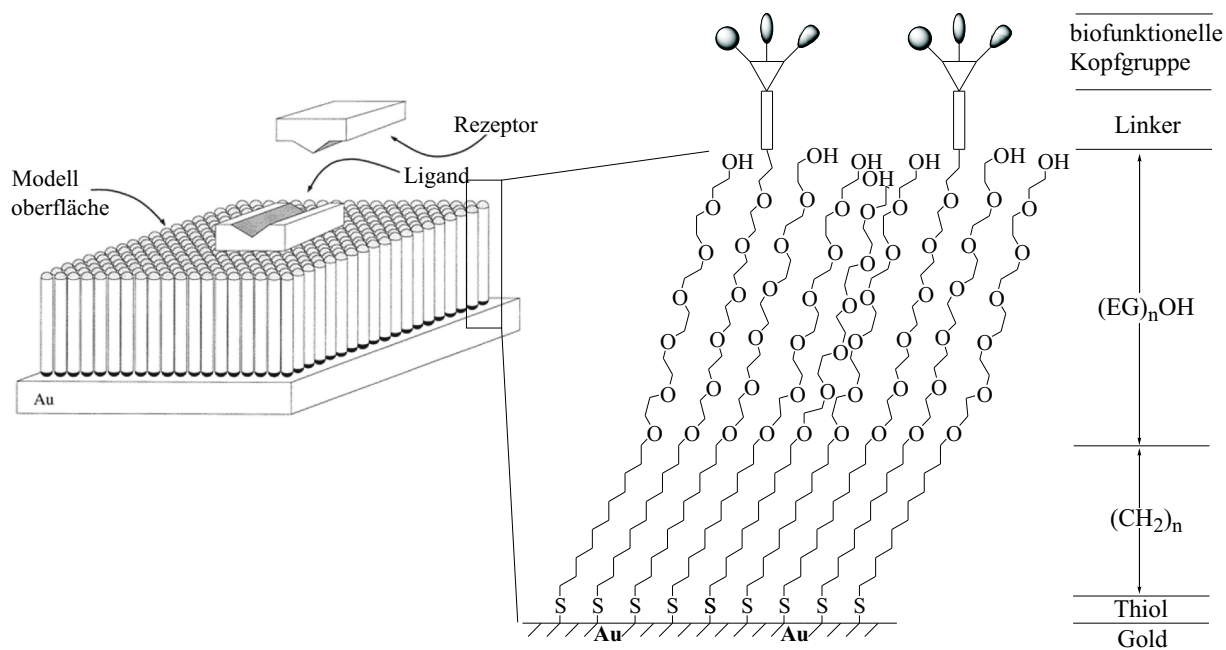


Abbildung 2.6: Schematischer und molekularer Aufbau eines SAM

Bei der SAM-Bildung auf Gold nutzt man die sehr hohe Affinität von Schwefel zu Gold aus. SAMs auf Gold sind aufgrund der starken S-Au-Bindung sehr stabil und besitzen außerdem gegenüber den genannten anderen Varianten weitere Vorteile. So bieten sie die höchste strukturelle Ordnung durch die dichte Packung von Alkylthiolen auf der Oberfläche, die quasi-kristalline Monoschichten ausbilden und daher sogar mit mikroskopischen Methoden (REM, AFM, SFM, STM) untersucht werden können.<sup>[66,67]</sup> Gleichzeitig sind sie sehr einfach herzustellen und ausgesprochen flexibel, was die Funktionalisierbarkeit mit terminalen Gruppen an der Oberfläche der Monoschicht betrifft. Schließlich ist Gold als Substrat sowohl inert in biologischen Systemen als auch gegenüber den allermeisten organischen Funktionalitäten.

Darüber hinaus bieten sich ausgezeichnete Möglichkeiten der Analytik dieser Systeme. Neben bereits erwähnten mikroskopischen und elektronenmikroskopischen Methoden lassen sich die chemischen Eigenschaften der Oberflächen mittels Reflexions-Absorptions-IR (RAIRS)<sup>[68]</sup> oder auch durch massenspektrometrische Anwendungen<sup>[69]</sup> wie MALDI-ToF<sup>[70]</sup> bestimmen. Die Polarität der Kopfgruppen bestimmt die

Benetzungseigenschaften der Monoschichten. Kontaktwinkelmessungen ermöglichen die Quantifizierung der Polarität (Abbildung 2.7).

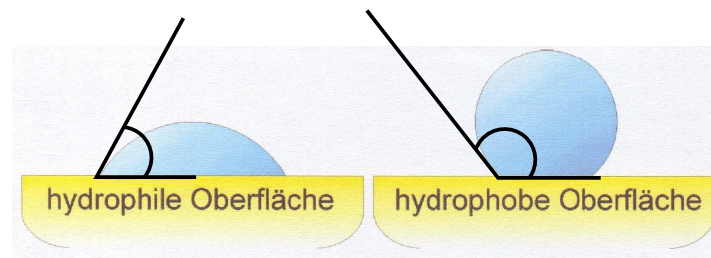


Abbildung 2.7: Wassertropfen auf hydrophiler und hydrophober Oberfläche.

Schichtdicken lassen sich präzise durch Ellipsometrie vermessen, und schließlich können Intensität und Geschwindigkeit der Wechselwirkung von zu untersuchenden Substanzen mit auf der SAM-Oberfläche exponierten Rezeptoren durch *Oberflächenplasmonenresonanz* (SPR) untersucht werden. Dies ist durch die BIAcore-Technologie kontaktfrei von der Rückseite der Glas-Wafer her in Echtzeit möglich.

Auf einige der angesprochenen Methoden soll im folgenden Abschnitt genauer eingegangen werden.

### 2.2.1 Schichtdicke – Ellipsometrie

Von den zur Charakterisierung von Monoschichten zur Verfügung stehenden Verfahren stellt die Ellipsometrie eines der wichtigsten dar.<sup>[71]</sup> Diese optische, zerstörungsfrei arbeitende Methode gibt quantitativ Auskunft über die Schichtdicke eines SAM und erlaubt daraus Rückschlüsse auf den Bedeckungsgrad der Oberfläche. Auf diese Weise läßt sich in Verbindung mit der theoretisch errechneten Schichtdicke die Einheitlichkeit des Films ermitteln.

Das Meßprinzip beruht auf der Änderung des Zustandes der Polarisation des von der Probe reflektierten Lichtes. Licht ist eine transversale, elektromagnetische Welle, bei der die Vektoren des elektrischen Feldes  $\vec{E}$  und die des magnetischen Feldes  $\vec{H}$  senkrecht zueinander und zur Ausbreitungsrichtung  $\vec{z}$  stehen (Abbildung 2.8).

Läßt man einen linear polarisierten Lichtstrahl senkrecht auf eine geeignete Oberfläche (z. B.  $\lambda/4$ -Plättchen: doppelbrechendes Kristallplättchen aus Gips oder Quarz der Dicke  $\lambda/4$  mit  $\lambda =$  Wellenlänge des verwandten Lichtes) so auftreffen, daß die Schwingungsebene des polarisierten Lichts mit den beiden optischen Achsen des Plättchens einen Winkel von exakt  $45^\circ$  aufspannt, so erhält man zirkular polarisiertes Licht.

Der einfallende Lichtstrahl wurde im doppelbrechenden Medium in zwei senkrecht zueinander schwingende, linear polarisierte Wellenkomponenten gleicher Amplitude und Wellenlänge, die eine Phasendifferenz in der Größe  $\lambda/4$  besitzen, aufgespalten. Die Projektionen der bei der Interferenz der beiden Strahlkomponenten resultierenden Schwingungsspektren auf die zur Ausbreitungsrichtung senkrechte Ebene werden in diesem Fall zu einem Kreis. Haben die beiden Wellenkomponenten nicht genau einen Gangunterschied von  $\lambda/4$  oder ist ihre Amplitude verschieden, so entsteht elliptisch polarisiertes Licht.<sup>[72]</sup> Auf weiterführende physikalische Grundlagen soll hier nicht weiter eingegangen werden.

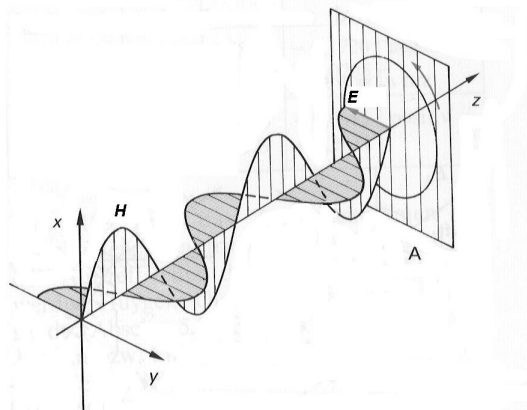


Abbildung 2.8: Darstellung polarisierten Lichts als elektromagnetische Welle.

Wichtig ist, daß sich so mittels Ellipsometrie über den Brechungsindex die Dicke einer reflektierenden Schicht mit einer Genauigkeit von bis zu 0.1 nm bestimmen lassen.

### 2.2.2 Polarität – Kontaktwinkel

Als Kontaktwinkel bezeichnet man den Winkel, den eine Tangente an die Tropfenkontur im Drei-Phasen-Punkt zur Oberfläche des Festkörpers bildet. Er ist somit ein Maß für die Rauigkeit sowie die Benetzbarkeit einer Oberfläche – je größer der Kontaktwinkel, umso schlechter ist die Benetzung (siehe Abbildung 2.7).

Durch die Messung des Kontaktwinkels von Flüssigkeiten mit bekannter Oberflächenspannung lassen sich Aussagen über die Oberflächenenergie der untersuchten Oberfläche machen. Um die Polarität der selbstanordnenden Schicht zu ermitteln, wurden im Rahmen dieser Dissertation Kontaktwinkeluntersuchungen in Kooperation mit dem Arbeitskreis PD Dr. A. TERFORT an der Universität Hamburg durchgeführt.<sup>[73]</sup> Im Falle terminaler Hydroxylgruppen ist eine hohe Polarität und demnach eine weitgehende Benetzung der Oberfläche des SAM mit Wasser zu erwarten. Bei Alkyl-SAMs oder Alkin-Kopfgruppen ist jedoch nur eine schwache Benetzung mit Wasser anzunehmen.

Dazu ein paar theoretische und apparative Überlegungen:<sup>[74]</sup> Als Oberflächenspannung wird die Grenzflächenspannung zwischen einer flüssigen und einer gasförmigen Phase bezeichnet. Diese Spannung resultiert daraus, daß die potentielle Energie

von Molekülen in einer Phase von den Wechselwirkungen mit den Nachbarmolekülen abhängig ist. An der Phasengrenze zu einem anderen Medium unterliegt ein Molekül nicht denselben Wechselwirkungen wie im Inneren der Phase. Daraus ergibt sich ein Unterschied der potentiellen Energie. Flüssigkeiten sind daher bestrebt, möglichst kleine Oberflächen auszubilden, also möglichst Kugelform anzunehmen. Zur Deformierung der Kugel muß Arbeit verrichtet werden, um Flüssigkeitsmoleküle aus dem Inneren der Phase an deren Grenzfläche zu transportieren. Die Zunahme der Freien Enthalpie  $\Delta G$  ist proportional zur Zunahme der Oberfläche  $\Delta A$  der Flüssigkeit (Gl. 2.1). Der Proportionalitätsfaktor  $\sigma_{lv}$  ist die erste Grenzflächenspannung, die *Oberflächenspannung*.

$$\Delta G = \sigma_{lv} \cdot \Delta A \quad (2.1)$$

$$\sigma_{lv} = \frac{dG}{dA} \quad (2.2)$$

$$\sigma_{sv} = \sigma_{sl} + \sigma_{lv} \cdot \cos \Theta \quad \text{Young'sche Gleichung} \quad (2.3)$$

$\sigma_{sv}$  ist dabei die zweite Grenzflächenspannung, die zwischen der festen und der gasförmigen Phase auftritt und auch als *Oberflächenenergie* bezeichnet wird.  $\sigma_{sl}$  bezeichnet schließlich die dritte Grenzflächenspannung, die zwischen der festen und der flüssigen Phase besteht. Die *Young'sche Gleichung* (Gl. 2.3) beschreibt den Zusammenhang zwischen den drei Grenzflächenspannungen im Gleichgewicht, die den Kontaktwinkel einer Flüssigkeit auf einer Oberfläche bestimmen (Abbildung 2.9 a).

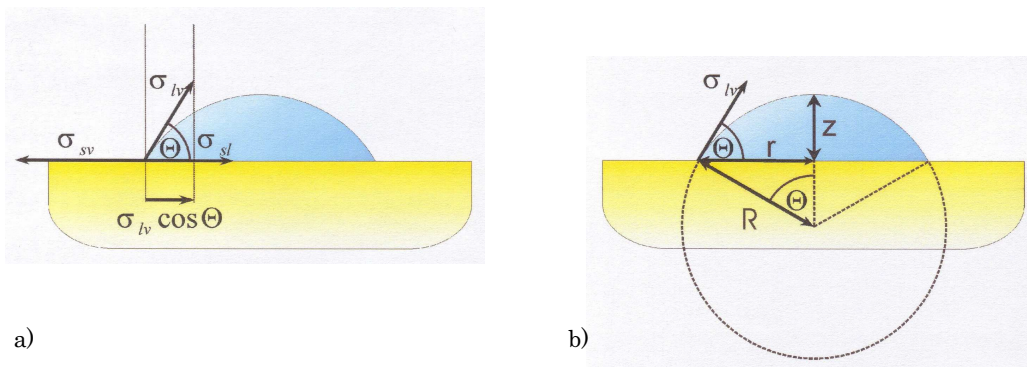


Abbildung 2.9: a) Grenzflächenspannungen eines Flüssigkeitstropfens auf einer Oberfläche; b) Kugelsegmentmethode.

Es sind sowohl mechanische als auch optische Verfahren zur Messung des Kontaktwinkels bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich die *sessile drop*-Methode angewandt (Abbildung 2.10).

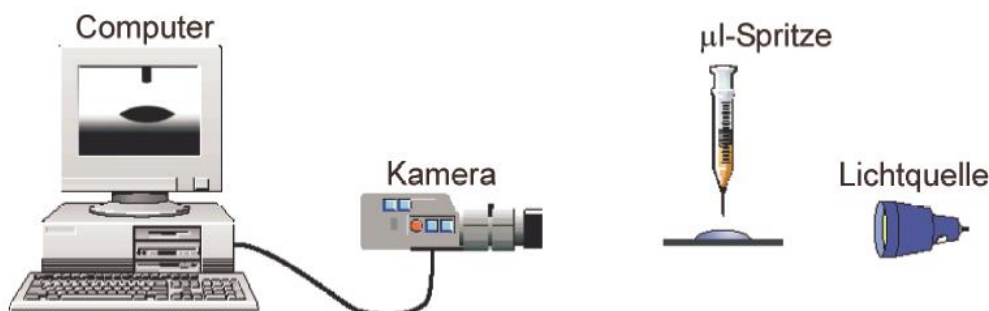


Abbildung 2.10: Experimenteller Aufbau zur Kontaktwinkelbestimmung.

Diese optische Methode wertet das Bild eines Tropfens auf der zu untersuchenden Oberfläche mit kommerzieller Software aus. Notwendige Beobachtungsgrößen sind der Tropfenradius  $R$  und die Tropfenhöhe  $z$  (vergl. Abbildung 2.9 b).

Die Berechnung des Kontaktwinkels  $\Theta$  kann dann über die Kugelsegment-Methode (Gl. 2.6) erfolgen.

$$r = R \cdot \sin \Theta \quad (2.4)$$

$$z = R \cdot (1 - \cos \Theta) \quad (2.5)$$

$$\Theta = 2 \cdot \arctan \left( \frac{z}{r} \right) \quad (2.6)$$

### 2.2.3 Oberflächenwechselwirkung – Plasmonenresonanz (SPR)

Oberflächenplasmonen-Resonanz (SPR) ist ein quantenmechanisches Phänomen, das bei der Reflexion von Licht an einer Metalloberfläche auftritt.<sup>[75,76]</sup> Das bekannte Verhalten von Metallen beim Auftreffen von Licht ist dessen Reflexion (Spiegel). Die Eindringtiefe von Licht liegt bei etwa 50-100 nm. Es genügen sehr geringe Schichtdicken aus Gold oder Silber, um eine optimale Reflexion der Lichtwelle zu erzielen.<sup>[77]</sup> Im Bereich der Totalreflexion eines polarisierten Lichtstrahls werden an der Grenze zwischen Glas und einer dünnen Metallschicht auf deren Rückseite, die an ein Medium mit geringerer Brechungszahl (Luft oder Wasser) grenzt, elektromagnetische Oberflächenwellen, sog. *Plasmonen* induziert (Abbildung 2.11).

Die *Biomolekulare Interaktionsanalyse* (BIA) misst die Änderung des Totalreflexionswinkels eines polarisierten Lichtstrahls einer bestimmten Wellenlänge im Grenzbereich zwischen Glas und einer dünnen Goldschicht. Adsorbieren Partikel (z. B. Proteine) auf deren Oberfläche, so wird die elektrische Feldkomponente der Plasmonenwellen phasenverschoben reflektiert oder deren Amplitude verringert. Dies resultiert aus einer durch den Bindungsvorgang hervorgerufenen Änderung des Brechungsindex der immobilisierten Schicht.<sup>[78]</sup>

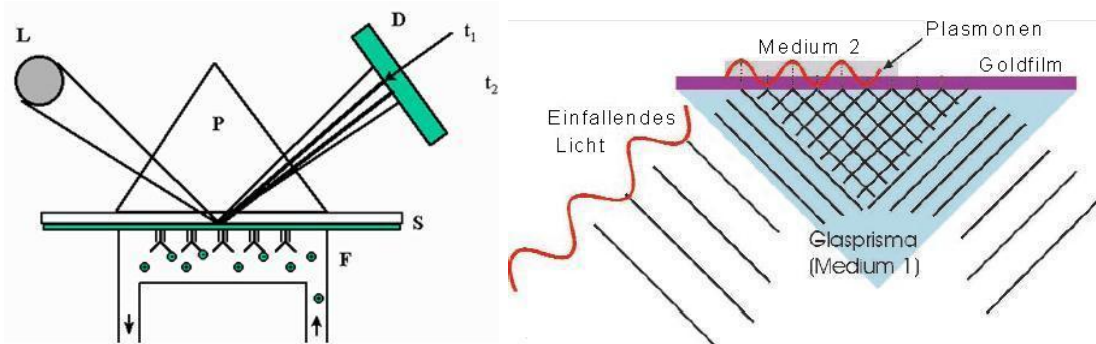


Abbildung 2.11: SPR-Detektion in Echtzeit durch BIAcore-Technologie.

L = Lichtquelle, P = Prisma, D = Detektor, S = Sensor, F = Flusskammer

Die Änderung des Brechungsindex kann über die Totalreflexionswinkelverschiebung in Echtzeit gemessen werden, die minimale Signalaufösung beträgt ca. 1 Hz. Aus der Geschwindigkeit der Änderung können die Assoziations- und Dissoziationskonstanten ermittelt werden. Die Größe der Signaländerung ist direkt proportional zur Masse der adhärenierten Komponente und erlaubt so qualitative Einschätzungen zur Stöchiometrie der Interaktion.

Diese Methode kann ebenfalls *in situ* angewandt werden, um Proteinadsorption auf nicht biorepulsiven Oberflächen von Alkyl-SAMs zu untersuchen oder die Repulsivität von variierenden Oligoethylenglycoleinheiten zu quantifizieren.<sup>[79]</sup>

Die kommerziell erhältlichen Geräte der Firma BIAcore AB (Uppsala, Schweden) sind etablierte, anwenderorientierte Systeme zur kontinuierlichen Messung von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen.<sup>[80]</sup> Kernstück der Anlagen ist eine Fließkammer mit optischer Einheit und angrenzendem Sensor-Chip (Abbildung 2.11). Auf dem Sensor ist der Rezeptor immobilisiert. In der Fließkammer werden die zu untersuchenden Reaktionspartner zugeführt, und gleichzeitig werden die resultierenden Signale mit einer Sensibilität von bis zu 5 Resonanzeinheiten (resonance unit, RU)<sup>[81]</sup> aufgezeichnet. Durch Immobilisierung radioaktiv markierter Proteine konnte gezeigt werden, daß eine gute Korrelation zwischen dem SPR-Signal und der Belegungsdichte auf der Sensoroberfläche besteht. Eine Änderung des SPR-Signals von einer RU entspricht dabei ungefähr einer Massenänderung auf der Sensoroberfläche von  $10^{-12}$  g.<sup>[82,83]</sup>

Die Oberflächenplasmonen-Resonanz wird seit vielen Jahren überwiegend in der Bioanalytik zur labelfreien Detektion von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen eingesetzt. Die wichtigsten Anwendungen hierbei sind Rezeptor-Ligand-Studien bezüglich Gleichgewichtskonstanten und Spezifität, die kinetische Charakterisierung biochemischer Prozesse und die Analytik von Strukturdomänen in dünnen Schichten und Filmen. Seit kurzer Zeit wird die SPR auch als bildgebende Methode (SPR-Imaging) zur flächenaufgelösten Charakterisierung von dünnen Schichten eingesetzt.<sup>[84,85]</sup>



In der vorliegenden Arbeit sollen u. a. mittels SPR-Messungen die Wechselwirkungen zwischen zuckerfunktionalisierten, selbstorganisierten Monoschichten auf Gold und verschiedenen Lektinen untersucht werden.

Die Experimente erfolgen größtenteils als Differenzmessungen gegen eine Referenzflußzelle. Dadurch kann sichergestellt werden, daß ausschließlich die tatsächlich auftretenden Interaktionen zwischen Rezeptor und Ligand untersucht werden. Artefakte der Messung oder unspezifische Wechselwirkungen fließen dabei nicht in die Messergebnisse ein. Um die Resonanzeinheiten (RU) zu bestimmen, wird aus dem Sensogramm die Differenz zwischen dem Basislinienniveau A und dem Gleichgewichtsniveau B gebildet (Abbildung 2.12).

Sind kleine Moleküle (Kohlenhydrate) immobilisiert und enthält die Analytlösung vergleichsweise schwere Einheiten (Proteine), so wird das Gleichgewicht in der Assoziations- und der Dissoziationsphase langsam erreicht. In Abbildung 2.12a ist ein typisches Sensogramm aus Experimenten mit einem immobilisierten Zucker und einem Lektin in der Analytlösung gezeigt.

Im Falle eines immobilisierten Lektins und kohlenhydrathaltiger Analytlösung nehmen die Sensogramme annähernd die Form von Rechteckpulsen an (Abbildung 2.12 b). Das Gleichgewicht wird sehr schnell erreicht, und ebenso schnell verläuft die Dissoziation der gebildeten Komplexe nach dem Ende des Injektionsvorgangs. Die an den Punkten C und D der Sensogramme auftretenden „spikes“ werden durch die Differenzbildung verursacht: Da die einzelnen Zellen nacheinander vom Analyt durchflossen werden, kommt es zu einem minimalen zeitlichen Versatz. Nach Abzug der Werte der Referenzzelle resultieren hieraus sogenannte spikes als Subtraktionsartefakte.

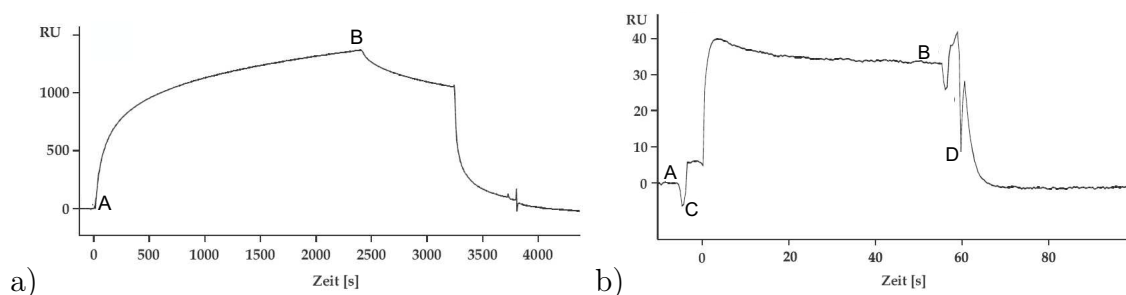


Abbildung 2.12: a) BIAcore-Sensogramm für immobilisierten Zucker und Lektin als Analyt; b) BIAcore-Sensogramm für immobilisiertes Lektin und Zucker als Analyt

### 2.2.4 Biorepulsivität

Ein detailliertes Verständnis der Wechselwirkungen von Proteinen mit künstlichen Oberflächen ist essentiell für das Studium von biologischen Prozessen auf Zellmembranen.<sup>[86]</sup> In diesem Zusammenhang wurden umfangreiche medizinische Studien angestellt, weil das Unterdrücken der unspezifischen Adhäsion von pathogenen Bakterien an künstlichen Oberflächen von beispielsweise Prothesen oder Kathetern von großem therapeutischen Interesse ist.<sup>[87]</sup>

Es wurde in allen, voneinander unabhängigen Arbeiten auf dem Gebiet der Zelladhäsion die repulsive Wirkung von Oligoethylenglycoleinheiten bestätigt. Besonders die Gruppe um G. M. WHITESIDES hat Pionierarbeit auf diesem Gebiet geleistet.<sup>[88,89]</sup> Es wurde ein Einfluß der Länge von Ethylenglycoleinheiten auf die Adsorption von verschiedenen Proteinen auf Gold-SAMs gefunden und quantifiziert. Auch BENESCH *et al.* haben die Proteinadhäsion untersucht. Für den Fall von Fibrinogen, heparinisiertem Plasma sowie Serum auf Au-SAMs war eine eindeutig repulsive Wirkung ab einer Kettenlänge von sechs EG-Einheiten zu finden.<sup>[90]</sup>

Diese Ergebnisse und die chemischen Eigenschaften von Ethylenglycolen verdeutlichen das große Potential von EG<sub>n</sub>-Einheiten in Monoschichten auf Oberflächen.

Der Ausdruck „Biorepulsivität“ ist im Kontext mit der biologischen Verwendung von SAMs für die Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen von Bedeutung, ohne daß jedoch eindeutiger Konsens darüber besteht, was darunter zu verstehen ist. Bezug nehmend auf die in diesem Zusammenhang wegweisenden Arbeiten von WHITESIDES *et al.* wird in der vorliegenden Arbeit unter Biorepulsivität oder Bioresistenz die Eigenschaft eines SAMs verstanden, die Wechselwirkung eines Proteins (beispielsweise eines zu untersuchenden Lektins) mit der Goldoberfläche des für die Ausbildung der Monoschicht verwendeten Wafers zu verhindern. Davon zu unterscheiden ist der Begriff der unspezifischen Wechselwirkung, der sich auf die Interaktionen eines Biomoleküls mit den auf einem SAM exponierten Liganden bzw. Bindungsepitopen bezieht. Ist diese Interaktion spezifisch, beispielsweise die Interaktion eines Mannose-spezifischen Lektins mit einer Mannose-exponierenden Monoschicht, so können aus entsprechenden Untersuchungen Aussagen über Bindungskonstanten ( $K_D$ ) und die Kinetik der Wechselwirkung getroffen werden. Spielt bei diesen Messungen jedoch auch unspezifische Adhäsion an das Metallsubstrat eine Rolle, werden die Ergebnisse verfälscht.

Insofern sind für die Qualität eines SAMs vor dem Hintergrund der biologischen Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen beide Kriterien, Biorepulsivität, sowie die Frage unspezifischer Wechselwirkung von entscheidender Bedeutung. Beide Punkte werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit adressiert.

Einen hervorragenden Review zu Funktion und Synthese von biologisch relevanten Konjugaten mit PEGs gibt ZALIPSKY.<sup>[91]</sup>

#### 2.2.4.1 Biokompatibilität von PEG-Schichten

Polyethylenglycol (PEG) ist ein biokompatibles, polares aber nichtionisches Polymer bzw. Oligomer, das wichtige Eigenschaften wie geringe Toxizität und Wasserlöslichkeit vereint und dabei nicht immunogen ist.<sup>[92,93]</sup> Die Oxyethylen-Einheit  $\text{—OCH}_2\text{CH}_2\text{—}$  hat einen C—O—C-Bindungswinkel von  $110^\circ$ , der dem des H—O—H-Winkels des Wassers ähnlich ist.<sup>[94]</sup> Diese strukturelle Ähnlichkeit und die Wasserstoffbrückenbindung zum Ethersauerstoff erklären die gute Löslichkeit in Wasser.

Es ist außerdem in vielen, sehr unterschiedlichen Lösungsmitteln wie u. a. Toluol und Dichlormethan löslich und stellt somit sowohl für den präparativen Organiker als auch für den anwendungsorientierten Biotechnologen ein ausgesprochen nützliches Werkzeug dar. Es kann als „chemischer Abstandshalter“ mit definierter maximaler Länge eingesetzt werden und ist in verschiedenen Oligomergrößen kommerziell erhältlich.

#### 2.2.4.2 Biorepulsive Oberflächen durch Ethylenglycolfilme

PEGs in wässriger Lösung sind hoch mobile Moleküle mit einem hohen Ausschlußvolumen. Die Hydroxylgruppen fungieren nur als äußerst schwache Säuren für Wasserstoffbrückenbindungen, daher sind PEGs neutral mit nur sehr schwach basischen Etherbrücken.<sup>[95]</sup> Das Molekül ist außerdem hochgradig hydratisiert. Liegen auf einem SAM die PEGs als Teil einer selbstangeordneten Monoschicht vor, so führen die eben beschriebenen Eigenschaften zur *Biorepulsivität*: Die schnelle Bewegung der Moleküle des PEG-Films gibt einem Protein nur sehr wenig Raum und Annäherungszeit, um eine positive, unspezifische Interaktion mit der Oberfläche auszubilden.

Zu dieser kinetischen Überlegung kommen thermodynamische Effekte: Wollte sich ein Protein an die Oberfläche unter einer PEG-Schicht binden (Physisorption auf Gold im Beispiel eines Gold-SAM), so müßte es den PEG-Film gegen die Oberfläche komprimieren. Dies führte zu einer negativen Änderung der Entropie durch die dann verringerte Motivität der hochmobilen, hydratisierten PEG-Ketten. Um diesen Effekt zu umgehen, müßten die im PEG-Rasen eingebetteten Wassermoleküle herausgedrückt werden, was wiederum enthalpisch ungünstig ist.<sup>[96,97]</sup>



der beiden möglichen regioisomeren Cycloadditionsprodukte, dem 1,4- und dem 1,5-Triazol führte und ein solcher Mangel an Regiospezifität den Nutzen der Reaktion einschränkte (Schema 2.1). Ein sehr guter Review hierzu kommt von KATRITZKY.<sup>[106]</sup>

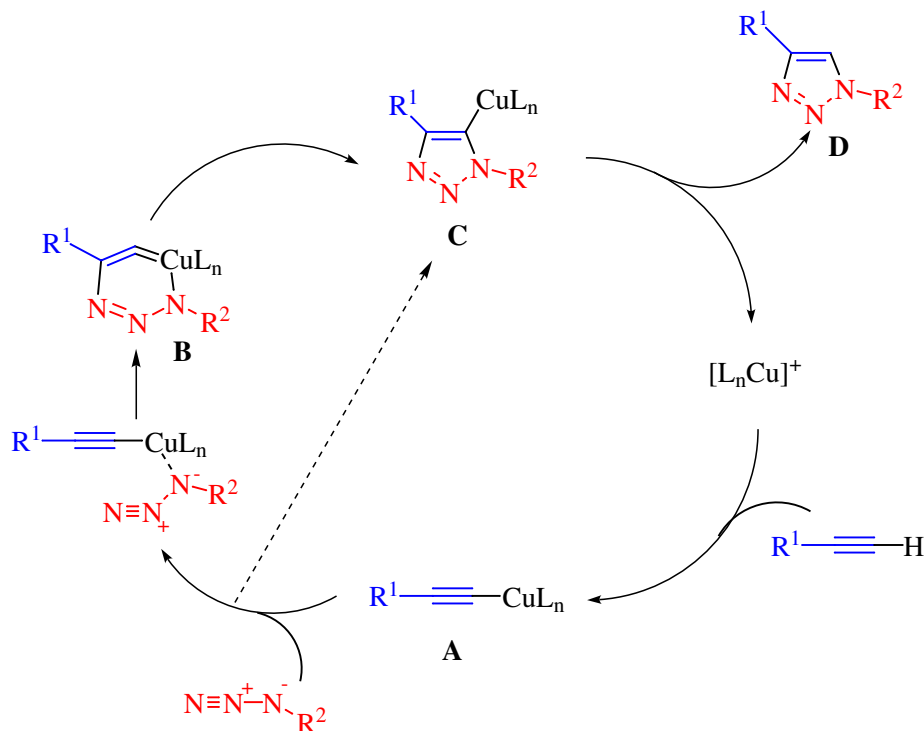
Erst um 2001 erfuhr diese Reaktion eine Renaissance durch die Entdeckung von SHARPLESS *et al.*, daß die Katalyse mit Kupfer(I)-Ionen die Cycloadditionsreaktion nicht nur selektiv in ein 1,4-Substitutionsmuster dirigierte, sondern dabei auch gleichzeitig die bis dato übliche thermische Aktivierung unterbleiben und außerdem bei Raumtemperatur und in wäßrigen Medien gearbeitet werden konnte. Dazu schreiben SHARPLESS *et al.*:<sup>[107]</sup>

„Dem Beispiel der Natur folgend, sind wir bestrebt, Verbindungen durch Zusammenfügen kleiner Einheiten über Heteroatombindungen (C–X–C) zu bilden. Das Ziel ist die Entwicklung einer wachsenden Gruppe von leistungsfähigen und selektiven modularen ‚Baueinheiten‘, die bei Synthesen in kleinem und großem Maßstab mit hoher Zuverlässigkeit verwendbar sind. Diese Herangehensweise haben wir ‚Click-Chemie‘ genannt und strenge Kriterien definiert, die ein Verfahren erfüllen muss, um in diesem Zusammenhang Anwendung zu finden. Die Reaktion muss *modular* und *breit* anwendbar sein, zu *sehr hohen Ausbeuten* führen und nur *nicht störende Nebenprodukte* liefern, die mit nichtchromatographischen Methoden einfach abgetrennt werden können. Außerdem muß die Reaktion *stereospezifisch* (wenngleich nicht notwendigerweise enantioselektiv) sein. Die Reaktion muss unter *einfachen Bedingungen* ablaufen und sollte idealerweise nicht gegenüber Sauerstoff und Wasser empfindlich sein sowie nur *leicht erhältliche Ausgangsverbindungen und Reagentien* benötigen. Weiterhin sollten nur *Lösungsmittel* verwendet werden, die einen *bequemen Einsatz* erlauben (wie etwa Wasser), die *leicht entfernbar* sind und eine *einfache Produktisolierung* ermöglichen. Die Reinigung – sofern erforderlich – muss ohne Chromatographie möglich sein, etwa durch Umkristallisieren oder Destillieren, und das Produkt muss unter physiologischen Bedingungen stabil sein.“

Es wird folgender Mechanismus postuliert (Schema 2.2): Der Katalysezyklus startet mit der Bildung des Kupfer(I)-acetylids **A** aus einem terminalen Alkin und durchläuft durch Annäherung eines Azids schrittweise den cyclischen Übergangszustand **B**. DFT-Rechnungen zufolge ist dieser Mechanismus bis zu 15 kcal/mol begünstigt gegenüber der konzertierten [2+3]-Cycloaddition direkt zum Addukt **C**, wie er von MELDAL *et al.* vorgeschlagen wird.<sup>[108]</sup> Die Abspaltung des Katalysators bildet schließlich das 1,4-Additionsprodukt **D**.

In 1,3-dipolaren Cycloadditionen nach dem Sharpless-Protokoll wird üblicherweise eine Stickstoffbase wie DIPEA,  $\text{NEt}_3$  oder 2,6-Lutidin in relativ polaren Lösungsmitteln wie Acetonitril oder Methanol bis hin zu DMF und Wasser verwandt. Die

katalytisch aktive Kupferspezies ist Cu(I). Dies kann durch Kupferhalogenide (CuI, CuBr) oder andere Salze wie  $\text{CuOTf} \cdot \text{C}_6\text{H}_6$  oder  $[\text{Cu}(\text{NHCCCH}_3)_4][\text{PF}_6]$  in die Lösung eingetragen werden oder *in situ* durch Kooxidantien gebildet werden. Hierfür ist  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  in Gegenwart von Ascorbaten gebräuchlich.



Schema 2.2: Vorgeschlagener Mechanismus der Cu(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Cycloadditionsreaktion zwischen Aziden und Alkinen.

Einen Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Untersuchung multivalenter Zucker-Protein-Wechselwirkungen, wie sie auf Zelloberflächen stattfinden. Dazu wird ein geeigneter, wohl definierter Bioassay benötigt, an dessen Oberfläche die zu untersuchenden Strukturen einheitlich installiert werden können. Es bieten sich grundsätzlich folgende zwei Möglichkeiten an:

- Die vollständigen Bausteine werden in einem Schritt auf der gewünschten Oberfläche immobilisiert. Dies bringt den Nachteil mit sich, daß der Prozeß der self-assembly häufig nicht im erwarteten Maße einheitlich und geordnet stattfindet. Dies ist besonders dann der Fall, wenn es sich bei den zu untersuchenden Liganden um hochgradig komplexe und sterisch anspruchsvolle (dendritische) Strukturen handelt. Dann muß durch eine geeignete „Verdünnung“ mit unfunktionalisierten Spacern eine gute Schichtausbildung gewährleistet werden.
- Es werden zunächst lineare Moleküle immobilisiert, die eine einheitliche Selbstordnung auf der Oberfläche schnell und zuverlässig erlauben. Diese Monoschicht-

ten müssen stabil sein und eine Analytik zulassen, die reproduzierbare Startbedingungen garantiert. Anschließend werden mit einer geeigneten Methode kovalent die erwünschten Funktionalitäten auf die Schicht gebunden. Hierfür bieten sich entweder die Einführung einer EG<sub>n</sub>-Schicht zur Minimierung unspezifischer Wechselwirkungen im späteren Test an oder das Aufbringen biorelevanter Rezeptoren wie Zucker oder Proteine.

Da Reaktionen auf dem SAM (on-SAM) keine Aufarbeitung im herkömmlichen Sinne erlauben, muß im Falle der Ligation auf einer Monoschicht mit reaktivem Terminus der Reinigungsschritt entfallen oder durch einfaches Spülen der Oberfläche erfolgen können. Dies ist bei ‚Click-Chemie‘-Reaktionen der Fall.

# 3 Stand der Forschung

Dieses Kapitel soll einen Überblick und eine kurze Zusammenfassung des Forschungsstands geben, der im Dezember 2001 zu Beginn der vorliegenden Arbeit erreicht war. Die daraus resultierende Aufgabenstellung wird in Kapitel 4 dargestellt.

Der Transfer von Information ist ein fundamentaler Prozeß des Lebens und aller zellulären Systeme. Aus biochemischer Sicht findet Signaltransduktion sowohl intrazellulär als auch interzellulär statt, wobei die drei wichtigen Biopolymere *Proteine*, *Nukleinsäuren* und *Glycokonjugate* eine ganz entscheidende Rolle spielen. Nachdem aus historischer Sicht über einen langen Zeitraum überwiegend den Proteinen und Nukleinsäuren große Bedeutung beigemessen wurde, befinden sich seit einiger Zeit auch die Kohlenhydrate und ihre Konjugate mit Lipiden und Proteinen im Zentrum der biochemischen Forschung. Es sei an dieser Stelle besonders auf die Sonderausgabe *Carbohydrates and Glycobiology* des Science-Magazins hingewiesen, die das zentrale (auch populärwissenschaftliche) Interesse an den Glycowissenschaften dokumentiert.<sup>[109]</sup>

In der modernen Kohlenhydratforschung gibt es viele Beispiele, in denen eine enorme Bindungsverstärkung zwischen Rezeptor und Ligand beobachtet wurde, nachdem man einige Monosaccharide mit schwacher Bindungsaktivität zu einem großen Molekül kombiniert hatte.<sup>[43]</sup> Vor diesem Hintergrund ist eine stark gewachsene Nachfrage nach vielen verschiedenen, zielstrukturoptimierten Kohlenhydrat-Clustern zu erklären. Dendritische, multivalente Cluster wurden zuerst 1978 von VÖGTLE *et al.* als Kaskadenmoleküle beschrieben.<sup>[110]</sup> Diese Grundstruktur wurde dann unabhängig voneinander durch NEWKOME<sup>[111]</sup> und TOMALIA<sup>[112]</sup> 1985 aufgegriffen und weiterentwickelt. Das Wort Glycocluster oder Glycodendrimer leitet sich ab aus Kohlenhydrat-enthaltenden Strukturen, die generationsweise in sich wiederholenden Einheiten aufgebaut werden.<sup>[113]</sup>

Es sind, ausgehend von verschiedenen Startgeometrien und -voraussetzungen, unterschiedliche Architekturen für synthetische multivalente Glycokonjugate bekannt, wovon einige in Abbildung 3.1 dargestellt sind.<sup>[56]</sup>



DUMY *et al.* beschrieben eine weitere räumliche Struktur, die multiple Kohlenhydratelemente auf einem Peptidgitter präsentiert.<sup>[114]</sup> Sogenannte *regioselektiv adressierbare funktionalisierte Template* (RAFTs)<sup>[115]</sup> als stabile Gerüste, die ursprünglich für das *de novo*-Design von Peptidomimetika verwandt werden sollten, wurden durch Saccharideinheiten funktionalisiert. Ohne physikalische oder chemische Immobilisierung wird lediglich eine Seite der Peptidcyclen funktionalisiert.<sup>[116]</sup> Auf diese Weise bieten diese cyclischen, chemoselektiv Templat-angeordneten Glycokonjugate gegenüber dendritischen Strukturen den Vorteil einer weitgehend definierten „Oberfläche“ durch eine orientierte Präsentation der saccharidischen Einheiten.

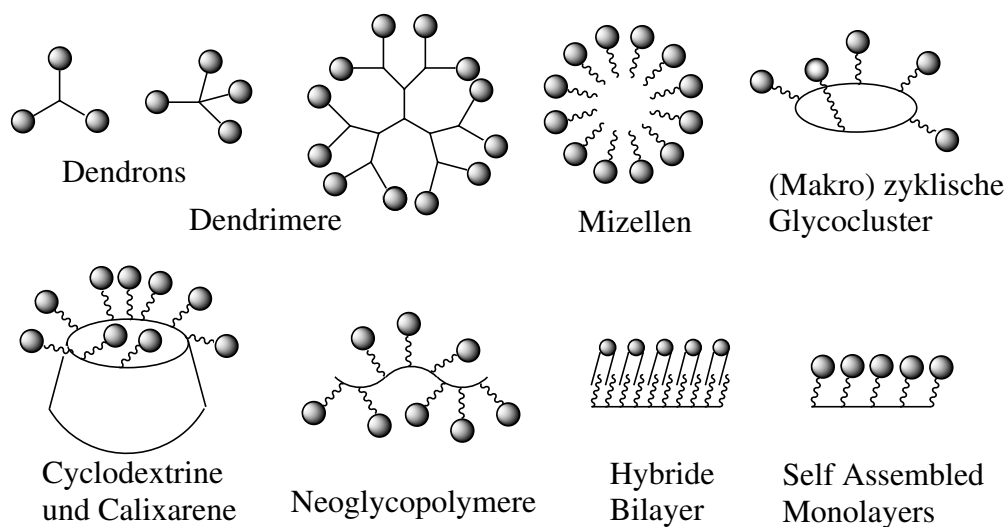


Abbildung 3.1: Mögliche multivalente Architekturen

Im Review von HOUSEMAN und MRKSICH wird eine andere Einteilung vorgestellt, die nicht auf der Topologie, sondern auf der Valenz der Struktur motive beruht.<sup>[117]</sup> Es wird eine Differenzierung in niedrig-valente Modellsysteme mit 2 bis 20 Kohlenhydratliganden (Dendrons und Dendrimere,<sup>[118]</sup> Cyclodextrine und Calixarene<sup>[119]</sup> sowie Glycocluster<sup>[113]</sup>) und hoch-valente Modellsysteme (Glycopolymere,<sup>[120]</sup> Neoglycoproteine,<sup>[121]</sup> Hybride Bilayer<sup>[122]</sup> und SAMs) vorgenommen.

Während sich Kandidaten der ersten Kategorie geometrisch und strukturell sehr gut charakterisieren lassen<sup>[123]</sup> und für vergleichsweise starke Wechselwirkungen zu polyvalenten Rezeptoren geeignet sind, bedarf es hoch-valenter Systeme, um Interaktionen zu untersuchen, die auf ausgedehnten Flächen stattfinden. Anwendungsbeispiele für solche Anordnungen sind die Zell-Zell- oder Zell-Pathogen-Kommunikation.

Im Aufsatz von MAMMEN und WHITESIDES wird ausführlich auf die thermodynamischen Faktoren, die eine polyvalente Wechselwirkung beschreiben, eingegangen.<sup>[50]</sup> Die durchschnittliche Freie Enthalpie ( $\Delta G_{avg}^{poly}$ ) der Wechselwirkung zwischen einer

Rezeptor- und einer Ligandeneinheit kann größer, gleich oder kleiner als die Gibbs-Energie der entsprechenden monovalenten Interaktion ( $\Delta G^{mono}$ ) sein. Es wird  $\alpha$  als Maß für die *Kooperativität* eingeführt (Gl. 3.1).

$$\begin{aligned}
 \Delta G_{avg}^{poly} &= \alpha \Delta G^{mono} \\
 N \Delta G_{avg}^{poly} &= \Delta G_N^{poly} = \alpha N \Delta G^{mono} \\
 K_N^{poly} &= (K_{avg}^{poly})^N = (K^{mono})^{\alpha N} \\
 \alpha &= \frac{\lg(K_N^{poly})}{\lg(K^{mono})^N} \quad \mathbf{Kooperativität} \quad (3.1)
 \end{aligned}$$

Dabei ist  $K$  die Assoziationskonstante. Man unterteilt entsprechend in positiv kooperative (synergistische), nicht kooperative (additive) und negativ kooperative (interferierende) Wechselwirkungen.

Ungeachtet der Kooperativität können unterschiedliche Systeme verschieden starke Affinitäten von Ligand zu Rezeptor besitzen und entsprechend als Testsystem für polyvalente Interaktionen besser oder schlechter geeignet sein. Diesem Umstand wird durch die Einführung des *Verstärkungsfaktors*  $\beta$  Rechnung getragen: Es gibt für die Interaktion von  $N$  Liganden und  $N$  Rezeptoren mehrere Modi der Wechselwirkung (z. B. intramolekular *versus* intermolekular) miteinander. Damit die intramolekulare Bindung den überwiegenden Effekt ausübt, muß die  $N$ -valente Wechselwirkung ( $\Delta G^{poly}$ ) bevorzugt gegenüber den  $N$  monovalenten Wechselwirkungen ( $N \cdot \Delta G^{mono}$ ) sein. Dabei muß berücksichtigt werden, daß für die Berechnung der freien Energie die getrennte Untersuchung der Terme der Enthalpie ( $\Delta H^{poly}$ ) und der Entropie ( $\Delta S^{poly}$ ) notwendig ist. Zur exakteren Beschreibung polyvalenter Wechselwirkungen wird der Parameter  $\beta$  eingeführt, der das Verhältnis der Assoziationskonstante des polyvalenten Systems zur Assoziationskonstante des monovalenten Liganden bezeichnet (Gl. 3.2).

$$\begin{aligned}
 \Delta G^{poly} &= \Delta G^{mono} - RT \ln \beta \\
 \beta &= \frac{K^{poly}}{K^{mono}} \quad \mathbf{Verstärkungsfaktor} \quad (3.2)
 \end{aligned}$$

Da in den meisten Systemen  $N$  unbekannt ist, ist der Verstärkungsfaktor  $\beta$  der Kooperativität  $\alpha$  vorzuziehen. Modellsysteme, die einen hohen  $\beta$ -Wert besitzen, eignen

sich entsprechend gut zur Simulation multivalenter Wechselwirkungen. In Anlehnung daran spricht man in der Glycobiologie vom positiven Clustereffekt bei Systemen, in denen  $\beta > 1$  ist. Weitere ausführliche Untersuchungen zur Thermodynamik des Multivalenz-Effekts finden sich z. B. auch bei BUNDLE *et al.*<sup>[51]</sup>

Auf die Beschreibung supramolekularer, multivalenter Systeme in Lösung und auf Oberflächen gehen HUSKENS und REINHOUDT ausführlich ein und stellen den Stand der Forschung und das Potential der Nanofabrikation in diesem Zusammenhang dar.<sup>[124]</sup>

Neben den Bestrebungen zum Aggregieren monodisperser Einheiten zu multimeren Strukturen fanden Anstrengungen statt, möglichst hochaffine Saccharideinheiten zu synthetisieren. Im Aufsatz von SEEBERGER *et al.*<sup>[125]</sup> sind dazu verschiedene Ansätze beschrieben: Mit Hilfe von Festphasen-Systemen sollte die schwierige und zeitintensive Synthese komplexer Oligosaccharide vereinfacht und effizienter gestaltet werden.

### 3.1 Messung von Multivalenz

Durch eine detaillierte Kenntnis der multivalenten Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen könnte man erheblich zur Aufklärung der Mechanismen der interzellulären Signaltransduktion beitragen, was möglicherweise den Weg zu besseren diagnostischen und auch therapeutischen Hilfsmitteln ebnet. Hierzu benötigt man geeignete Untersuchungsmethoden.

Die in den neunziger Jahren etablierte Microarray-Technik legte den Grundstein für Hochdurchsatzmethoden (HTS), mit deren Hilfe schneller und effizienter Ergebnisse in der Wirkstoffforschung<sup>[126]</sup> und der Diagnostik<sup>[127]</sup> erzielt werden konnten.<sup>[128]</sup> DNA-Chips<sup>[129]</sup> und Protein-Microarrays,<sup>[130]</sup> die durch zweidimensionales Auftragen der Biopolymere an einen geeigneten Träger hergestellt werden können, erlauben ein schnelles und kostengünstiges Screening der Wechselwirkungen dieser Verbindungen mit verschiedenen Substraten. Es sind Beispiele von photolithographisch<sup>[131]</sup> oder mittels Tintenstrahldruckern<sup>[132]</sup> erzeugten Oligonukleotid-Arrays auf Glaträgern bekannt. Auch Protein-Arrays an Glaträgern und Mikrovertiefungen wurden für ein leistungsfähiges Screening der Proteinaktivität und den Nachweis von Protein-Ligand-Wechselwirkungen eingesetzt.<sup>[133]</sup> Auf entsprechend funktionalisierten Glaträgern wurde bislang nur eine begrenzte Anzahl an Reaktionen zur Anbindung von Wirkstoffmolekülen etabliert.<sup>[134,135]</sup> Dazu wurden vorwiegend solche funktionellen Gruppen genutzt, die auch für die biologische Wirkung der zu untersuchenden Liganden ausschlaggebend sind, also z. B. Alkohole, Amine, Carbonsäuren oder Thiole.<sup>[136]</sup>

Andere Ansätze verwenden die Oberfläche von handelsüblichen Compact Disks (CDs). Durch eine Aktivierung der Polycarbonatoberfläche als Phosphordiester ist eine Anbindung diverser, hydroxyterminierter Strukturen auf die CD möglich. Dies wird in Verbindung mit vergleichsweise simplen print-Verfahren, die Tintenstrahldrucker verwenden, als wenig kostenintensive Variante für HTS-Verfahren diskutiert.<sup>[137]</sup>

*Frontal Affinity Chromatography* (FAC) stellt eine weitere Möglichkeit dar, weg vom Prinzip „eine Substanz - ein Test“ hin zum iterativen Einsatz einer Rezeptor-tragenden Analyseeinheit zu gelangen. Es werden unabhängig von der Konzentration der Analytlösung die Affinitätskonstanten bzw. die Dissoziationskonstanten zwischen einem immobilisierten Rezeptor (z. B. Lektin) und einer mobilen Phase (enthält z. B. Kohlenhydratstrukturen) ermittelt.<sup>[138, 139]</sup>

Immer mehr ist jedoch in der letzten Zeit die Entwicklung von Array-vermittelten Kohlenhydrat-Biosensoren ins Zentrum des Interesses gerückt.<sup>[140]</sup> Es sind verschiedene, gute Systeme etabliert, wobei auf zwei wichtige hier näher eingegangen werden soll.<sup>[141]</sup>

### 3.1.1 96-Well-Plate – ELISA

Die *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*-Technologie (ELISA), erstmals beschrieben 1971,<sup>[142]</sup> stellt eine verbreitete und geeignete Methode für medizinische Diagnostik dar.<sup>[143, 144]</sup> Das Prinzip ist schematisch in Abbildung 3.2 dargestellt.

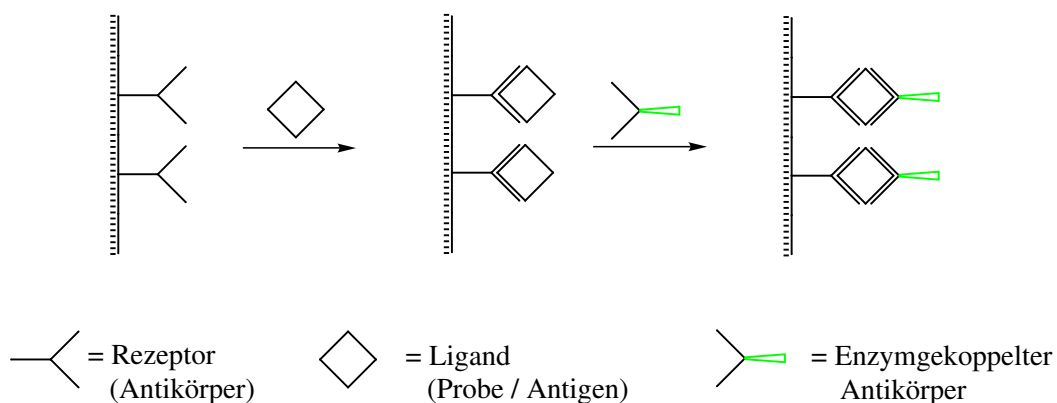


Abbildung 3.2: Funktionsprinzip des ELISA-Tests.

In der einfachsten Variante verwendet diese Methode grundsätzlich zwei Komponenten, eine feste Phase, an die ein Immunoreagens (Rezeptor) gebunden ist und ein Enzymkonjugat (Ligand).<sup>[145]</sup> Ursprünglich war dies Meerrettich-Peroxidase (HRP), an die kovalent ein spezifischer Antikörper gebunden war.

Die gewählten Enzyme müssen stabil sein, möglichst hohe turnover-Raten besitzen und eine hohe optische Dichte im Konjugat mit dem spezifischen Substrat ergeben. Die intensive Färbung ist für das optische Auslesen der Testergebnisse notwendig. Als feste Phase dient üblicherweise eine aus Polystyrol bestehende Mikrotiterplatte, die mit dem Immunoreagens beschichtet ist. Dies kann entweder ein Antikörper oder ein Antigen sein.

Hauptsächliches Augenmerk auf Optimierungen des ELISA-Tests seit den siebziger Jahren lag auf der Entwicklung neuer und der Verbesserung bestehender, spezifischer Antikörper mit höheren Bindungsaffinitäten zu ihren Antigenen und die Verwendung von Enzymen mit sehr hohen turnover-Geschwindigkeiten.

Die Sensibilität eines Immunoassays kann definiert werden als Verhältnis eines spezifischen Signals zum unspezifischen Hintergrundrauschen des Systems. Hierbei spielen nichtspezifische Wechselwirkungen zwischen Antikörper und fester Phase die größte Rolle. Üblicherweise werden zur Optimierung Additive wie Detergentien oder nichtreaktive Proteine wie beispielsweise BSA zugesetzt.<sup>[145]</sup> Obwohl diese Zusätze die Sensibilität und Genauigkeit vieler Tests verbessern, ist oftmals das Rauschen noch unbefriedigend hoch.

Das Beschichten der ELISA-Platten ist ein Routineprozeß, bei dem das Immunoreagens (Antikörper oder Antigen) aus einem wässrigen Milieu abgeschieden wird. Dabei adsorbieren die Reagentien häufig sehr gut auf der PS- oder PP-Oberfläche. Dennoch bilden offenbar einige Moleküle Ausnahmen und desorbieren teilweise, wobei dies häufiger bei langen Kohlenhydratketten der Fall ist. Die Tendenz zur Desorption ist besonders hoch nach der Bildung des Antikörper-Antigen-Komplexes auf der Oberfläche.

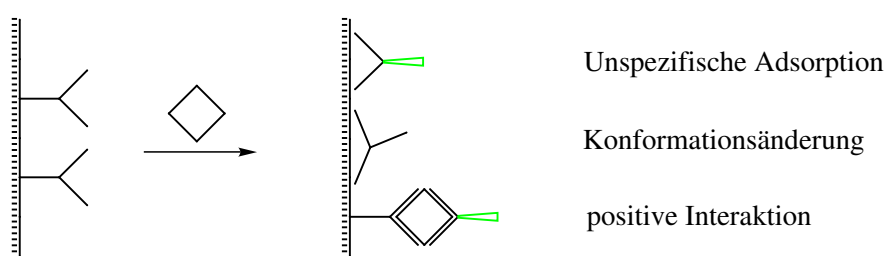


Abbildung 3.3: Unspezifische Adsorption und Konformationsänderung als Schwachpunkte im ELISA-Test

Als weiterer systemischer Schwachpunkt von ELISAs muß der Modus der einfachen Adsorption des Immunoreagens' angesehen werden, der u. U. zu einer Konformationsänderung und damit modifizierten Aktivität führen kann (Abbildung 3.3).

Viele der beschriebenen Phänomene sind mit der hydrophoben festen Phase assoziiert (siehe Abschnitt 2.2). Nichtspezifische Adsorption, Desorption des Antikörper-

Antigen-Komplexes und teilweise Denaturierung des Immunoreagens' auf der Oberfläche lassen sich durch eine kovalente Bindung des Reagens' auf einer Poly- oder Oligoethylenglycol-Oberfläche minimieren. Dies ist in Abbildung 3.4 illustriert.

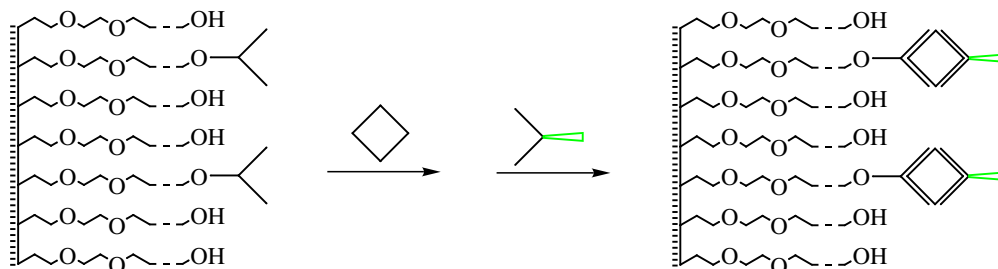


Abbildung 3.4: Vorteile der Fixierung von Oligoethylenglycolen auf ELISA-Platten.

Diese modifizierten Oberflächen sind jedoch aufwendiger in der Herstellung und bezüglich der notwendigen Immobilisierung des Immunoreagens', so daß die Einbindung von Oligoethylenglycolen in den ELISA-Tests kaum praktisch angewandt wird.

### 3.1.2 Wafer-Technologie

In Anlehnung an das HRP-gestützte Verfahren im ELISA-Test wurde dieses Modellprotein in selbstorganisierten Monoschichten auf Gold immobilisiert und erfolgreich mit AFM und XPS charakterisiert.<sup>[146]</sup>

Weitere Miniaturisierung führt von der Mikrotiterplatte hin zu Wafer-gestützten Verfahren.<sup>[147]</sup> Sie ermöglichen deutlich effektivere Techniken, die bei minimalem Platzbedarf eine wesentlich dichtere Platzierung der sensorisch aktiven Bereiche einer festen Phase erlauben. Zum Vergleich: Das Volumen der einzelnen Vertiefungen in der ELISA-Platte liegt in der Größenordnung von 0.5 bis 2.5 ml, wohingegen die SPR-Flußkammer des BIAcore 3000 mit 26 nl auskommt. Entsprechend geringer sind die Verbrauchsvolumina der zu untersuchenden Lösungen.

Die Entwicklung automatisierter Synthesemethoden für Oligosaccharide in Verbindung mit der Entwicklung der Mikrokontaktdrucktechnik zur Aufbringung von Liganden auf die Oberfläche eines SAM ermöglicht die rasche Herstellung von Chips, die ganze Kohlenhydratklassen enthalten.<sup>[133,148]</sup>

## 3.2 Selbstangeordnete Monoschichten (SAMs)

Die Zahl der Veröffentlichungen zum Thema *selbstangeordnete Monoschichten* hat in den letzten Jahren rasant zugenommen (Abbildung 3.5). Dies ist leicht nachzu-

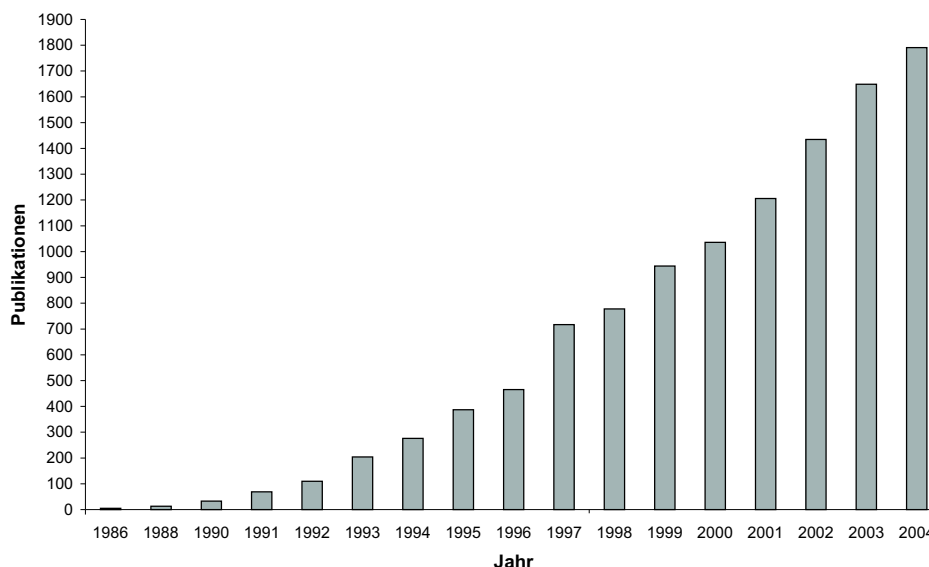


Abbildung 3.5: Veröffentlichungen, die „Self-assembled Monolayer“ als Konzept enthalten.<sup>[149]</sup>

vollziehen, hält man sich die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von SAMs vor Augen.

SAMs bieten u. a. ideale Möglichkeiten, um Grenzschicht-Phänomene zu untersuchen. Es sind prinzipiell vielfältige Kombinationen möglich, wie SAMs aus a) verschiedenen Molekülen auf b) verschiedenen Substraten durch c) verschiedene Methoden der Physisorption gebildet werden können.<sup>[61,64]</sup> In dieser Arbeit finden lediglich Monoschichten auf goldbeschichteten Glaswafern Betrachtung, welchen auch in der neueren Literatur das hauptsächliche Interesse zukommt.

### 3.2.1 SAMs auf vergoldeten Oberflächen

Nachdem WHITESIDES *et al.* Anfang der neunziger Jahre ein grundlegendes Paper zur Synthese der Bausteine, aus denen SAMs aufgebaut werden können, veröffentlicht hatten, war für eine längere Zeit die Zielrichtung der Forschung in diesem Gebiet vorgegeben.<sup>[150]</sup> Es handelte sich um langkettige, Schwefel-enthaltende Substanzen mit einem Alkylspacer, einer Hexaethylglycoleinheit und Termini, die zumeist aus Hydroxylfunktionen bestanden. Es wurden XPS, Kontaktwinkel- und Ellipsometriemessungen als Methoden zur Analytik vorgestellt.

HÄHNER *et al.* stellten 2003 umfangreiche Untersuchungen zur konformativen Ordnung der Oberfläche von adsorbierten Ethylenglycol-terminierten Alkylthiolen auf Gold an.<sup>[151]</sup> Mittels *Near-edge X-ray absorption fine structure*-Messungen (NEXAFS) ließ sich bei veränderten EG-Kettenlängen die ideale Filmstruktur, eine Mischung aus

helikaler und amorpher Konformation der OEG-Einheiten, nachweisen. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Röntgenmessungen im Ultrahochvakuum durchgeführt werden mußten und also der konformative Einfluß des Wassers, das unter biologischen Bedingungen vorhanden ist, eliminiert wurde.

Die ersten Anwendungen von saccharidisch funktionalisierten SAMs wurden zum Ende des letzten Jahrtausends beschrieben. Die Gruppe um BUNDLE synthetisierte Trisaccharide, an die glycosidisch Thiohexadecanspacer gekuppelt sind, welche jedoch noch keine EG-Abschnitte enthielten.<sup>[152]</sup>

MRKSICH *et al.* veröffentlichten schließlich Anfang 2002 die Konstruktion von Kohlenhydrat-Arrays zur Evaluation von Proteinbindung und enzymatischer Modifikation.<sup>[140]</sup>

KONRADSSON baute SAMs mit glycosidisch gebundenen Globotriosederivaten auf, um Kohlenhydrat-Protein Interaktionen zu untersuchen.<sup>[153]</sup> Dabei führte er gemischte SAMs ein, die aus Mischungen unterschiedlich elongierter Spacer bestehen. Somit war nicht nur die Variation der Liganddistanzen auf der Schicht, sondern auch die der Abstände zwischen der oligosaccharidischen Kopfgruppe und dem linearen Molekülteil, den die dichte Monoschichtpackung bildet, möglich (Abbildung 3.6).

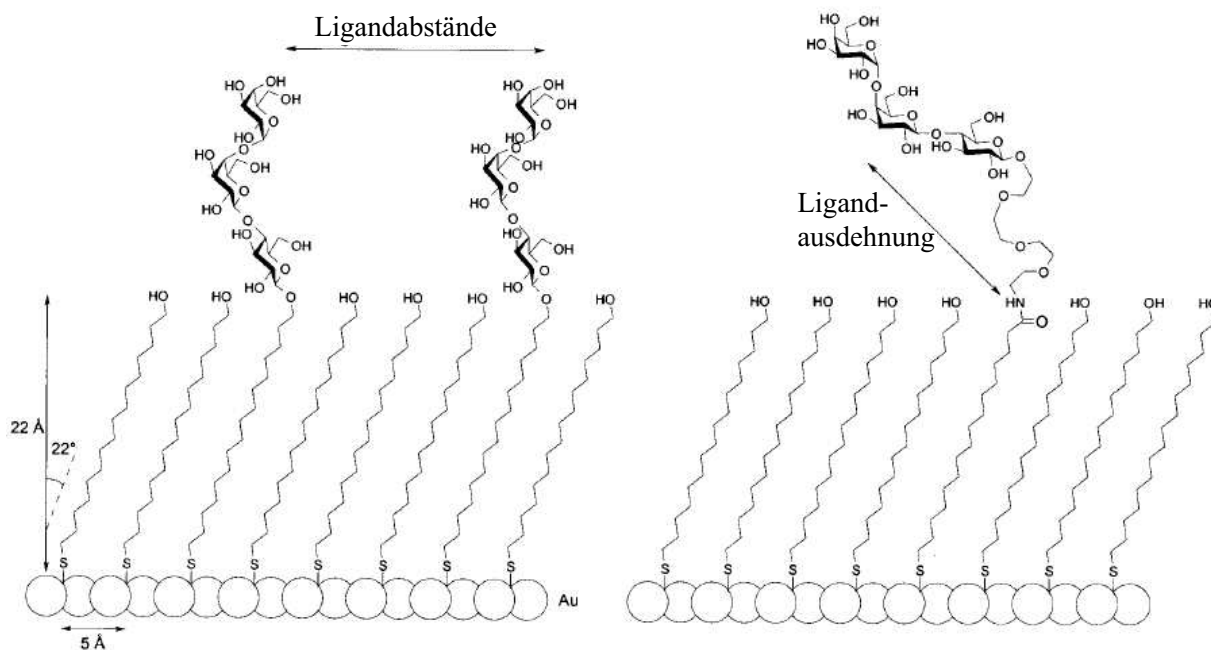


Abbildung 3.6: Schematischer Aufbau von SAMs aus gemischten Komponenten. Gezeigt ist der Schnitt durch eine idealisierte, atomar flache Au[111]-Oberfläche ( $r_{[Au]}=1.44 \text{ \AA}$ ), auf der Thiole in einer hexagonalen Struktur adsorbiert sind.

Neben der Fixierung Schwefel-tragender, kettenförmiger Moleküle auf glatten Goldoberflächen (Au 111) wurden solche funktionstragenden Einheiten auch sphärisch auf



Nanopartikeln aus Gold angeordnet. S. PENADÉS hat richtungsweisende Forschung auf diesem Gebiet geleistet (siehe Kapitel 3.2.2).

### 3.2.2 „SAMS“ auf Nanopartikeln

Die annähernd sphärische Architektur von Glycodendrimeren hat sich häufig als sehr erfolgreich bei der Untersuchung von Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen mittels multivalenter Kohlenhydratstrukturen gezeigt.

Die schwefelvermittelte, dreidimensionale Aggregation zu zuckertragenden Nanoclustern auf Goldpartikeln zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Wechselwirkungen wurde erstmals 2001 beschrieben.<sup>[154]</sup> Es handelt sich um Modellsysteme, in denen hoch polyvalente, saccharidische Strukturen um ein Gold-Zentrum gebunden sind und wasserlösliche Partikel bilden. Diese sind untoxisch und gleichzeitig stabil gegenüber enzymatischer Zersetzung. Damit bieten sich erstmals Möglichkeiten in der therapeutischen Anwendung, da diese funktionalisierten Nanopartikel direkt in biologischen Systemen bis hin zu lebenden Organismen applizierbar sind und ähnliche Dimensionen wie Proteine oder Enzyme haben.<sup>[155,156]</sup>

Ein ausgezeichnete aktueller Übersichtsartikel zu integrierten Hybridsystemen aus Nanopartikeln und Biomolekülen kommt von KATZ und WILLNER.<sup>[157]</sup>

### 3.2.3 Biorepulsivität an Oberflächen

Bereits Anfang der Neunziger Jahre haben PRIME und WHITESIDES die Adsorption von verschiedenen Proteinen an Oberflächen untersucht.<sup>[89]</sup> Es zeigte sich, daß für die untersuchten Proteine Fibrinogen, Pyruvatkinase, Lysozym und Ribonuklease A eine Abhängigkeit der Adhäsion vom Bedeckungsgrad der Goldoberfläche sowie auch von der chemischen Natur der Thiobausteine bestand. Es waren verschiedene Alkohole und Methylether der Struktur  $SC_{11}EG_nOR$  (mit  $n = 0, 1, 2, 4, 6, 17$ ) immobilisiert worden. Eine vollständige Unterdrückung der unspezifischen Proteinadhäsion konnte ab einer Kettenlänge von sechs EG-Einheiten für einen minimalen Bedeckungsgrad von 50 % festgestellt werden.

Ebenfalls von WHITESIDES *et al.* wurde die Zelladhäsion auf konturierten Oberflächen beschrieben. Durch Mikrokontakt-Printing konnten kontrolliert die Topologie und die molekulare Struktur von Monolayern definiert und so Einfluß auf das Ausmaß der Proteinadhäsion genommen werden.<sup>[158]</sup>

Dies bestätigten später STM- und AFM-Untersuchungen von der Arbeitsgruppe um JIANG. Sowohl chemische als auch strukturelle Oberflächeneigenschaften im nanoskalaren Bereich beeinflussen die Physisorption von Proteinen.<sup>[66]</sup>

Ein hervorragender Übersichtsartikel zu Struktur-Eigenschafts-Beziehungen von Oberflächen, die unspezifischer Proteinadsorption widerstehen, findet sich ebenfalls bei WHITESIDES.<sup>[159]</sup>

### 3.2.4 Funktionalisierung der Oberfläche als SAM

Es sind grundsätzlich verschiedene Verfahren zur Einführung von Funktionalitäten auf Oberflächen von Au-SAMs bekannt. Während die früheren Ansätze stets vollständige Bausteine, in denen die gewünschten bioaktiven Kopfgruppen bereits installiert waren, immobilisierten, gab es in der jüngeren Vergangenheit eher Bestrebungen, eine selbstangeordnete Monoschicht zuerst zu etablieren und anschließend eine Funktionalität einzuführen. Beide Strategien sind mit verschiedenen Vor- und Nachteilen verbunden.

Der einfachste und direkteste Weg zu funktionsgruppentragenden Monoschichten ist die Immobilisierung kompletter Bausteine. Diese wurden mittels klassischer Synthesechemie hergestellt und charakterisiert. Sie tragen eine aktive Einheit zur Verknüpfung auf dem Gold, ein freies Thiol, ein Disulfid oder auch eine geschützte Schwefel-Funktion wie ein Thioacetat. Der Vorgang der Immobilisierung erfolgt dann üblicherweise durch Eintauchen der (gereinigten) Goldoberfläche in die alkoholische Lösung der Komponenten und eine anschließende Phase der „Self Assembly“, meist unter Schutzgas über Nacht.

Die wesentlichen Vorteile liegen in der Einfachheit dieser Route, da nacheinander in einer konvergenten Synthese mittels Lösungsmittelchemie alle funktionellen Einheiten der SAM-Bausteine wie a) Schwefeleinheit, b) Alkylkette, c) biorepulsiver Abschnitt, d) aktive Kopfgruppe und ggfs. e) ein Konjugat von Kopfgruppe und Spacereinheit miteinander verbunden werden können. Dabei kann außerdem auf alle bewährten C–C- oder C–Heteroatomverknüpfungsreaktionen der klassischen organischen Synthese zurückgegriffen werden (siehe Abschnitt 3.2.4.1 - 3.2.4.3).

Ein Nachteil liegt in der Immobilisierung der Bausteine selbst, da mitunter sterisch anspruchsvolle Kopfgruppen die Selbstanordnung negativ bezüglich des Grades der Ordnung oder der Immobilisierungsdauer beeinflussen können. Hier kann durch eine „Verdünnung“ mit ähnlichen linearen, aber nichtfunktionalisierten Molekülen Abhilfe geschaffen werden. Allerdings ist das Mischungsverhältnis der Komponenten in Lösung nicht notwendigerweise exakt dasselbe wie das der Monoschicht.

Ein weiterer Nachteil dieses Vorgehens zur SAM-Bildung liegt in der begrenzten Vielfältigkeit, da jeweils die vollständigen Bausteine aufgebaut werden müssen, um beispielsweise neue biorelevante Kopfgruppen einzuführen.

Der zweite, prinzipiell davon verschiedene Weg orientiert sich an einem modularen Aufbau der Monoschicht. Zunächst wird mit einem vergleichsweise einfachen Molekülteil der SAM gebildet. Dies läßt sich mit einer hohen Ordnung der Schicht sehr gut und reproduzierbar erreichen. Die erhaltenen, nicht biorelevant funktionalisierten SAMs sind stabil und gut lagerbar. Tragen sie eine geeignete Verknüpfungsstelle im Kettenterminus, so läßt sich anschließend eine gewünschte Kopfgruppe anbringen. Hier sind die Möglichkeiten jedoch stark eingeschränkt, da auf der Oberfläche gearbeitet werden muß, also Diffusionsvorgänge eine Rolle spielen können und keine Aufarbeitung und Aufreinigung im herkömmlichen Sinne möglich ist. Ferner sind nur Reaktionen in einem begrenzten Temperaturrahmen möglich und solche, die die Au-S-Bindung nicht ausschließt, z. B. Reaktionen unter stark oxidativen Bedingungen.

Als sehr gut geeignet erwiesen sich Cycloadditionen, da sie im Idealfall ohne Nebenproduktbildung verlaufen. Insbesondere die 1,3-dipolare Cycloaddition von Alkin und Azid zum 1,2,3-Triazol scheint sehr gut geeignet, jedoch waren Anwendungen in diesem Zusammenhang zu Beginn dieser Arbeit noch nicht veröffentlicht. Siehe hierzu das Kapitel 4.

#### 3.2.4.1 Amid-Verknüpfung

Eine der vielfältigen Verknüpfungsmöglichkeiten zwischen dem langkettigen „Backbone“ und der biorelevanten Kopfgruppe der SAM-Bausteine ist die Amidbindung. Dies ist bereits 1995 im Review von ZALIPSKY beschrieben.<sup>[91]</sup> 1999 wird im Aufsatz von LIEDBERG *et al.* ausführlich die Amidbindung in EG<sub>x</sub>-Bausteinen durch Kontaktwinkelmessungen, Ellipsometrie sowie RAIRS untersucht, und es wird darauf hingewiesen, daß die zwischen der Alkylkette und der EG<sub>n</sub>-Einheit liegende Amidbrücke ein Wasserstoffbrückennetzwerk innerhalb des SAM bildet. Von diesem wird angenommen, daß es sich positiv auf die Selbstanordnung der Schicht auswirkt und zugleich die Konformation des OEG-Teils beeinflusst.<sup>[160]</sup>

Die Säurefunktion wird am Ende der Alkyleinheit lokalisiert und mit Amin-funktionalisierten Oligoethylenglycolabschnitten unter Standardbedingungen der Peptidsynthese verbunden. Das Vorhandensein einer Carboxylgruppe legt zur Bindungsknüpfung auch eine Veresterung als Alternative nahe (Siehe Abschnitt 3.2.4.2).

Intermediär gebildete Carbonsäureanhydride aus zwei jeweils auf dem SAM immobilisierten Säuren und die anschließende Reaktion mit Alkylaminen bauten inhomogene Oberflächen auf Au-SAMs auf. Diese Monoschichten besitzen in sehr guter Näherung eine gut gemischte 1:1-Bedeckung der Oberfläche mit Amid- und Carbonsäuren.<sup>[159,161]</sup>

### 3.2.4.2 Ester-Verknüpfung

Ebenfalls 1999 wurde in diesem Zusammenhang die Veresterung als Strategie zur Bindung von Rezeptoren bzw. Liganden auf SAMs von WHITESIDES *et al.* publiziert. Der Aktivester als geeignetes Intermediat zur Bindung kleiner Moleküle bis hin zu Proteinen wird beschrieben und u. a. eingehend mittels SPR-Messungen untersucht.<sup>[162]</sup>

### 3.2.4.3 Andere: Diels-Alder, Maleimid

Neben den vorgestellten, vielfältig angewandten Verknüpfungsmöglichkeiten, zu denen es viele weitere Publikationen gibt, wurden auch einige andere veröffentlicht. Während Amidbindung und Veresterung auch in biologischen Prozessen weit verbreitet sind, gibt es eher „chemische“ Varianten der Kupplung wie beispielsweise die Diels-Alder-Reaktion.

HOUSEMAN und MRKSICH beschrieben Anfang 2002 erstmals die Diels-Alder-gestützte Immobilisierung von Kohlenhydrat-Cyclopentadien-Konjugaten auf selbstangeordneten Monoschichten, die über einer EG<sub>5</sub>-Schicht Benzochinone präsentieren. Auf diese Weise wurden Kohlenhydrat-Arrays mit zehn verschiedenen Monosacchariden aufgebaut und bezüglich der Bindungsspezifitäten verschiedener Lektine evaluiert.<sup>[140]</sup> Im Jahre 2003 wurden ebenfalls von dieser Gruppe Maleimid-medierte Kupplungen für SAM-Bausteine veröffentlicht.<sup>[163]</sup>

Einen ganz anderen Ansatz wählte die Gruppe um CHIDSEY und VAN RYSWYK 2003. Metalloporphyrine wurden auf Au-SAMs installiert und elektrochemisch untersucht. Diese sollen letztlich als Template für zusätzliche modulare Modifikationen der Grenzschicht zwischen Monoschicht und Lösung dienen.<sup>[164]</sup>

### 3.2.4.4 „Click on SAM“

Zu Beginn dieser Arbeit waren keine Anwendungen der 1,3-dipolaren Cycloaddition nach HUISGEN/SHARPLESS auf Monoschichten jedweder Art bekannt und beschrieben.

Erst nach Beginn der hier beschriebenen Experimente in diesem Bereich kamen 2004 die ersten Veröffentlichungen zu „*Click-Chemistry*“ auf SAMs. Hier sind vor allem die Arbeiten von CHOI<sup>[165]</sup> und CHIDSEY<sup>[166]</sup> sowie HOFFMANN<sup>[167]</sup> zu nennen, die die Triazolbildung auf immobilisierten Bausteinen untersuchten.

### 3.2.5 Computergestützte Simulation der Oberflächen von SAMs auf Gold

Im Bereich des *Molecular Modelling* wurden viele Untersuchungen zu Aspekten der Multivalenz von Rezeptor-Ligand-Interaktionen durchgeführt. Um einen rationalen Ansatz zum Design von Molekülen des Glycodendrimertyps im Hinblick auf die Wechselwirkung zu spezifischen Rezeptoren zu erhalten, müssen Kenntnisse zum dynamischen Verhalten solcher Liganden vorliegen. Hierzu können Langzeitsimulationen zur Molekül-Dynamik (MD), auch unter Einbeziehung von Lösungsmiteleinflüssen, wichtige Erkenntnisse liefern.<sup>[25, 168, 169]</sup>

*Molecular Simulations* zu Protein-PEG-Interaktionen sind ebenfalls beschrieben, beziehen sich aber auf Wechselwirkungen von Proteinen mit langkettigen *Polyethylenglycoleinheiten*.<sup>[92]</sup> Diese Ergebnisse sind nur bedingt auf *Oligoethylenglycole* übertragbar.

Vergleichsweise wenig ist bekannt zur theoretischen Modellierung der Prozesse in und auf angeordneten Monoschichten selbst. Besonders interessant wäre es in diesem Zusammenhang, eine Aussage zur „Schichtkonstitution“ treffen zu können. Insbesondere die Wechselwirkung auf dem Monolayer installierter Rezeptoreinheiten mit dem SAM-Grundgerüst müßte untersucht werden. Es sind durchaus Interaktionen von saccharidischen, Polyhydroxy-terminierten Einheiten mit dem hochpolaren Ethylenglycol-Grundkörper der Schicht zu vermuten. Ein „back-folding“ würde die Konformation der exponierten Rezeptormoleküle auf der Oberfläche entscheidend beeinflussen und damit die Aussage über die zu untersuchende Wechselwirkung zwischen dem betreffenden Rezeptor und Liganden in der Analytphase beeinträchtigen.

Um allgemeine Informationen zu Wechselwirkungen dieser Art treffen zu können, sind Ansätze des *Molecular Modelling* geeignet. Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine Veröffentlichungen zu dieser Problemstellung vor. Da allerdings die notwendigen Vorarbeiten zur Definition des gesamten Setups sehr zeitaufwendig sind und die vorliegende Dissertation einen eindeutig synthetischen Schwerpunkt hat, wurde auf Untersuchungen in diesem Zusammenhang verzichtet.

Erst Anfang 2005 veröffentlichten LATOUR *et al.* MD-Simulationen von Peptid-Oberflächen-Interaktionen.<sup>[170]</sup>

## 3.3 1,3-dipolare Cycloaddition

Seit Beginn des neuerlichen Interesses an der durch SHARPLESS als „Click-Chemistry“ titulierten Cycloaddition von terminalen Alkinen mit Aziden sind vielfältige Anwendungsbeispiele publiziert. Einen guten Übersichtsartikel über den wachsenden Einfluß

der „Click-Chemie“ auf den großen Bereich der Wirkstoffforschung veröffentlichten KOLB *et al.* 2003. Sie wiesen neben dem hohen Potential der Reaktion als modularem Ansatz für eine Verknüpfungsreaktion auf die interessanten intrinsischen Eigenschaften der gebildeten Triazole hin. Diese wurden mit den in 1,2,3-Triazolen vorhandenen Dipolinteraktionen und davon ausgehenden Wasserstoffbrückenbindungen assoziiert.<sup>[171]</sup>

Die Gruppe um WONG hat 2002 die Synthese von *Zucker-Arrays* in Mikrotiterplatten beschrieben. Es wurden in mikromolaren Ansätzen verschiedene Mono- und Oligosaccharide mit einem Azidterminus versehen. Diese konnten dann erfolgreich an Tetradecanketten gekuppelt werden, die nichtkovalent auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten adhärten.<sup>[172]</sup>

MELDAL *et al.* haben ebenfalls im Jahr 2002 die Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition von terminalen Alkinen und Aziden erfolgreich auf die *festphasenunterstützte Synthese* von Peptiden übertragen.<sup>[108]</sup>

SANTOYO-GONZÁLEZ *et al.* haben mittels „Click-Chemie“ unter Verwendung löslicher Kupfer(I)-Katalysatoren und Mikrowellenaktivierung *multivalente Neoglykokonjugate* (Abbildung 3.7) in Ausbeuten von etwa 80 % hergestellt.<sup>[173]</sup>

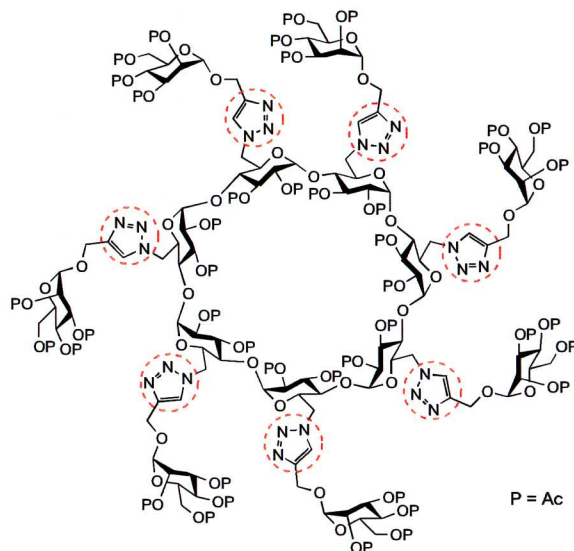


Abbildung 3.7: Multivalente Neoglykokonjugate durch 1,3-dipolare Cycloadditionen

Vollständig mittels 1,3-dipolaren Cycloadditionen aufgebaute *Dendrimere* beschreiben FRÉCHET und SHARPLESS.<sup>[174]</sup>

Auch *Fluoreszenzmarkierung* für DNA-Sequenzierung wurde mittels „Click-Chemie“ beschrieben. Die Arbeitsgruppe um JU hat 2002 über Oligonukleotide berichtet, die durch Anknüpfung von Rhodamingruppen fluoreszierende Eigenschaften aufwiesen.<sup>[175]</sup>

## 4 Aufgabenstellung

Um die Wechselwirkungen zwischen Zellen oder die Interaktion der Glycocalix mit Proteinen oder ganzen (Fremd)zelloberflächen zu simulieren, sollten selbstangeordnete Monoschichten aufgebaut werden. Diese sind besonders gut geeignet, um den Aspekt der Multivalenz in einem zweidimensionalen, künstlichen System möglichst realitätsnah zu adressieren.

Es sollte sich um SAMs auf Gold handeln, weswegen sich eine Schwefelgruppe am Terminus eines kettenförmigen Moleküls zu befinden hatte. Die Platzhaltereinheit (Spacer) sollte von variabler Länge sein und an ihrem Ende hatte eine biologisch relevante Kopfgruppe modular anknüpfbar zu sein. Diese variable Biofunktionalität war ebenfalls aufzubauen und ggfs. bezüglich zu testender Proteine strukturell zu optimieren.

Im Rahmen einer Kooperation mit PD Dr. A. TERFORT, Uni Hamburg, sollten diese Oberflächen charakterisiert werden, und die Wechselwirkung mit verschiedenen Lektinen sollte möglichst via SPR untersucht werden.

## 5 Ergebnisse

Zunächst ging es darum, Bausteine zu synthetisieren, die passend und geeignet waren, in Form von Monoschichten auf Gold immobilisiert zu werden. Es wurde eine konvergente Synthese angestrebt, an deren Ende das Zusammenfügen der zwei Baueinheiten *lineare Platzhaltereinheit* (Spacer) sowie *bioaktive Kopfgruppe* durch einen *Linker* stehen sollte. Zur schematischen Erklärung des prinzipiellen Aufbaus kann Abbildung 5.1 dienen:

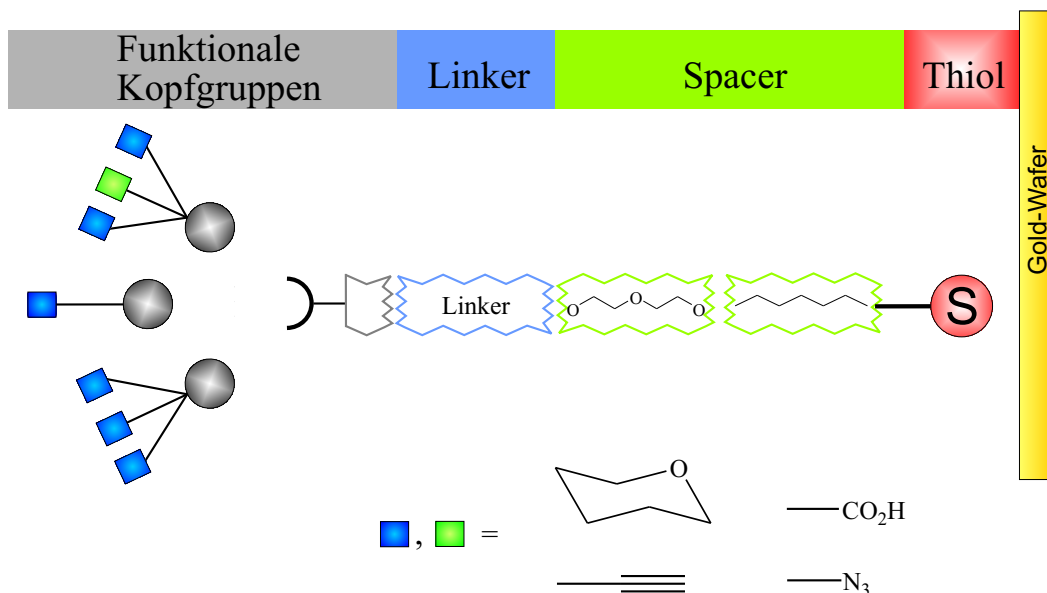


Abbildung 5.1: Schematischer Aufbau der Glyco-SAMs nach modularer Bauweise. An die hoch Gold-affine Schwefelfunktionalität schließt eine Alkylkette an, die im Prozeß der „Self Assembly“ für die Ausbildung der hochgeordneten Schicht zuständig ist. Daran ist unmittelbar ein Abschnitt zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen zwischen Analyt und Gold-Wafer, bestehend aus Ethylenglycoleinheiten, angeschlossen. Über eine geeignete Verlängerungseinheit wird ein Verknüpfungspunkt installiert, an den die eigentliche biologisch relevante Rezeptoreinheit gekuppelt werden kann. Diese kann von variablem Aufbau sein.

Die Spacereinheit mit Schwefelterminus mußte auf der anderen Seite des Moleküls eine geeignete Verknüpfungsmöglichkeit für diverse Funktionalitäten besitzen. Hier wurden zwei grundsätzlich verschiedene Wege beschrrieben: Zu Beginn der Arbeit galt



es, mittels *Amidbindung* die Anbindung zu realisieren. Einer Seite des langkettigen Spacerbausteins wurde daher eine Carbonsäuregruppe zugeordnet, während die terminalen Kopfgruppen aminofunktionalisiert sein sollten, um unter Standardbedingungen der Peptidsynthese gekuppelt werden zu können. Nachdem dieses System etabliert war, konnte auch ein 1,4-*Triazol* als Linkereinheit realisiert werden.

Die biologisch aktive Kopfgruppe sollte wahlweise *monovalente* oder *multivalente* Einheiten tragen. Es sollten auch *gemischte*, *dendritische* Strukturen aufgebaut werden, um beispielsweise eine *Fluoreszenzmarkierung* anbringen zu können. Darüber hinaus sollten Variationen in der *Spacerlänge* sowie der *Dichte* der auf der SAM-Oberfläche exponierten rezeptorischen Einheiten möglich sein. Hierfür mußten passende, biologisch inerte „Verdünnungsmoleküle“ synthetisiert werden.

Teile der erzielten Ergebnisse sind bereits 2004 im *European Journal of Organic Chemistry* veröffentlicht.<sup>[176]</sup>

## 5.1 Spacer-Bausteine

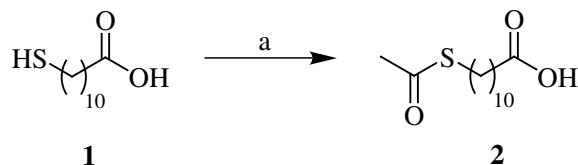
Alle Moleküle, die zur Ausbildung von SAMs synthetisiert wurden, benötigten zur Immobilisierung auf der Goldoberfläche eine terminale Schwefelfunktion. Hierfür bietet sich ein freies Thiol oder, weil dies schnell zum Disulfid oxidiert wird, ein geschütztes Thiol in Form eines stabilen Esters an. Es wurden durchgehend Thioessigsäureester synthetisiert. Sie sind stabil, und aus ihnen kann bei Bedarf leicht durch Verseifung ein Thiol gebildet werden. Siehe hierzu Kapitel 5.1.4

Es wurden zwei verschiedene Routen in der Spacersynthese besprochen: Einen schnellen Zugang zu Verbindungen der gewünschten Art bot  $\omega$ -Thioundecansäure. Um einen Abschnitt zur Unterdrückung unerwünschter, unspezifischer Wechselwirkungen auf dem SAM einzuführen, mußte eine Oligoethylenglycoleinheit installiert werden, was den zweiten Synthesepfad bildete.

### 5.1.1 Synthese der C<sub>11</sub>-Alkyleinheit

Die kommerziell erhältliche  $\omega$ -Thioundecansäure **1** wurde zunächst als Thioacetat geschützt (Schema 5.1). Dies war leicht und mit quantitativer Ausbeute durch Zink in Verbindung mit Eisessig und Acetylchlorid möglich und führte zu besseren Ergebnissen als eine nukleophile Substitutionsreaktion von 11-Bromundecansäure mit Kaliumthioacetat. Der erhaltene Thioester konnte ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden, was die in der Literatur beschriebene z. T. aufwendige chromatographische

Trennung überflüssig machte.<sup>[65]</sup> Die so erhaltene freie Säure **2** konnte im folgenden mit diversen Aminen unter Bildung eines stabilen Amids verbunden werden (Kapitel 5.3).



Schema 5.1: Synthese des thiofunktionalisierten Alkyl-Spacers. Reaktionsbedingungen: a) Zn / AcOH, AcCl, DCM, 0 °C → RT, 1 h, quant.

### 5.1.2 Synthese der C<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>-Einheit

Für biologische Untersuchungen mit SAMs ist es notwendig, die unspezifischen Interaktionen, die viele Biomoleküle und Proteine mit festen Oberflächen ausbilden, wirkungsvoll zu unterbinden. Wie bereits im Kapitel 3.2.3 hervorgehoben, sind Oligoethylenglycol-Ketten ideal für diesen Zweck geeignet. Dazu kann Hexaethylenglycol verwendet werden, das kommerziell in sehr guter Reinheit erhältlich ist.

Es bieten sich verschiedene Strategien an, um diese linearen, hydroxyterminierten Moleküle mit den bioaktiven Kopfgruppen zu verbinden (Abbildung 5.2):

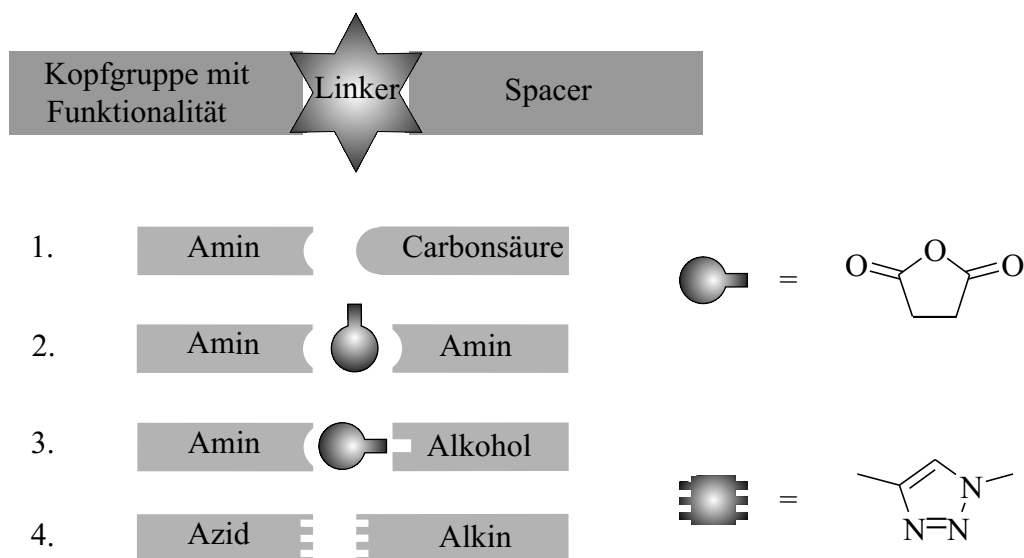


Abbildung 5.2: Strategien zur Struktur einer Verknüpfungseinheit (Linker) zwischen Rezeptorfunktionalität und Platzhaltereinheit.

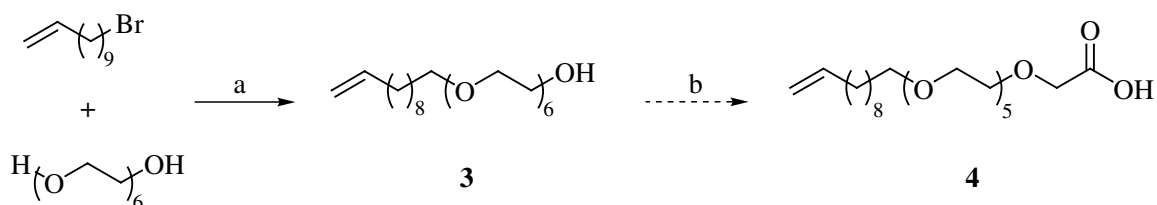
1. Der Spacer trägt eine Carboxylfunktion und wird mit einer Aminofunktion der Kopfgruppe durch eine Peptidbindung gekuppelt.

- Der Spacer trägt eine Aminofunktion, die Kopfgruppe ebenfalls. In diesem Fall wird eine Brücke benötigt. Hier kann eine Dicarbonsäure oder ein cyclisches Anhydrid wertvolle Dienste leisten.

Diese beiden Ansätze lassen ein Netzwerk aus Amidbindungen innerhalb des SAM entstehen, was sich vorteilhaft auf die Stabilität der Monoschichten auswirken kann. Ebenfalls sinnvoll zur Verknüpfung der molekularen Bausteine erscheinen Estergruppen:

- Der Spacer trägt eine Alkoholfunktion und soll mit einer Kopfgruppe verknüpft werden, die eine Aminofunktion enthält. Auch hier wird eine Brücke benötigt, auch hier bietet sich beispielsweise Bernsteinsäureanhydrid an. Dieses cyclische Anhydrid bildet mit dem Spacer einen Ester und mit der Kopfgruppe ein Amid aus.
- Spacer und Kopfgruppe werden in einer Cycloadditionsreaktion gekoppelt. HOUSEMAN und MRKSICH haben dies über eine Diels-Alder-Reaktion realisiert.<sup>[140]</sup> Ebenfalls erfolgversprechend in diesem Zusammenhang ist die 1,3-dipolare Cycloaddition nach HUISGEN / SHARPLESS, da die Synthese der beiden Edukte (Azid und Alkin) zu vielen Umsetzungen chemisch orthogonal ist und keine oder kaum Nebenprodukte gebildet werden.

Für die Vorbereitung der Spacer wurde in einem ersten Ansatz die Bildung der Carbonsäure **4** angestrebt. Hierzu sollte der einfach zu erhaltene, alkentermierte Alkohol **3** oxidiert werden. Die Ausgangsverbindungen, 11-Bromundec-1-en und Hexaethylenglycol (EG<sub>6</sub>), wurden in einer nukleophilen Substitution unter Standardbedingungen in 80 %iger Ausbeute zu **3** gekoppelt. Die Oxidation des Alkohols zur Säure **4** gestaltete sich jedoch wider Erwarten unter einer ganzen Reihe von Oxidationsbedingungen als schwierig (Schema 5.2).



Schema 5.2: Fehlgeschlagene Oxidation der Hydroxyfunktion des C<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>-Spacers. Reaktionsbedingungen: a) NaH, DMF, 0 °C → RT, 15 h, 80 %; b) TEMPO; NaClO<sub>2</sub>; PDC; PCC; IBX, DMSO; NaClO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; CrO<sub>3</sub> / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Es wurden Oxidationen mit TEMPO, PCC, PDC und IBX<sup>[177,178]</sup> erfolglos getestet. Die Umsetzung endete entweder in einer Zersetzung des Startmaterials oder in der Bildung des Aldehyds. Nachdem auch die drastischen Bedingungen des Jones-Reagens<sup>[179]</sup> nicht zum Erfolg führten, wurden keine weiteren Oxidationsversuche unternommen. Stattdessen wurde die eingangs erwähnte zweite Strategie verfolgt.

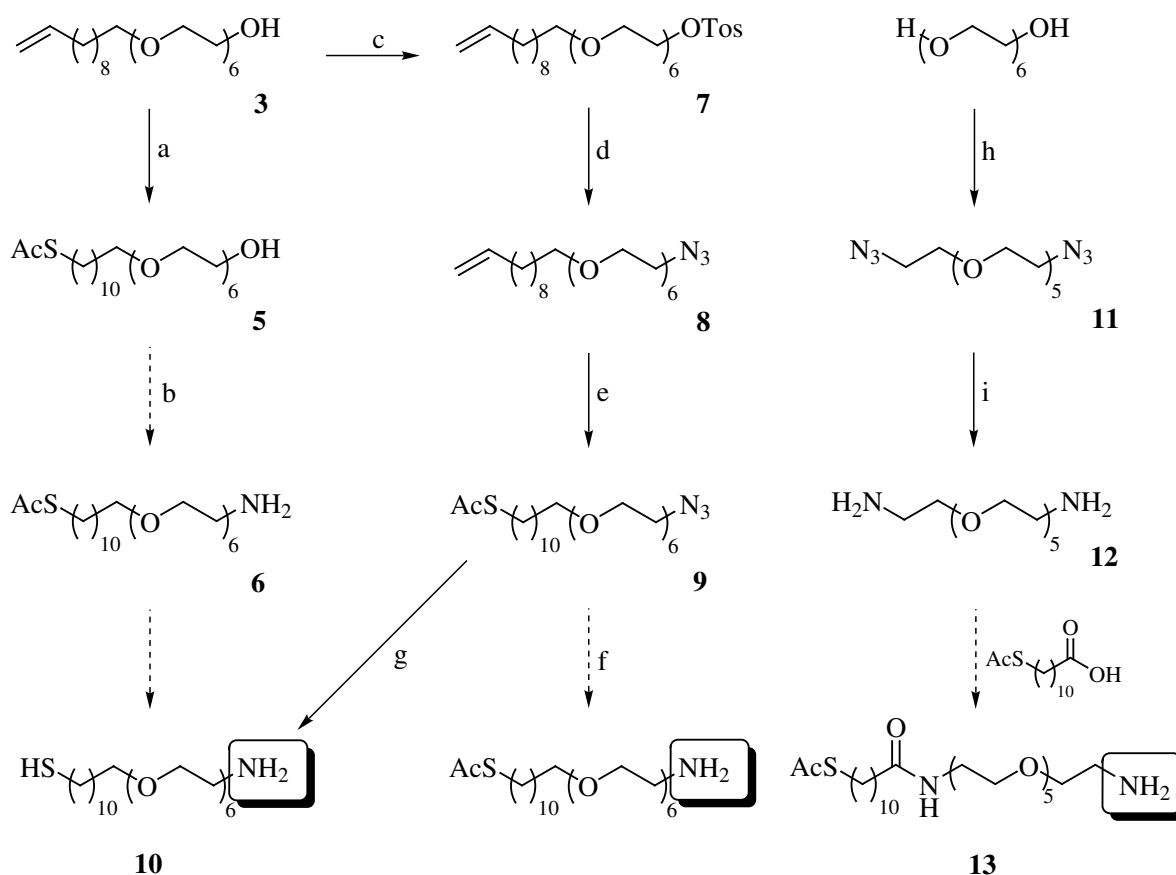
### Amid-Linker

In Anlehnung an einige beschriebene Synthesen wurde eine interne Peptidbindung sowohl zwischen der bioaktiven Kopfgruppe und dem Brückenbaustein auf der einen als auch zwischen dem Spacer und der Brückeneinheit auf der anderen Seite angestrebt. Als Brückenmolekül sollte Bersteinsäureanhydrid dienen. Es ist ein günstiger und für diesen Zweck optimal geeigneter C<sub>4</sub>-Baustein. Um eine direkte Route zum vollständigen Spacer zu etablieren, war zunächst der Weg vom Alkohol **3** zum Amin **10** geplant (Schema 5.3).

Der alkylterminierte Alkohol **3** wurde erfolgreich in einer radikalischen Addition mit AIBN und unter UV-Bestrahlung mit einer Quecksilberdampflampe modifiziert. Dies führte zum Thioacetat **5** in sehr guter Ausbeute von 96 %.<sup>[89]</sup> Die Hydroxyfunktion sollte schließlich in einer Eintopf-Sequenz aus Appelreaktion, nukleophiler Substitution und Staudingerreduktion über ein intermediäres Halogenid in das Amin **6** überführt werden.<sup>[180]</sup> Mehrere Versuche mit CCl<sub>4</sub> oder CCl<sub>3</sub>Br ergaben jedoch lediglich das Halogenid, was unter S<sub>N</sub>2-Standardbedingungen mit Natriumhydrid in DMF nicht durch ein Azid substituiert werden konnte. Es sind auch Mitsunobu-Staudinger-Protokolle beschrieben, die jedoch nicht zum gewünschten Erfolg bei befriedigender Ausbeute führten.<sup>[181]</sup> Von weiteren Versuchen zur Mitsunobu-Reaktionen mit Stickstoffwasserstoffsäure als nukleophilem Agens wurde zugunsten einer alternativen Route abgesehen.

Um die Azidfunktion doch noch über eine nukleophile Substitutionsreaktion einführen zu können, wurde ein Tosylat als Fluchtgruppe gewählt. Die meisten älteren Synthesen benutzen Toluolsulfonsäurechlorid und Pyridin als Lösungsmittel und Base zur Konvertierung der freien Hydroxygruppe zum Tosylat. Durch die Verwendung von 1,4-Diazabicyclo-[2.2.0]-octan (DABCO) in Ethylacetat als Lösungsmittel lassen sich jedoch sehr gute Ausbeuten ohne die Verwendung des giftigen Pyridins erzielen. Das entstehende Hydrochlorid des DABCO läßt sich bequem durch Filtration dem Reaktionsgemisch entziehen.<sup>[182]</sup> Nach dem Protokoll nach HARTUNG und HÜNIG konnte die Toluolsulfonsäuregruppe mit 82 % Ausbeute unter Erhalt des Alkens **7** eingeführt werden. Nukleophile Substitution mit Natriumazid ergab dann in quantitativer Ausbeute das Azid **8**. Dies wurde dann in bewährter Weise radikalchemisch mit

Thioessigsäure zum Thioacetat **9** umgesetzt. In dieser vierstufigen Synthesesequenz wurde eine sehr gute Gesamtausbeute von 56 % erreicht.



Schema 5.3: Strategien zur Synthese des EG<sub>6</sub>-Spacer-Amins. Reaktionsbedingungen: a) AcSH, AIBN, THF,  $h\nu$ , RT, 3 h, 97 %; b) 1. PPh<sub>3</sub>, CCl<sub>4</sub> / DMF, 90 °C oder CCl<sub>3</sub>Br, PhMe,  $\uparrow$ , 2. NaN<sub>3</sub>, DMF; c) TosCl, DABCO, EE, 0 °C → RT, 1.5 h, 82 %; d) NaN<sub>3</sub>, TBAI, DMF, 70 °C, 2 h, 97 %; e) AcSH, AIBN, THF,  $h\nu$ , RT, 3.5 h, 88 %; f) PPh<sub>3</sub>, THF / H<sub>2</sub>O; P(OMe)<sub>3</sub>, THF / H<sub>2</sub>O; g) LAH, Et<sub>2</sub>O, 0 °C → RT, 1 h; h) 1. TosCl, DABCO, EE, 0 °C → RT, 1.5 h, 2. NaN<sub>3</sub>, TBAI, DMF, 70 °C, 15 h, 55 % über 2 Stufen; i) H<sub>2</sub>, Pd-C, MeOH, RT, 15 h, quant.

Diese bifunktionalisierte Verbindung **9** sollte nun zum Amin **10** reduziert werden. Hierzu konnte wegen der Anwesenheit von Schwefel im Molekül die an anderer Stelle sehr erfolgreiche Hydrierung mit Wasserstoff an Palladium/Kohle nicht angewandt werden. Auch eine Reduktion mit Triphenylphosphan und Wasser oder unter modifizierten Staudinger-Bedingungen mit Phosphorigsäuretriethylester<sup>[183]</sup> schlug fehl, da die Umsetzung stets auf der Stufe des Iminophosphorans endete.

Stattdessen wurde eine Hydrid-Reduktion durchgeführt.<sup>[184]</sup> Die stark reduktiven Bedingungen mit Lithiumaluminiumhydrid in Et<sub>2</sub>O waren erfolgreich und führten zum freien Amin **10**, das die bereits entschützte Thiolfunktion trug. Bei diesem

Amin handelt es sich allerdings um eine Substanz, die sehr polar ist und zugleich stark amphiphilen Charakter besitzt, da eine lange unpolare Alkylkette mit einem ausgesprochen polaren Terminus auf der anderen Seite des Moleküls verbunden ist. Die Aufreinigung dieser Substanzen hat sich wegen der detergenten Eigenschaften sowohl durch säulenchromatographische Trennung an Kieselgel als auch mittels HPLC auf RP<sub>18</sub>- und RP<sub>8</sub>-Medien als außerordentlich schwierig und aufwendig erwiesen. Es konnte kein spektroskopisch reines Produkt isoliert werden. Allerdings bewiesen die vorhandenen Daten (NMR, IR, EI/CI) die erfolgte Umsetzung; sowohl die Existenz der charakteristischen Banden für Thiol und Amin als auch das Fehlen der entsprechenden Signale für Azid und Thioacetat konnte gezeigt werden.

Als weitere Option in dieser Syntheseroute sollte die Schwefel-funktionalisierte Carbonsäure **2** als Alkylpart dienen. Zunächst wurde das Hexaethylenglycol nach HARTUNG/HÜNIG in das Ditosylat konvertiert. Anschließende nukleophile Substitution ergab das Diazid **11** mit 55 % Ausbeute über zwei Stufen. Hydrierung durch heterogene Katalyse an Pd-C lieferte schließlich quantitativ das symmetrische Diamin **12**. Dieses konnte allerdings in einer ganzen Reihe von Peptidbildungsreaktionen mit unterschiedlichen Aktivierungsreagenzien nicht zum gewünschten Amid **13** umgesetzt werden. Auch Experimente mit verschiedenen Verdünnungsgraden und verminderter Reaktionstemperatur lieferten stets nur das zweifache Kopplungsprodukt mit der Säure **2**.

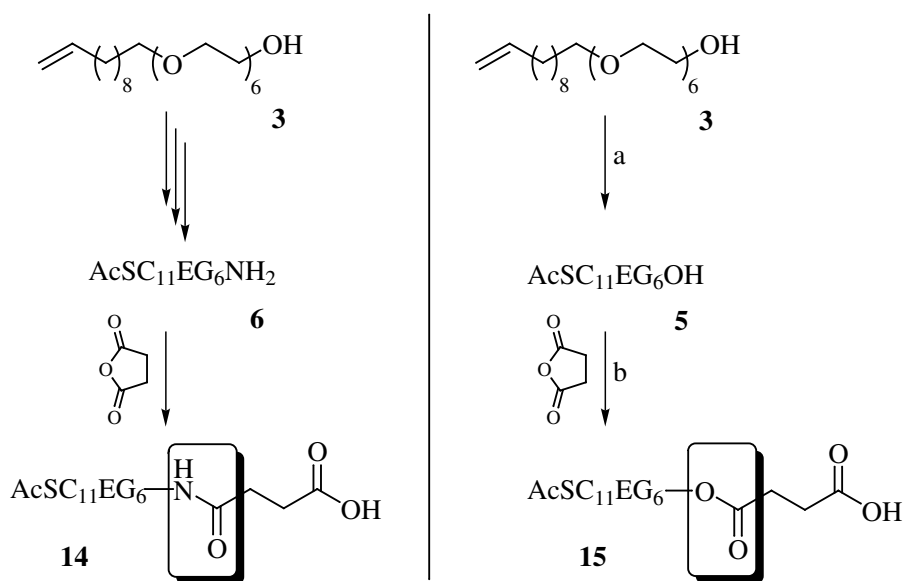
Aufgrund der Schwierigkeiten im Zusammenhang mit der Substanzisolierung und doppelter Amidbildung wurde schließlich das dritte Konzept verfolgt (vgl. Abbildung 5.2 auf Seite 50). Statt desamins **6**, das ursprünglich mit Bernsteinsäureanhydrid zu dem C<sub>4</sub>-elongierten Baustein **14** mit Carbonsäureterminus und internem Amid verlängert werden sollte, wurde jetzt ein interner Ester angestrebt (Schema 5.4). Die Esterverknüpfung in der Zielverbindung **15** ist unter physiologischen und SPR-Bedingungen hinreichend inert.

### Ester-Linker

Das leicht zugängliche Alken **3** konnte wieder als Startmaterial dienen. Nach Einführung der Thioacetat-Funktion wurde der Alkohol **5** verestert. Dies konnte sehr bequem und in quantitativer Ausbeute mit Bernsteinsäureanhydrid in Anwesenheit der Stickstoffbase DIPEA in Dichlormethan unter Rückfluß bewerkstelligt werden. Nach Aufarbeitung wurde die Säure **15** als farbloser Feststoff erhalten, der ohne weitere Reinigung eingesetzt werden konnte (Schema 5.4).

Auf diese Weise wurde statt der ursprünglichen Planung am Alkohol eine C<sub>4</sub>-Erweiterung durch Veresterung mit Bernsteinsäureanhydrid erfolgreich durchgeführt.

Die Nutzung eines Esters anstelle eines Amids bot verschiedene Vorteile. Auf der einen Seite benötigte diese Sequenz deutlich weniger Syntheseaufwand. Der Alkohol **5** kann als Ausgangsstoff dienen und wird in nur einer Stufe aus dem Alken **3** quantitativ aufgebaut. Das Amin **6** hingegen war nur über eine vierstufige Sequenz zu erhalten. Darüber hinaus konnten die hochgradig aufwendigen Reinigungsschritte für die Isolierung von **6** umgangen werden. Die größere Verseifungsstabilität des hypothetischen Amids **14** ist nicht zwingend erforderlich, da SAMs in wässrigem Milieu per SPR untersucht werden.



Schema 5.4: Vergleich: Internes Amid *vs.* interner Ester. Reaktionsbedingungen: a) AcSH, AIBN, THF, *hν*, RT, 3 h, 97%; b) Bernsteinsäureanhydrid, DIPEA, DCM, 11, 4 h, 97%.

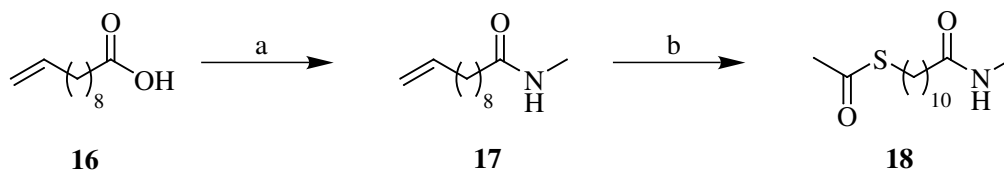
### 5.1.3 Verdünnungs-Spacereinheiten

Da die vollständigen Bausteine für die Selbstanordnung auf der Schicht z. T. sterisch anspruchsvolle, dendritische Einheiten enthalten sollten, war die Generierung von Platzhaltermolekülen notwendig. Diese unfunctionalisierten Spacer sollten als „Verdünnungsmoleküle“ im Immobilisierungsschritt dienen und die wohlgeordnete Ausbildung der Schicht bei gleichzeitiger Beladung mit biologisch aktiven Kopfgruppen ermöglichen (siehe Abbildung 2.6).

Die erforderlichen Moleküle müssen in ihrer Struktur Zucker-funktionalisierten Bausteinen sehr ähnlich sein und bei den Bedingungen der Fixierung ähnliche Eigenschaften zeigen, zugleich jedoch keine biorelevanten Reaktivitäten besitzen. Es wurden in diesem Sinne für die beiden Spacermoleküle **2** und **15** Analoga synthetisiert.

### C<sub>11</sub>-Alkyleinheit

Anknüpfend an die bewährte Methode zur Einführung der terminalen Thioacetatfunktion wurde die kommerziell erhältliche 11-Undecensäure **16** als Startmaterial verwandt. Daraus wurde zunächst mit Methylamin das Amid **17** gebildet, das nach Aktivierung der Carbonsäure als gemischtes Anhydrid mit Isobutylchlorformiat (IBCF) in quantitativer Ausbeute entsteht. Photoinduzierte Addition von Thioessigsäure an die terminale Doppelbindung ergab schließlich in guten 86 % den gewünschten C<sub>11</sub>-Baustein **18** mit biologisch inaktivem Methylamidterminus (Schema 5.5). Diese Sequenz zum Aufbau des Zielbausteins war notwendig, um eine eventuelle Entschützung der Thioolfunktion durch Acylgruppenwanderung im Schritt der Amidbindung zu vermeiden.



Schema 5.5: Synthese des C<sub>11</sub>-Verdünnungsmoleküls. Reaktionsbedingungen: a) NH<sub>2</sub>Me, NPr<sub>3</sub>, IBCF, DMF, 0 °C → RT, 1.5 h, quant.; b) AcSH, AIBN, THF, *hν*, RT, 3 h, 86 %.

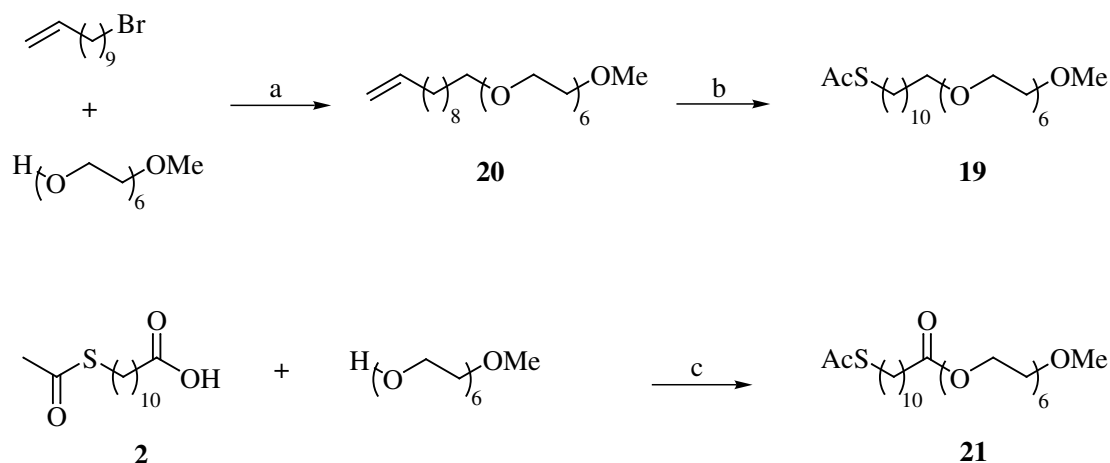
### C<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>-Einheit

Als Verdünnungsmolekül für den EG<sub>6</sub>-tragenden Spacer kann grundsätzlich der freie Alkohol **5** verwandt werden. Die terminale Hydroxylgruppe wird keinen entscheidenden Einfluß auf die Adhäsion von Liganden auf der SAM-Oberfläche ausüben. Dennoch wurde die Bildung eines weniger polaren Bausteins angestrebt. Als solcher kann ein Spacer mit terminalem Methylether angesehen werden.

Parallel zur oben beschriebenen Synthese (Schema 5.3) wurde unter Verwendung des Monomethylethers von Hexaethylenglycol der vollständige Baustein **19** aufgebaut. Unter Williamson-Bedingungen konnte die Alkoholfunktion des Ethylenglycols mit Bromundec-11-en verethert werden und lieferte in 92 % das Alken **20**.<sup>[185]</sup> Die radikalische Addition an die terminale Doppelbindung ergab den gewünschten Methylether **19** mit 87 % Gesamtausbeute über zwei Stufen (Schema 5.6).

Darüber hinaus wurde die schnell zugängliche Carbonsäure **2** mit der freien Hydroxygruppe des EG<sub>6</sub>-Monomethylesters erfolgreich gekuppelt. Unter Standardbedingungen mit DCC und katalytischen Mengen DMAP konnte so der Ester **21** als zweites potentiell Verdünnungsmolekül in 75 % Ausbeute erhalten werden (Schema 5.6).





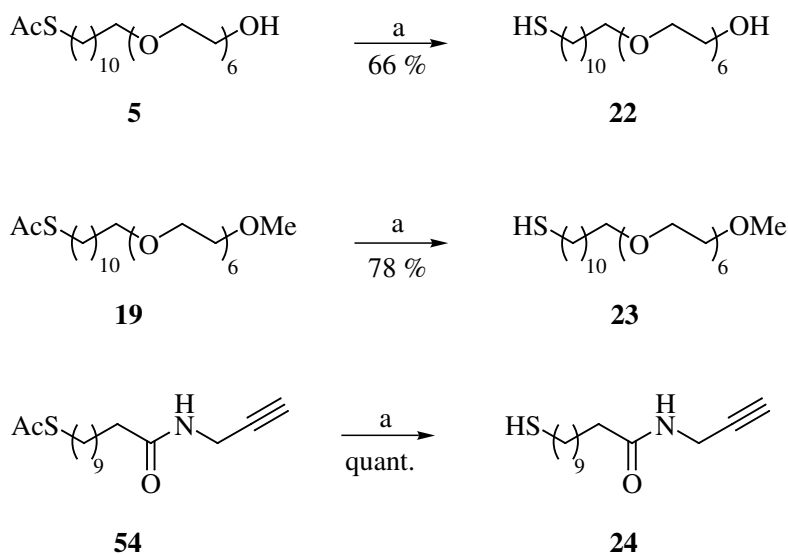
Schema 5.6: Synthesen der  $\text{C}_{11}\text{EG}_6$ -Verdünnungsmoleküle. Reaktionsbedingungen: a) NaH, DMF,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 15 h, 92%; b) AcSH, AIBN, THF,  $h\nu$ , RT, 3 h, 95%; c) DCC, DMAP, DCM,  $-20^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 15 h, 75%.

#### 5.1.4 Entschützung der Thioacetate

Die Entschützung der Thioacetate zu den freien Thiolen funktionierte nicht in allen untersuchten Fällen reibungslos. Die Anwendung von Natriummethanolat in Methanol führte zwar stets zur Abspaltung der Acetatfunktion, was dünnschichtchromatographisch zu verfolgen war. Allerdings wurden im Prozeß der Aufarbeitung dieser Zemplén-Reaktion stets die Disulfide gebildet. Dies war entgegen der Beschreibung in der Literatur auch in Gegenwart von lediglich katalytischen Mengen NaOMe der Fall.<sup>[156]</sup> Die selektive Entschützung mittels Titan(IV)-chlorid / Zink ergab ebenfalls keine befriedigenden und reproduzierbaren Ergebnisse.<sup>[186]</sup>

Kontinuierlich gute bis sehr gute Ergebnisse gab die Reduktion mit Zink in Eisessig im Anschluß an Zemplén-Bedingungen.<sup>[187]</sup> Nach der Verseifung des Thioesters mit katalytischen Mengen Natriummethanolat in Methanol wurde nicht aufgearbeitet, sondern Eisessig zugegeben und mit Zinkpulver versetzt. Nach kurzem Rühren konnte abfiltriert werden. Auf diese Weise konnten verschiedene Spacermoleküle in das freie Thiol überführt werden (Schema 5.7).

Nach wie vor problematisch war hier z. T. die Chromatographie an Kieselgel oder auch Reinigung mittels HPLC. In den bereits erwähnten tensidischen Stoffeigenschaften lagen Ausbeuteverluste begründet. So konnte lediglich das  $\text{EG}_6$ -freie Alkin **24** (siehe Kapitel 5.4.1 auf Seite 71) in quantitativer Ausbeute erhalten werden. Das besonders polare Thiol **22** mit zusätzlicher freier Hydroxygruppe konnte nur in moderaten 66%, der Methylether **23**<sup>[89]</sup> in guten 78% Ausbeute erhalten werden.



Schema 5.7: Entschützung der Thiole. Reaktionsbedingungen: a) 1. NaOMe, MeOH, RT, 1-15 h, 2. Zn, AcOH, RT, 30 min.

## 5.2 Glyco-Kopfgruppen

Um Zucker-modifizierte Bausteine zum Aufbau von SAMs zu generieren, wurden aus dem weiten Feld biologisch interessanter Kohlenhydrate D-Mannose und L-Fucose ausgewählt. Zum einen resultiert dies aus dem speziellen Interesse für Mannose-spezifische Proteine wie Concanavalin A<sup>[57]</sup> und bakterielle Typ 1-Fimbrien.<sup>[188-191]</sup> Darüber hinaus ist Fucose eine wichtige Komponente der Glycocalix und stellt als Teil der Sialyl Lewis X-Struktur ein wichtiges Zell-Adhäsionsmolekül für CEACAM-1-Proteine von humanen Granulozyten dar.<sup>[192,193]</sup> Viele Krankheiten werden mit Fucose-vermittelter Zellkommunikation in Verbindung gebracht. Nicht zuletzt ist es ein Zucker mit anspruchsvoller Chemie, da die glycosidische Bindung der Fucose relativ labil ist und eine Herausforderung in sythetischer Hinsicht darstellt.

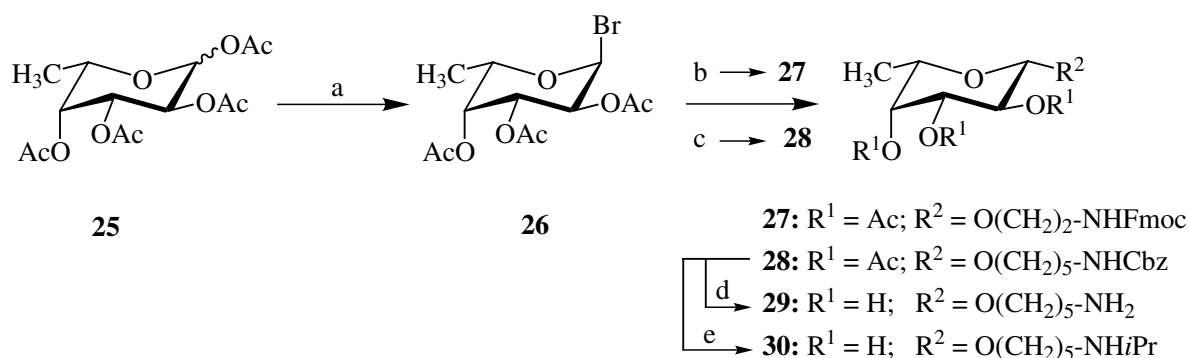
### 5.2.1 Synthese der linearen Glycoside

Die biologisch aktiven Kopfgruppen sollten Amino-funktionalisiert vorliegen, um unter Standardbedingungen der Peptidsynthese an die Carbonsäurefunktion der Spacerbausteine gebunden werden zu können.

#### Fucoside

Hierzu wurde zunächst Fucosetetraacetat **25** über das Fucosylbromid **26** in das Fmoc-geschützte 2-Aminoethyl- $\beta$ -L-Fucosid **27** überführt. Da nur verhältnismäßig geringe Ausbeuten von ca. 20% erzielt wurden, wurde auf eine literaturbeschriebene Synthese

zurückgegriffen.<sup>[140]</sup> Durch den Wechsel der Aminoschutzgruppe von 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) zu Benzyloxycarbonyl (Cbz) und ein geändertes Glycosylierungsprotokoll wurde die Ausbeute deutlich gesteigert. Das Fucosylbromid **26** konnte so mit Cbz-maskiertem 5-Aminopentanol unter Helferich-Bedingungen in guten 65 % zum 5-Aminopentyl- $\beta$ -L-Fucosid **28** umgesetzt werden (Schema 5.8). Das geschützte Aminopentanol wurde im wässrigen Medium aus 5-Aminopentanol und Cbz-Cl im schwach basischen Milieu einer Natriumhydrogencarbonatlösung mit etwa 70 % Ausbeute erhalten.



Schema 5.8: Synthese des monovalenten Aminofucosids. Reaktionsbedingungen: a) HBr/HOAc (33 %), DCM, 0 °C  $\rightarrow$  RT, 3 h, quant.; b) HO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHFmoc, Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DCM, RT, 4 h, 20%; c) HO(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NHCbz, NO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> / Toluol (1:1), Hg(CN)<sub>2</sub>, RT, 65%; d) 1. MeOH, NaOMe, RT, 3 h, 2. MeOH, H<sub>2</sub>, Pd-C, 4 h, 70 % über 2 Stufen; e) 1. MeOH, NaOMe, RT, 3 h, 2. MeOH, Aceton, H<sub>2</sub>, Pd-C, 3 h, 90 %.

Um das vollständig entschützte Derivat **29** zu erhalten, mußte zunächst eine Zemplén-Entschützung durchgeführt und im Anschluß daran die Cbz-Gruppe hydrogenolytisch entfernt werden. Dies ist notwendig, um eine O $\rightarrow$ N-Acetylgruppenwanderung auszuschließen. Über zwei Stufen konnte so das freie Aminoglycosid **29** in 70 % erhalten werden.

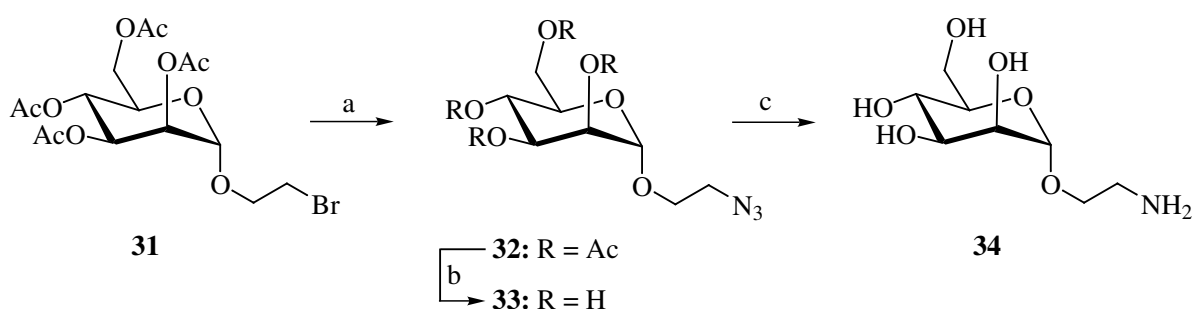
Interessanterweise wurde bei der Wiederholung der Umsetzung ausschließlich N-Isopropyl-(aminopentyl)-fucosid **30** erhalten, was offensichtlich an der Anwesenheit von Aceton lag, das unbeabsichtigt in Spuren im Reaktionsgefäß vorhanden war. Dieses zunächst unerwünschte Produkt erwies sich später als ausgesprochen wertvolle Komponente im Zusammenhang mit Problemen bei der Substanzreinigung.

Die um die Platzhalterabschnitte erweiterten, vollständigen SAM-Bausteine erwiesen sich in der Chromatographie als ähnlich problematisch wie die oben beschriebenen Amine. Durch detergente Eigenschaften des langen kettenförmigen Moleküls mit einem dendritischen, mehrfach hydroxylgruppenterminierten Kohlenhydratende war die

Produktreinigung erheblich erschwert. Die unpolare Komponente der Isopropylgruppe in **30** hat diesen Effekt deutlich reduziert.

### Mannoside

In der Reihe der Mannoside wurde das bekannte Bromethylmannosid **31** in das geschützte Azidderivat **32** unter PTC-Bedingungen überführt und anschließend zur OH-freien Verbindung **33** entschützt.<sup>[194,195]</sup> Die Reduktion des Azids zum Amin erfolgte hydrogenolytisch an Pd-C und ergab in guter Ausbeute das gewünschte, vollständig entschützte  $\alpha$ -Aminoethylmannosid **34** (Schema 5.9).



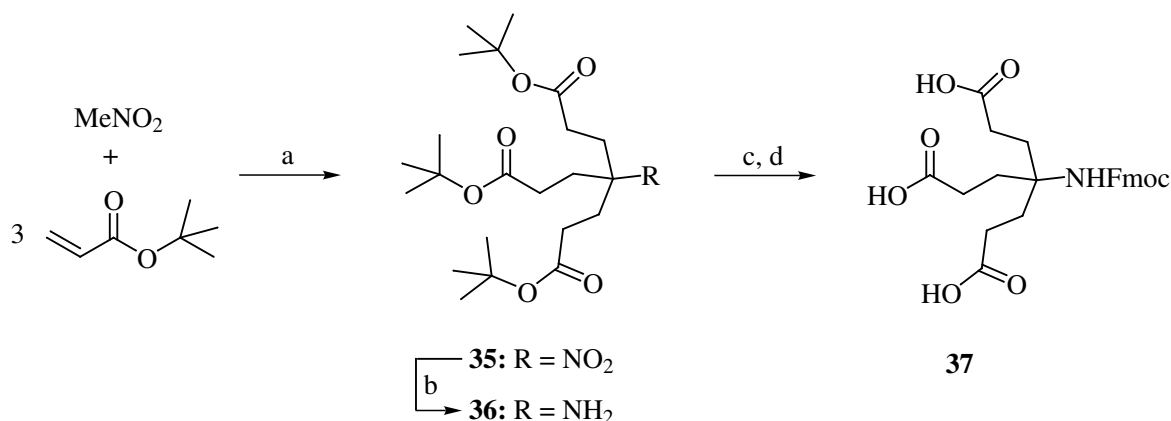
Schema 5.9: Synthese des monomeren Aminomannosids. Reaktionsbedingungen: a)  $\text{NaN}_3$ , DMF,  $\text{Bu}_4\text{NBr}$ , RT, 12 h, 89 %; b) MeOH, NaOMe, RT, 2 h; c) MeOH,  $\text{H}_2$ , Pd-C, 4 h, 90 %.

### 5.2.2 Synthese der dendritischen Glycoside

Nachdem die einfachen unverzweigten Aminoglycoside **29**, **30** und **34** zur Verfügung standen, galt es, dendritische, trivalente Bausteine zu synthetisieren.

Als Grundgerüst solcher Cluster-Glycoside diene stets das gut untersuchte, trifunktionale Dendron **35**.<sup>[196]</sup> Es ist leicht aus den wohlfeilen, kommerziell erhältlichen Ausgangsstoffen Nitromethan und *tert*-Butylacrylsäureester herzustellen. In einer Triton B-vermittelten Reaktion wurde im Multigramm-Maßstab die Nitroverbindung **35** in 70 % Ausbeute hergestellt (Schema 5.10). Diese konnte dann durch Hydrierung im Autoklaven bei 100 bar mit Raney-Nickel in Ethanol in sehr guten Ausbeuten von 90 % in das freie Amin **36** überführt werden.<sup>[197,198]</sup> Anschließend mußte das Amin geschützt werden, da im Folgeschritt die drei Estergruppen verseift werden sollten und die gleichzeitige Anwesenheit von freier Carbonsäure und Aminogruppe zur ungesteuerten Polymerisierung des Produktes bei Raumtemperatur führt. Um eine saure Spaltung des Triesters durchführen zu können, wurde 9-Fluorenylmethylformiat zur

Schützung der Aminofunktion gewählt. Dies erlaubte schließlich die Spaltung der *tert*-Butylester zur Trisäure **37** mit 30%iger Trifluoressigsäure. Hierzu bietet sich Dichlorethan als Lösungsmittel an, da es im Gegensatz zu  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  schwerflüchtiger als TFA ist. Im Schritt der Aufarbeitung kann sich dann durch Entfernung der Lösungsmittel *in vacuo* keine erhöhte Konzentration der Säure bilden. Bei dieser Umsetzung wurden 62% über zwei Stufen erzielt.



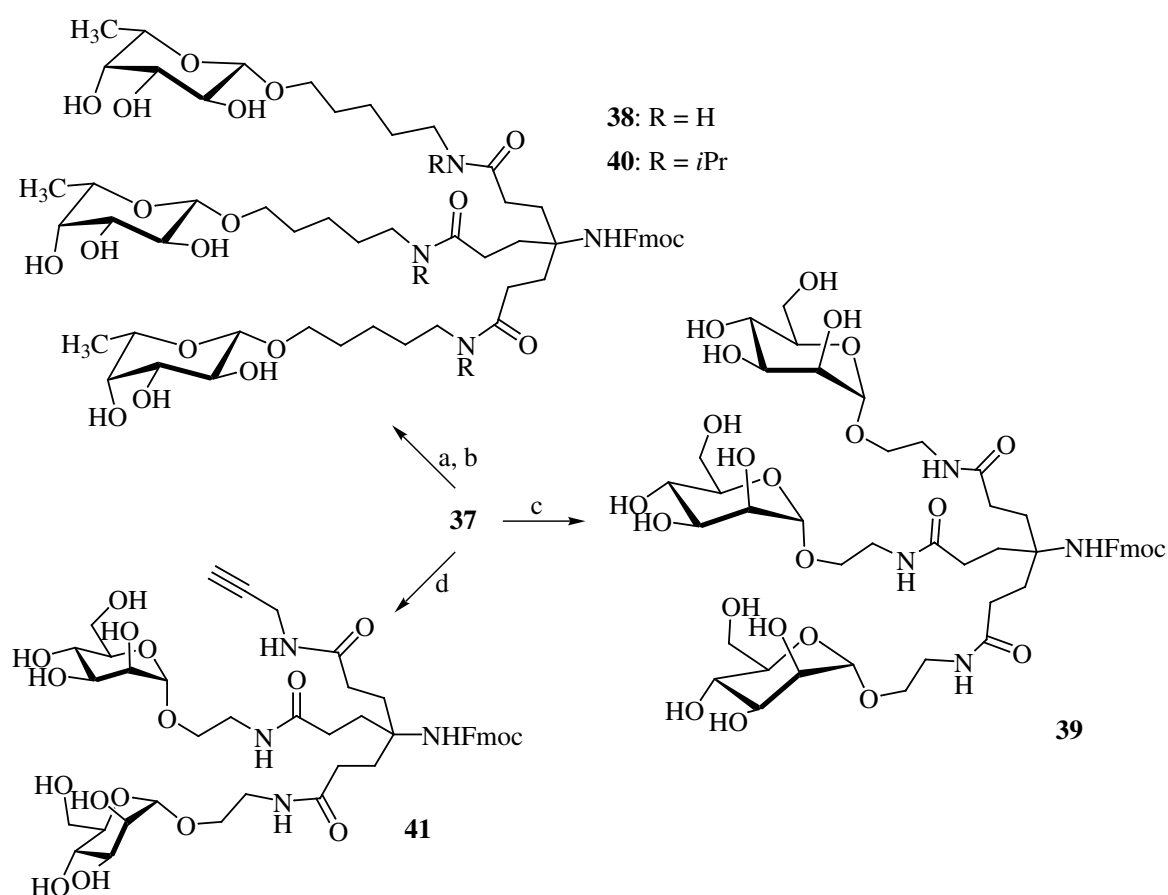
Schema 5.10: Synthese der dendritischen Grundstruktur. Reaktionsbedingungen: a) Triton B,  $70^\circ\text{C}$ , DME, 70%; b)  $\text{RaNi}$ , 100 bar  $\text{H}_2$ , EtOH, 3 h,  $35^\circ\text{C}$ , 90%; c) FmocCl, DCE, RT, 3 h; d) TFA, DCE, RT, 1 h, 62% über 2 Stufen.

Der Fmoc-geschützte Baustein **37** konnte nun an jeder der Säurefunktionen mit den primären Aminen **29** und **34** sowie mit dem sekundären Amin **30** gekuppelt werden. Für diese Reaktion standen alle üblichen Varianten der Peptidsynthese, angefangen von Carbodiimiden wie DCC / DIC / EDC-Systemen bis zu Guanidium-Typ Reagenzien wie HATU / HBTU zur Verfügung. Einmal mehr bewies an dieser Stelle das hochreaktive *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU) sein Potential in der Synthese trivalenter Amide. Nur unter Aktivierung durch HATU in Gegenwart von DIPEA in DMF konnten Produkte ohne die unerwünschte Bildung von Fehlstrukturen isoliert werden, in denen nur ein oder zwei Amidbindungen gebildet worden waren.

Es wurden jeweils drei Äquivalente Amin mit einem Äquivalent der Trisäure und 1.05 eq. HATU pro Säuregruppe in wenig DMF gelöst und auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt. Erst danach wurde zum Starten der Reaktion DIPEA langsam zugegeben. Auf diese Weise konnte mit dem Fucosid **29**, das als primäres Amin vorlag, der geschützte trivalente Baustein **38** in moderaten 33% gewonnen werden (Schema 5.11).

Die mäßige Ausbeute ist auf bereits angesprochene Probleme in der Produktreinigung und die säurelabile glycosidische Bindung in den Fucosiden zurückzuführen –

nicht umgesetztes Edukt konnte nicht zurückgewonnen werden. Dagegen wurde das trivalente Mannosid **39** unter analogen Bedingungen mit 54 % Ausbeute gewonnen. Hier war es möglich, präparative HPLC mit einem Acetonitril / Wasser-Gradienten anzuwenden. Enthielt das Laufmittelgemisch 0.1 % TFA, so war die Trennwirkung ausgezeichnet, allerdings führten schon diese moderat sauren Bedingungen im Falle der Fucoside zur Zersetzung. Die dendritischen Fucoside wurden daher ausschließlich mittels Gel-Permeations-Chromatographie an Sephadex-Medien mit Methanol als Eluens aufgereinigt. Entsprechend wurde im Vergleich zum Glycosid **38** bei dem unpolaren sekundären Amin **30** eine bessere Ausbeute von 66 % für den Fmoc-geschützten Baustein **40** erzielt. Dies kann durch bessere Trennwirkung der GPC bei höheren Molekülmassen erklärt werden.



Schema 5.11: Synthese der Glycocluster. Reaktionsbedingungen: a) **30**, HATU, DIPEA, DMF, RT, 3 h, 66 %; b) **29**, HATU, DIPEA, DMF, RT, 3 h, 39 %; c) **34**, HATU, DIPEA, DMF, RT, 3 h, 54 %; d) 1. **34**, HATU, DMF, -25 °C → RT, DIPEA; 2. Propargylamin, 6 h, 35 %.

### 5.2.3 Gemischtfunktionale, dendritische Strukturen

Neben den trimeren, dendritischen Strukturen **38**, **39** und **40** mit jeweils identischen Zuckertermini ist die Möglichkeit zum Einbau unterschiedlicher Zucker-Kopfgruppen wünschenswert. Ist man imstande, verschiedene Kohlenhydrate oder auch andere Funktionalitäten in Clustern dieser Art zu installieren, so hätte man neben der Modifikation in Spacerlänge und Kopfgruppendichte auf der SAM-Oberfläche zudem die Option, durch Variation der Zusammensetzung in der biofunktionalen Ligandeneinheit eine höhere Spezifität zum gewählten Kohlenhydrat-bindenden Rezeptor zu erzielen. Denkbar sind an dieser Stelle nicht nur *gemischte saccharidische Elemente*, sondern auch *geladene Einheiten* oder beispielsweise *Fluoreszenzmarker* (siehe auch Kapitel 5.5).

Es sind verschiedene Wege möglich, um zu gemischten, dendritischen Molekülen zu gelangen. Hier wurde in einem ersten Ansatz der Versuch unternommen, durch die exakte Einhaltung eines Temperaturprofils das Ausmaß der Kupplung von Aminen an die drei gleichwertigen Carbonsäuregruppen des dendritischen Ausgangsbausteins **41** zu steuern (Schema 5.11). Auf diese Weise sollten sich zumindest zwei unterschiedliche Amine, die sich in ihrer Größe signifikant unterscheiden, effektiv und reproduzierbar ankuppeln lassen.

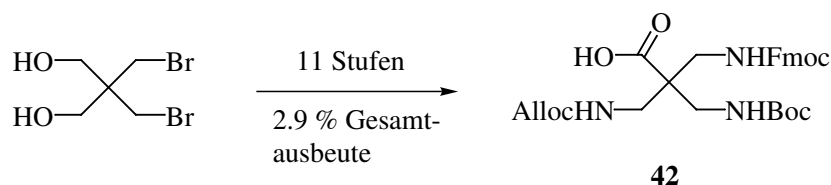
Dazu wurde die Trisäure **37** mit Isobutylchlorformiat (IBCF) in Gegenwart von Tripropylamin als gemischtes Anhydrid aktiviert. Dieser Kupplungsstrategie wurde in diesem Fall der Vorzug gegenüber HATU gegeben, weil dabei mit einem langsameren und daher kontrollierbarerem Reaktionsverlauf gerechnet wurde.

Zuerst wurde die Reaktionsmischung auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt, bevor  $\frac{1}{3}$  Äquivalente Propargylamin (bezogen auf die dreifache Carbonsäure) zugegeben wurden. Es wurde auf RT erwärmt und 30 min gerührt, bevor wieder auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und eine verdünnte Lösung von  $\frac{2}{3}$  Äquivalenten des Aminoethylmannosids zugegeben wurde. Der Reaktionsverlauf ließ sich durch MALDI-Massenspektrometrie verfolgen. Es wurden alle denkbaren Kombinationen der möglichen Reaktionsprodukte beobachtet, ohne daß die gewünschte Steuerung der Synthese zum Baustein **41** erfolgte.

Die vertauschte Reihenfolge der Addition der Amine und die Verwendung von HATU ergab schließlich deutlich bessere Ergebnisse. Wurde bei etwa  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  zuerst das sterisch deutlich anspruchsvollere saccharidische Amin **34** zugegeben und nach kurzer Reaktionszeit das kleine Propargylamin, so konnte eine deutliche Präferenz zugunsten des gewünschten Produkts gefunden werden. Aufreinigung durch präparative RP<sub>18</sub>-HPLC lieferte schließlich den Alkin-funktionalisierten, trivalenten Baustein **41** in 35 % Ausbeute.

Sowohl die Sequenz der Reagenszugabe als auch die Verdünnung spielten eine entscheidende Rolle bei der Amidbildung. Es hat sich gezeigt, daß es am günstigsten war, Säure, Amin und HATU in hoher Verdünnung vorzulegen. Anschließend wurde auf  $-30 - -20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt, dann DIPEA zum Start der Reaktion zugetropft und langsam auf RT erwärmt. Nachdem durch MALDI-MS die vollständige Umsetzung des Mannosylbausteins nachgewiesen wurde, wurde wieder auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und eine verdünnte Lösung aus Propargylamin und DIPEA in DMF zugetropft. Die Aufreinigung dieser Bausteine ließ sich ausschließlich durch HPLC erfolgreich durchführen. Für eine Trennung durch GPC an Sephadex LH-20 oder Biogel P-2 war die Massendifferenz der Startmaterialien und gemischten Produkte zu gering.

Eine andere Option zur Differenzierung chemisch gleicher Termini ist durch eine geschickte Wahl von zueinander orthogonalen Schutzgruppen möglich. Obwohl diese Schutzgruppenstrategien oft sehr aufwendig sind und lange Sequenzen von Schützung–Umschützung–Entschützung erforderlich machen, haben LÖNNBERG *et al.* diesen Weg gewählt.<sup>[179]</sup> Sie haben aus dem günstigen 2,2-Bis(brommethyl)-1,3-propandiol in einer 11-stufigen Synthese den dreifach orthogonal geschützten Baustein **42** in einer Gesamtausbeute von weniger als 3% synthetisiert, um Glycokonjugate daraus aufzubauen (Schema 5.12). Auf einen ähnlichen Syntheseaufwand wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.



Schema 5.12: Orthogonal geschützter  $\alpha,\alpha$ -Bis(aminomethyl)- $\beta$ -alanin-Baustein nach LÖNNBERG *et al.*

### 5.3 Spacer-funktionalisierte Glycomimetika: Bausteine für SAMs

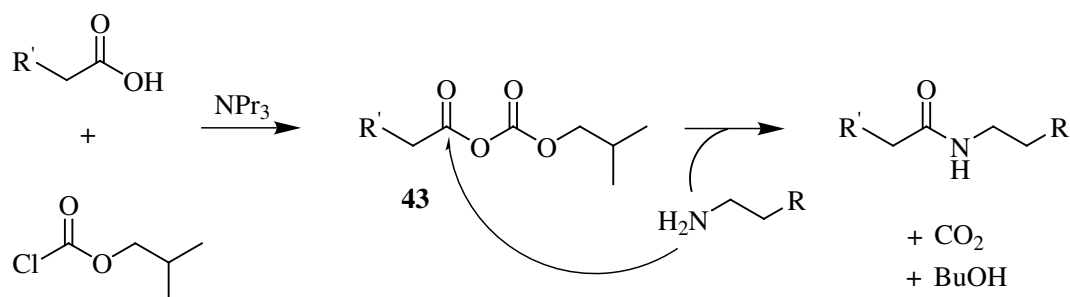
Nachdem mit den Aminoalkylglycosiden und den  $\omega$ -thiofunktionalisierten Spacern die einzelnen Elemente für SAM-Grundbausteine vorlagen, mußten diese miteinander verbunden werden. Verschiedene Methoden der Peptidkupplung wurden an dieser Stelle ausprobiert.



### 5.3.1 Monovalente Glycoderivate

Zunächst wurden mit der Ethylenglycol-freien Carbonsäure **2** Voruntersuchungen angestellt. Die Säure wurde mit dem primären Amin **29** durch Aktivierung mit dem wasserlöslichen Carbodiimid EDC und HOBt in DMF zur Reaktion gebracht. Das gebildete Amid wurde in lediglich moderaten Ausbeuten von etwa 40 % erhalten. Hierbei traten die bereits ausgeführten Probleme der Produktreinigung durch den amphiphilen Charakter der Moleküle deutlich zutage. Um die Peptidbindungsbedingungen für diese Verbindungen zu optimieren, wurden mit dem Isopropylamin **30** weitere Tests durchgeführt.

Die auf Guanidiumgerüsten beruhenden Peptidkupplungsreagenzien HBTU und HATU, die sich bei der Synthese der dendritischen Bausteine sehr bewährt hatten, lieferten an dieser Stelle nur recht enttäuschende Ergebnisse. Wesentlich bessere Umsetzungen konnten nach der Methode des gemischten Anhydrids unter basischen Bedingungen erzielt werden (Schema 5.13).<sup>[199]</sup>



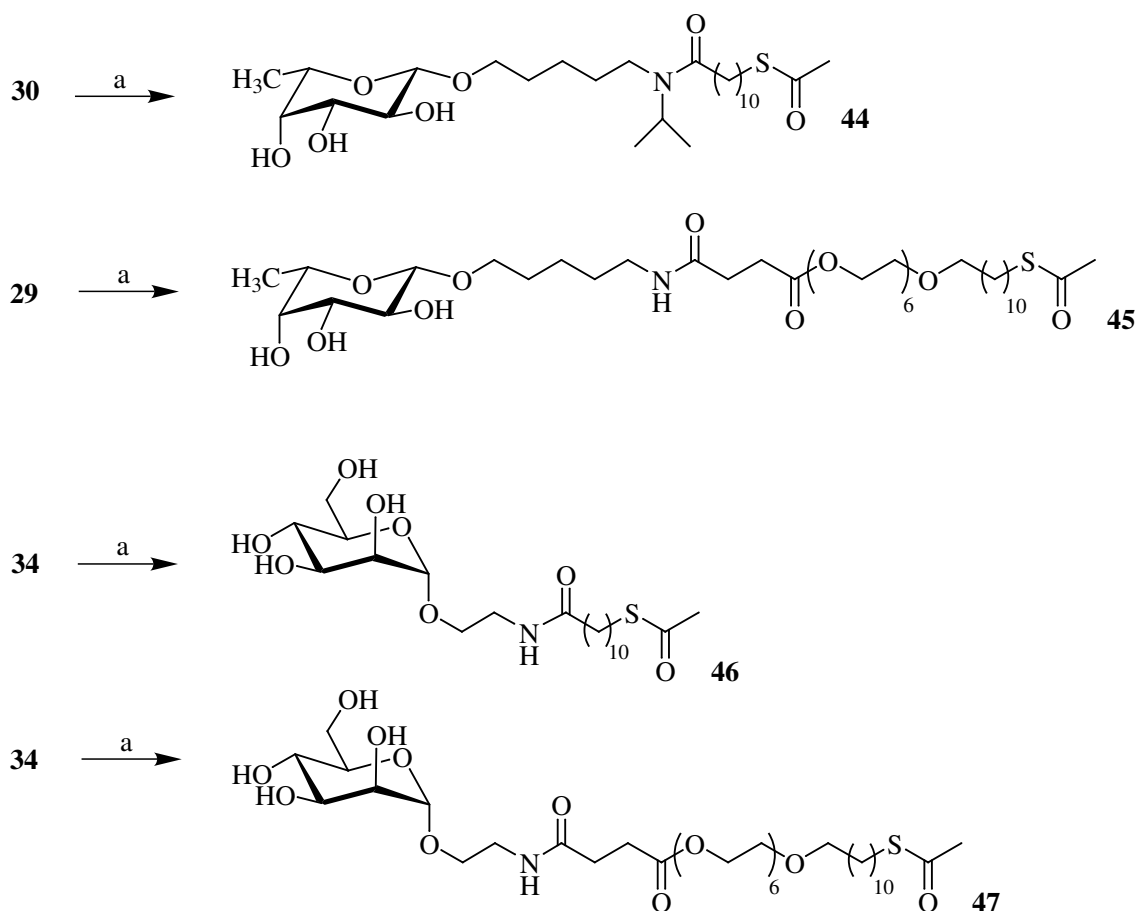
Schema 5.13: Peptidkupplung über gemischtes Anhydrid.

Im Zuge dieser Aktivierung wird die Carbonsäure von der Stickstoffbase deprotoniert und bildet mit Isobutylchloroformiat (IBCF) das gemischte Anhydrid **43**. Dieses Anhydrid wird dann nukleophil vom Amin angegriffen und bildet das Amid und die flüchtigen Nebenprodukte Kohlendioxid und Butanol.

Hierbei kam der verwendeten Base hohe Bedeutung zu. Aus unbekannter Ursache lieferte Diisopropylethylamin (DIPEA) deutlich schlechtere Ausbeuten als vergleichbare tertiäre Stickstoffbasen. Wurde stattdessen Tripropylamin oder, wie in der Literatur vorgegeben,<sup>[140]</sup> Tributylamin verwandt, so erreichten die Ausbeuten durchgehend über 50 %.

Um die Aufarbeitung leichter zu gestalten, wurde das leichterflüchtige Tripropylamin gewählt. Es wurde zusammen mit der Carbonsäure in DMF vorgelegt und auf 0 °C gekühlt, bevor langsam IBCF zugegeben wurde. Anschließend wurde etwa 30 min gerührt. In dieser Zeit bildet sich das reaktive gemischte Anhydrid, was durch Dünnschichtchromatographie zu verfolgen ist. Nach erfolgter Aktivierung wurde das

gelöste Amin zugegeben. Auf diese Weise konnten die beiden L-Fucoside **29** und **30** erfolgreich mit der Carboxylfunktion des Spacermoleküls **2** sowie mit dem wertvollen Ethylenglycol-tragenden Spacer **15** verknüpft werden. Es sei an dieser Stelle gesondert angemerkt, daß zur Entfernung von Resten des Tripropylamins essentiell eine kurze Säule mit dem sauren Ionentauscher Amberlite IR-120 im Rahmen der Aufarbeitung durchgeführt werden mußte. Es wurden befriedigende Ausbeuten von 60 % bzw. 54 % für die Verbindungen **44** und **45** erreicht (Schema 5.14). Die gewonnenen Erkenntnisse zur Peptidbildung konnten auch auf die Herstellung der D-Mannoside übertragen werden. Im Falle des Aminoethylmannosids **34** wurden ebenfalls der einfache Baustein **2** sowie die EG<sub>6</sub>-haltige Säure **15** an die Aminofunktion des Zuckerderivats gebunden. In der höheren Stabilität der Mannoside sind die mit guten 65 % und hervorragenden 94 % deutlich besseren Ausbeuten der Kupplung im Vergleich zu den Fucosiden begründet.



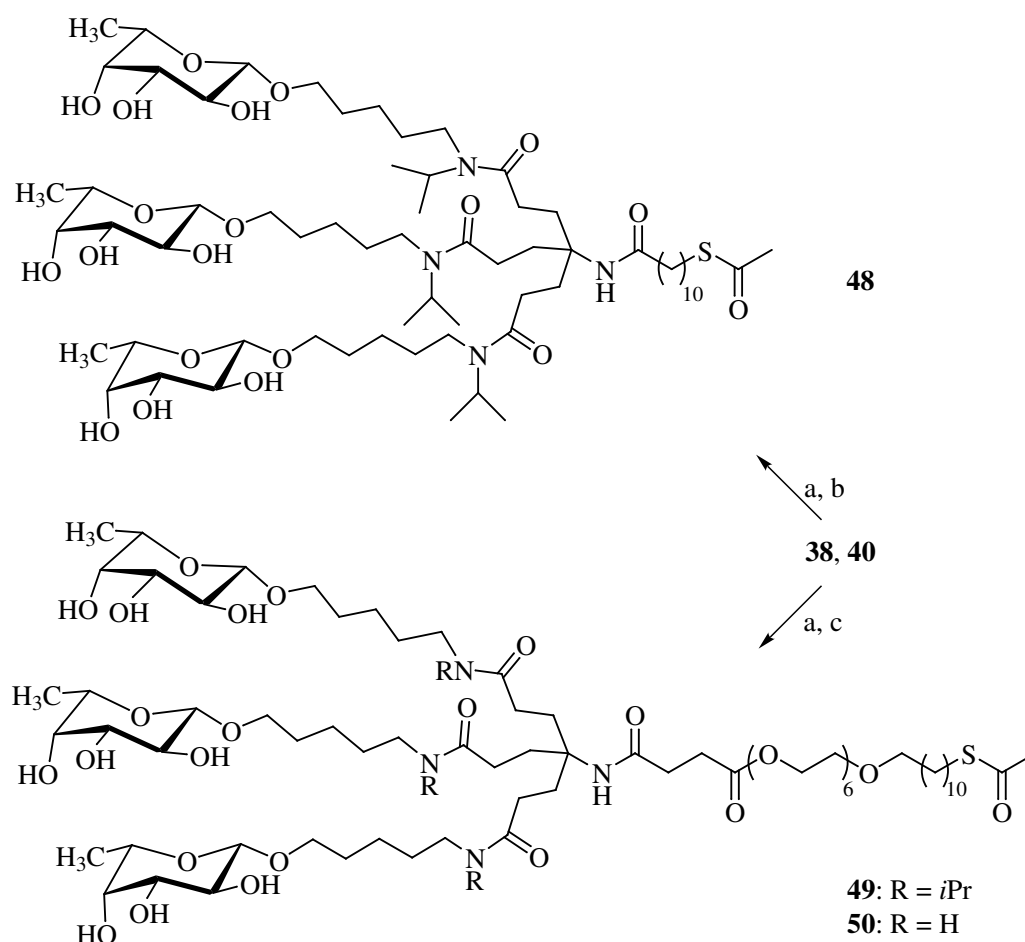
Schema 5.14: Synthese der Glycoside mit  $\omega$ -thiofunktionalisiertem Spacer. Reaktionsbedingungen: a) Carbonsäure **2** bzw. **15**, IBCF,  $\text{NPr}_3$ , DMF,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 3–6 h, **44**: 60%; **45**: 54%; **46**: 65% und **47**: 94%.

### 5.3.2 Trivalente Glycoderivate

Mit den Molekülen **44** – **47**, von denen jedes eine Monosaccharid- und eine thiofunktionalisierte Spacer-Einheit enthält, lagen wertvolle Grundbausteine für die Immobilisierung auf Goldoberflächen vor. Als nächstes wurden dendritische Strukturen angestrebt. Solche Cluster-Glycoside sollten geeignet sein, um multivalente Interaktionen, wie sie auf Zelloberflächen stattfinden, im Rahmen von selbstangeordneten Monoschichten auf Gold zu mimikrieren und zu untersuchen.

#### Fucoside

Parallel zur beschriebenen Synthesestrategie der monovalenten Bausteine wurden die dendritisch funktionalisierten Amine **38** und **40** mit den Säuren **2** und **15** gekuppelt (Schema 5.15).



Schema 5.15: Synthese der dendritischen Fucoside mit  $\omega$ -thiofunktionalisiertem Spacer. Reaktionsbedingungen: a) Morpholin, DMF, RT, 2 h, quant.; b) **40**, HATU, DIPEA, DMF, RT, 3 h, 62%; c) **38** bzw. **40**, IBCF,  $\text{NPr}_3$ , DMF,  $0^\circ\text{C} \rightarrow 45^\circ\text{C}$ , 4 h, **49**: 63%; **50**: 5%.

Zunächst mußte die Fmoc-maskierte, fokale Aminofunktion entschützt werden. Dies war problemlos in einer 20 %igen Lösung von Morpholin in DMF möglich und ergab quantitative Umsetzung. Ohne weitere Aufarbeitung konnte dann die Peptidsynthese mit dem freien Amin durchgeführt werden. Hierzu wurde im Falle der Isopropylkomponente **40** eine Aktivierung durch HATU gewählt. Unter bekannten Bedingungen wurde somit die Zielverbindung **48** in 62 %iger Ausbeute erhalten.

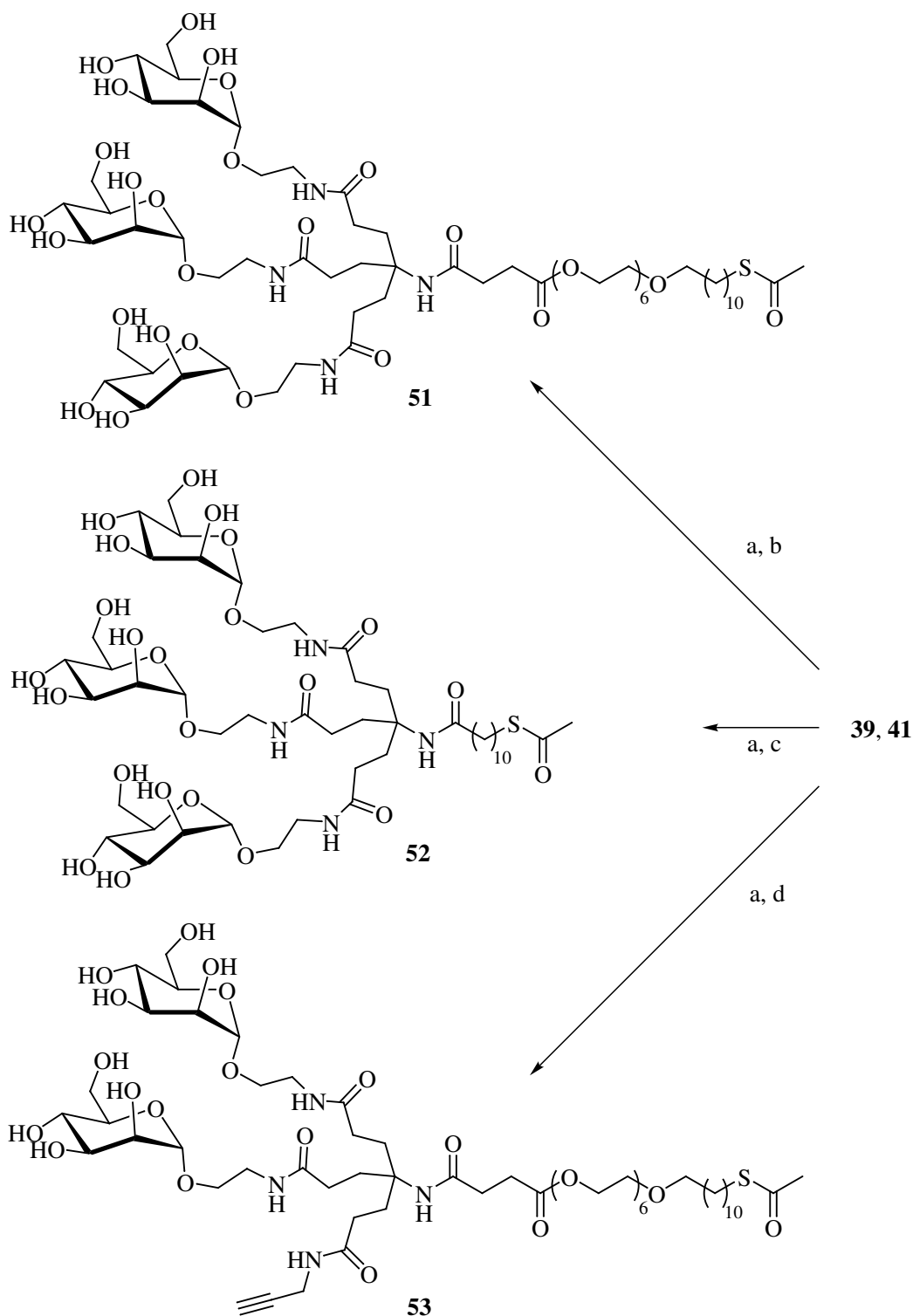
Die Methode über das gemischte Anhydrid lieferte im Falle der Kupplung mit den ethylenglycolhaltigen Spacern bessere Ergebnisse als die HATU-vermittelte Amidbildung. Dies spiegelt sich in den Ausbeuten für die Zielfucoside **49** und **50** wider: die Isopropylverbindung **49** ergab mit der Carbonsäure **15** eine Ausbeute von 63 %, wohingegen das Amid **50** lediglich in 5 % erhalten wurde. Hier ist zu berücksichtigen, daß die um die Platzhaltereinheiten elongierten Cluster-Glycoside deutlich tensidische Eigenschaften mit den damit verbundenen Reinigungsschwierigkeiten besitzen. Dieser Effekt wird im Falle der Isopropyl-freien Amine noch verstärkt. Aus diesem Grund mußte zur Substanzisolierung eine Reinigungsgesequenz aus GPC-HPLC (RP) erfolgen. Diese Tatsache in Verbindung mit der hochgradig säurelabilen glycosidischen Bindung im Fucosid erklärt die geringe Ausbeute im Falle der Verbindung **50**.

Zudem ist bei Betrachtung der NMR-Analytik zu beachten, daß die Amid-gekuppelten Cluster-Glycoside **48** und **49** als zwei Amidstereoisomere vorliegen, was in einem verdoppelten Signalsatz im  $^1\text{H}$ -Spektrum deutlich wird. Auch NMR-Experimente mit erhöhter Temperatur bis zu 330 K führten nicht zur Vereinfachung dieses Signalmusters.

## Mannoside

Analog zum Aufbau der Fucoside konnten die dendritischen Mannosid-Cluster mit den Spacermolekülen verbunden werden. Vor der Peptidbildung mußte zunächst die Fmoc-Schutzgruppe des Amins **39** entfernt werden. Dies wurde parallel zu den Fucosidsynthesen mit 20 %iger Lösung von Morpholin in DMF quantitativ durchgeführt. Das freie Amin konnte ohne weitere Chromatographie mit den langkettigen Säuren **2** und **15** verbunden werden. Hierzu wurde die bewährte Kupplung mittels Chlorisobutylformiat gewählt. Es wurden Ausbeuten von 32 % in beiden Fällen erhalten (Schema 5.16).

Bei dem gemischten Amin **41** wurde völlig analog verfahren und nach Fmoc-Entschützung die Kupplung mit der Säure **15** IBCF-mediert durchgeführt. Hier konnten 26 % Ausbeute erzielt werden.



Schema 5.16: Synthese der dendritischen Mannoside mit  $\omega$ -thiofunktionalisiertem Spacer. Reaktionsbedingungen: a) Morpholin, DMF, RT, 2 h, quant.; b) **15**, IBCF,  $\text{NPr}_3$ , DMF,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 2 h, 32%; c) **2**, IBCF,  $\text{NPr}_3$ , DMF,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 2 h, 32%; d) **15**, IBCF,  $\text{NPr}_3$ , DMF,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 2 h, 26%.

Im Vergleich zur Synthese der Fucoside bestätigen diese Ergebnisse abermals das Phänomen, daß die Synthesechemie der Fucoside wesentlich aufwendiger als die der Mannoside ist. Hauptsächlich ist dies auf die empfindliche  $\beta$ -glykosidische Bindung zurückzuführen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sowohl die linearen glycosidischen Zielverbindungen **44** – **47** wie auch die dendritischen, spacer-funktionalisierten Bausteine **48** – **52** aus der Reihe der D-Mannoside und der L-Fucoside erfolgreich aufgebaut werden konnten. Die optimalen Bedingungen für die Verknüpfung der Carbonsäuren mit den Kohlenhydratalkylaminen wurden aus einer Reihe von möglichen Peptidkupplungsmethoden ermittelt. Auch die Generierung von Bausteinen mit gemischten Kopfgruppen, die sowohl saccharidische Einheiten wie auch andere Ankergruppen tragen, konnte erfolgreich für das Mannosid **53** gezeigt werden.

Weiterhin wurde festgestellt, daß für Zielmoleküle wie **49** bis **51** sowie **53** die Reinigung erheblich durch deren amphiphilen Charakter erschwert wurde. Nötig waren z. T. Sequenzen aus Gel-Permeations-Chromatographie und nachgeschalteter RP-HPLC. Dies führte in einigen Fällen zu nur moderaten Ausbeuten.

Die synthetisierten Moleküle waren geeignet, um auf goldbedampften Glaswafern fixiert zu werden. In Kapitel 5.6 wird auf die Ergebnisse der Immobilisation dieser Verbindungen eingegangen, und in Kapitel 5.7 werden die Ergebnisse der SPR-Untersuchungen ausgeführt.

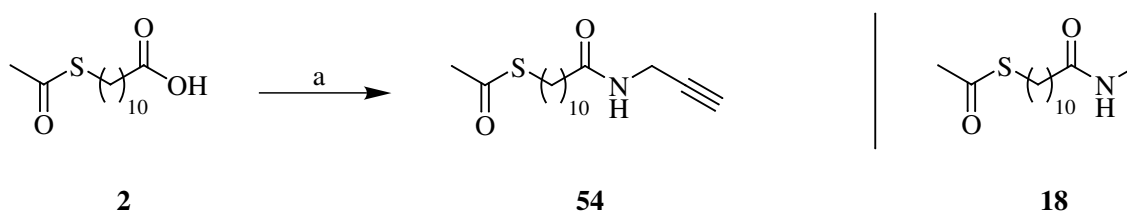
## 5.4 Click-Chemie – 1,3-dipolare Cycloaddition

In Anlehnung an die in Abbildung 5.2 auf Seite 50 visualisierten Konzepte wurde als vierte Verbindungsoption von funktionaler Kopfgruppe und linearem Spacer auch die 1,3-dipolare Cycloaddition eines Alkins und eines Azids eingehend untersucht. Wie bereits weiter oben ausgeführt ging es darum, zunächst eine Komponente als SAM auf Gold anzuordnen, um danach mit der anderen Komponente die Cycloaddition durchzuführen. Nachdem bisher die Reaktionsbedingungen für den Aufbau der selbstanordnenden Moleküle optimiert und etabliert worden sind, wurden nun sowohl die Komponenten wie auch die Reaktionsbedingungen für den Einsatz der „Click-Chemie“ auf der Goldoberfläche selbst optimiert.

### 5.4.1 Optimierungsansatz zur 1,3-dipolaren Cycloaddition

Zunächst war unbekannt, ob die Alkinfunktionalität am Spacerterminus oder an der biorelevanten Kopfgruppe idealerweise angebracht werden sollte. Um zunächst die effektivsten Reaktionsbedingungen für die Cycloaddition zu ermitteln, wurden bereits vorhandene oder schnell zugängliche Komponenten eingesetzt.

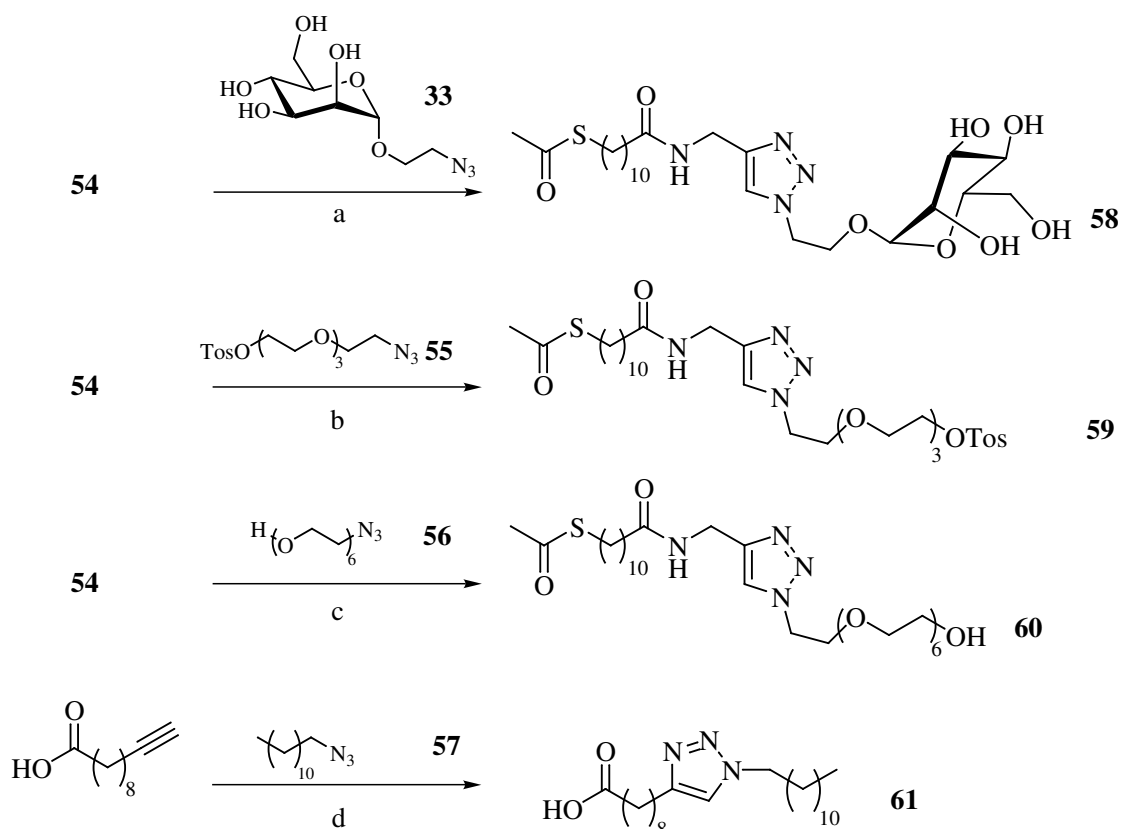
Als Ausgangsmaterial für einen Thio-funktionalisierten Alkylspacer mit Alkin-Terminus diente die bekannte, acetylgeschützte Thioundecansäure **2**. Durch die Einführung von Propargylamin wurde die Carbonsäure unter den bewährten Standardbedingungen mittels IBCF-Aktivierung in das Amid **54** umgesetzt. Hierbei wurden gute Ausbeuten von 78 % erreicht (Schema 5.17). Für dieses Molekül stand mit dem Methylamid **18** auch das passende Verdünnungsmolekül bereits zur Verfügung.



Schema 5.17: Synthese des thiofunktionalisierten Alkin-Spacers. Reaktionsbedingungen: a) Propargylamin, IBCF,  $\text{NPr}_3$ , DMF, RT, 2 h, 78 %.

Zu Testzwecken wurden mit dem Alkin **54** die Cycloadditionsbedingungen untersucht. Die Triazolbildung mit dem Azidoethylmannosid **33**, mit dem kurzen  $\text{EG}_3$ -Baustein **55**<sup>[200]</sup> sowie mit dem längeren  $\text{EG}_6$ -Alkohol **56**<sup>[201,202]</sup> wurden getestet. Außerdem kamen die käufliche  $\omega$ -Undecinsäure und das Dodecylazid **57**<sup>[203]</sup> zum Einsatz (Schema 5.18).

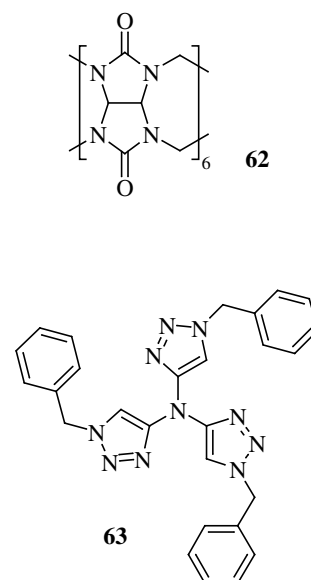
Bei den ersten drei Reaktionen wurde mit 5 eq. CuI sowie 5 eq. DIPEA in methanolischer Lösung gearbeitet. Bei allen Ansätzen wurde im Aufarbeitungsprozeß die Reaktionsmischung *in vacuo* eingeeengt und durch einen Spritzenfilter filtriert, um das Kupfersalz abzutrennen. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung via  $\text{RP}_{18}$ -HPLC, da die extrem hohe Polarität der Moleküle eine chromatographische Trennung an Kieselgel ausschloß. Es ergaben sich Ausbeuten von 10 – 64 %, ohne daß die hohen Unterschiede erklärbar waren.



Schema 5.18: Synthese verschiedener 1,4-Triazole. Reaktionsbedingungen: a) CuI, DIPEA, MeOH, RT, 15 h, 34%; b) CuI, DIPEA, MeOH, RT, 15 h, 64%; c) CuI, DIPEA, MeOH, RT, 15 h, 10%; d) CuI, 2,6-Lutidin, MeCN, 0 °C  $\rightarrow$  RT, 15 h, 50%.

Dem Kupfersalz kam in Verbindung mit verschiedenen Lösungsmittel / Base-Kombinationen an dieser Stelle besondere Bedeutung zu, da es unterschiedlich solvatisiert werden kann.<sup>[103]</sup> In der ursprünglich in der Gruppe von SHARPLESS untersuchten Reaktion sollte Acetonitril verwandt werden, da es Cu(I) gut unter Bildung eines  $\text{Cu}[\text{MeCN}]_4^+$ -Komplexes löst. In diesem Fall wurde Triethylamin als Base eingesetzt, allerdings wurden, abhängig vom gewählten Alkin / Azid-Paar unerwünschte Nebenprodukte wie Bis-triazole (aus einer Glaser-Typ-Reaktion) oder oxygenierte Triazole in 5 – 10 % gebildet.<sup>[204]</sup>

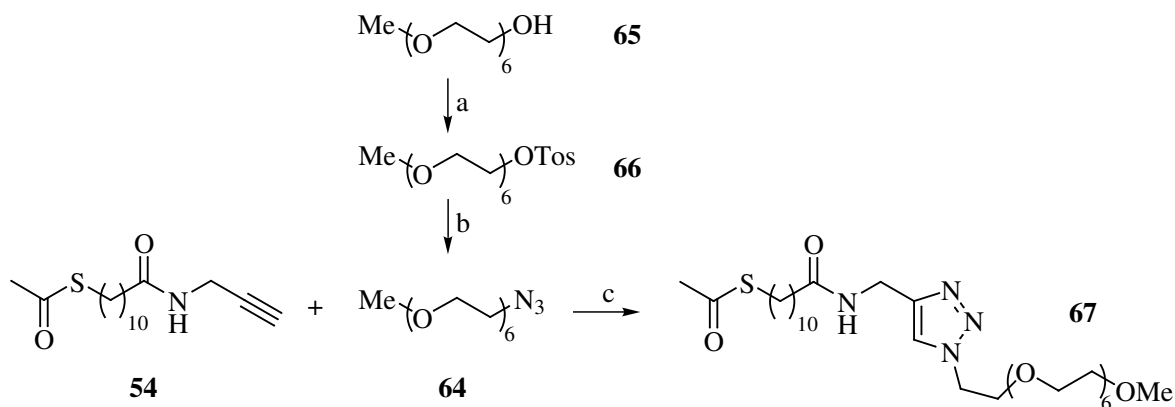
Abhilfe in diesem Fall bot der Wechsel zu Methanol als Lösungsmittel. Als eine andere potentielle Möglichkeit, die Nebenreaktionen durch das Kupfer zu unterbinden, erwies sich die Komplexierung des Metallions durch einen organischen Liganden. Als solcher ist beispielsweise der hexamere Cyclus Cucurbituril **62**<sup>[205–207]</sup> oder das *tris*-Triazol **63**<sup>[208]</sup> beschrieben.





Bei den hier untersuchten Substraten führte jedoch weder der Einsatz des *tris*-Triazols noch anderer, ebenfalls komplexierender Stickstoffbasen wie 2,6-Lutidin zu reproduzierbar verbesserten Ergebnissen. Die in der Literatur für ähnliche Substanzen beschriebenen Ausbeuten wurden nur teilweise erreicht.

Da die variierenden Ergebnisse u. U. durch die unterschiedliche Struktur der Substrate erklärbar sind, wurde in einem kombinatorischen Ansatz mit einem festen Alkin / Azid-Paar zur Optimierung der Cycloadditionsbedingungen experimentiert.<sup>[209]</sup> Zum Einsatz kamen das langkettige Alkin **54** sowie der Azid-funktionalisierte Methyl-6-hydroxyhexyl-ether **64**. Dieser war leicht in einer zweistufigen Sequenz aus Hexaethylenglycolmonomethylether **65** über das Tosylat **66** in 58%iger Ausbeute aufzubauen (Schema 5.19).



Schema 5.19: Kombinatorischer Ansatz zur Optimierung der Cycloaddition. Reaktionsbedingungen: a) TosCl, DABCO, EA, 0 °C → RT, 1.5 h; b) NaN<sub>3</sub>, TBABr, DMF, 90 °C, 3.5 h, 58 % über zwei Stufen; c) siehe Tabelle 5.1.

In Tabelle 5.1 sind exemplarisch einige der erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Es wurden Reaktionsdauer und -temperatur, Lösungsmittel, Base und Katalysator variiert. Die Edukte wurden äquimolar im 0.1 mM Maßstab eingesetzt.

Man konnte erkennen, daß die Reaktion in Methanol wie auch in Acetonitril nach etwa 8 h zum maximalen Umsatz gelangt war (vergl. # 1, # 2 und # 7 vs. # 3). Nach 1–5 Stunden wurden maximal ca. 20 % Produkt gebildet. Eine verlängerte Reaktionsdauer auf bis zu 63 h erhöhte die Ausbeute nicht. Um Vergleichbarkeit zu wahren, wurden alle Folgeversuche über Nacht (etwa 15 h) durchgeführt.

Die Reaktionstemperatur spielte ebenso eine untergeordnete Rolle (vergl. # 1 vs. # 2 sowie # 3 vs. # 5). Es wurden Ansätze bei Raumtemperatur wie auch bei leicht erhöhter Temperatur von ca. 45 °C durchgeführt. Dies hatte bei ausreichender Reaktionsdauer keinen Einfluß auf die gebildete Produktmenge. Eine größere Menge des

Katalysators, der ohnehin im äquimolaren Verhältnis der Reaktion zugegeben wurde, hatte keine positiven Auswirkungen auf die Produktbildung (vergl. # 3 vs. # 4).

Tabelle 5.1: Kombinatorischer Ansatz. Reaktionsbedingungen c) aus Schema 5.19

#	Eq. <b>54</b>	Eq. <b>64</b>	Eq. Base	Lösungs- mittel	T [°C]	Eq. Kata- lyikator	Reaktions- zeit [h]	Ausbeute [%] †
1	1	1	1.3 DIPEA	MeCN	RT	1 CuI	2	< 10 %
2	1	1	1.3 DIPEA	MeCN	45	1 CuI	2	23 %
3	1	1	1.3 DIPEA	MeCN	45	1 CuI	8	62 %
4	1	1	1.3 DIPEA	MeCN	45	5 CuI	8	65 %
5	1	1	1.3 DIPEA	MeCN	RT	1 CuI	15	86 %
6	1	1	1.3 Lutidin ‡	MeCN	RT	1 CuI	15	33 %
7	1	1	1.3 Lutidin ‡	MeOH	RT	1 CuI	15	74 %
8	1	1	1.3 DIPEA	MeOH	RT	1 CuI	15	43 %
9	1	1	1.3 DIPEA	Toluol	100	1 CuI	15	80 % *
10	1	1	—	H <sub>2</sub> O/ <sup>t</sup> BuOH	45	CuSO <sub>4</sub> / Ascorb.§	15	50 %
11	1	1	—	DMF/ MeOH	70	0.2 CuI	15	91 % *
12	1	1	—	DMF/ MeOH	45	0.2 CuI	15	96 %

Eine weitergehende Steigerung der Temperatur über 45 °C wurde vermieden, um die mögliche Bildung von Gemischen aus 1,4- und 1,5-Triazolen zu unterbinden. Diese entstanden in zwei Fällen bei extremen thermischen Bedingungen. Wurde die Reaktion in Toluol bei 100 °C bzw. in einem MeOH / DMF-Gemisch bei 70 °C durchgeführt, so konnte die Bildung beider Regioisomere beobachtet werden (siehe # 9 sowie # 11).

Interessant sind die Ergebnisse der verschiedenen Base / Lösungsmittel-Paare. Wurde Acetonitril in Kombination mit Diisopropylamin eingesetzt, so ergaben sich bei ausreichender Reaktionsdauer gute Ausbeuten von etwa 80 % (siehe # 5). Der Wechsel zu 2,6-Lutidin im selben Lösungsmittel halbierte die isolierte Ausbeute (siehe # 6). Zusammen mit Methanol ergab jedoch auch die Verwendung von Lutidin wieder etwa 70 % Umsatz (siehe # 7). Dagegen lieferte die Base DIPEA im Lösungsmittel

† isolierte Ausbeute nach Chromatographie

‡ Lutidin meint hier: 2,6-Lutidin ≡ 2,6-Dimethylpyridin

\* Beide Regioisomere erhalten

§ 0.01 eq. CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O + 0.1 eq. Natriumascorbat

MeOH ähnlich wie die „falsche“ Paarung Lutidin / MeCN nur mäßige Ausbeuten von etwa 40 % (siehe # 8). Diese Ergebnisse waren reproduzierbar, so daß davon ausgegangen werden kann, daß bei den gewählten Substraten die Lösungsmittel / Base-Kombination von entscheidender Bedeutung für die Bildung des 1,4-Triazols ist. Der Einsatz des *tris*-Triazols **63** zeigte keinen Einfluß auf die Produktmenge.

Andere untersuchte Lösungsmittelgemische waren die von SHARPLESS *et al.* beschriebene 1 : 1 Mischung aus Wasser und *tert*-Butanol. In diesem Fall wurde das Kupfer(II)-Ascorbat-System eingesetzt, bei dem durch Natriumascorbat als Oxidans aus  $\text{Cu}^{2+}$  *in situ*  $\text{Cu}^+$  gebildet wird. Die literaturbeschriebenen quantitativen Ausbeuten konnten allerdings nicht reproduziert werden; es wurden nur moderate 50 % erzielt (siehe # 10).

Ausgezeichnete Ergebnisse wurden jedoch mit einem anderen, hochpolaren Lösungsmittelgemisch aus Methanol und DMF erhalten. Während Rückfluß-Bedingungen hier zum Verlust der Regiospezifität führten, wurden bei 45 °C ausgezeichnete Ausbeuten von 96 % eines Regioisomers erzielt (siehe # 12).

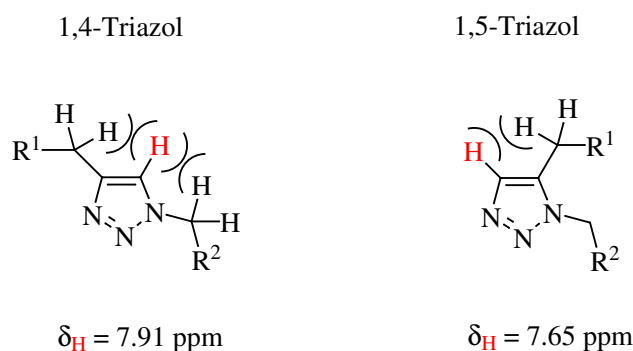
Alle Reaktionen wurden in entgasten Lösungsmitteln durchgeführt, um eine Disproportionierung des Kupfer(I)iodids zu vermeiden. Zunächst waren die Reaktionsmischungen filtriert und dann direkt durch HPLC an RP<sub>18</sub>-Medien mit einem Wasser / Acetonitril-Gemisch chromatographiert worden. Es zeigte sich, daß die Ergebnisse unbefriedigend waren und die Ausbeuten ausnahmslos unter 35 % lagen. Aus nicht bekannter Ursache war es auf der HPLC-Säule zur Zersetzung des Produktes gekommen. Die HPLC-Plots zeigten neben den Produktpeaks Signale, die nicht den Edukten zugeordnet werden konnten und auf die Bildung von Nebenprodukten oder Zersetzung auf der Säule schließen ließen. Wurde die Aufreinigung klassisch durch Säulenchromatographie an Kieselgel durchgeführt, so wurden die hier dokumentierten Ausbeuten erreicht.

Wegen der hohen Polarität der Triazolfunktion war eine kurze Flash-Säule ausreichend: Mit einem 1 : 1 Essigester / Cyclohexan-Gemisch wurden alle Verunreinigungen sowie die Edukte eluiert, wohingegen das Produkt einen  $R_f$ -Wert von 0 zeigte. Dieses lies sich dann problemfrei mit 1 : 5 Methanol / Dichlormethan von der Säule waschen. Dabei blieben die Kupfersalze auf der Kieselgelsäule zurück.

Eine herkömmliche wässrige Aufarbeitung lieferte im Vergleich schlechtere Ausbeuten. Wurde das eingeeengte Rohprodukt in einem organischen Lösungsmittel aufgenommen und dann ammoniakalisch extrahiert, so wurde der blaue Kupfertetraminkomplex gebildet. Dennoch kam es bei der anschließenden Extraktion der wässrigen Phase zu Substanzverlust des Produkts. Dies konnte zum einen dem sehr gut wasser-

löslichen Ethylenglycolpart,<sup>[93]</sup> zum anderen dem polaren Triazol im Zielmolekül **67** zugeordnet werden.

Die beiden Regioisomere des 1,2,3-Triazols lassen sich leicht durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie identifizieren. Die chemische Verschiebung des einzelnen H-Atoms am Cyclus ist eindeutig zuzuordnen.<sup>[210,211]</sup> Darüber hinaus lassen sich im NOE-Experiment die benachbarten Protonen oft eindeutig identifizieren (Schema 5.20).



Schema 5.20: NMR-Analytik der beiden Triazol-Regioisomere.

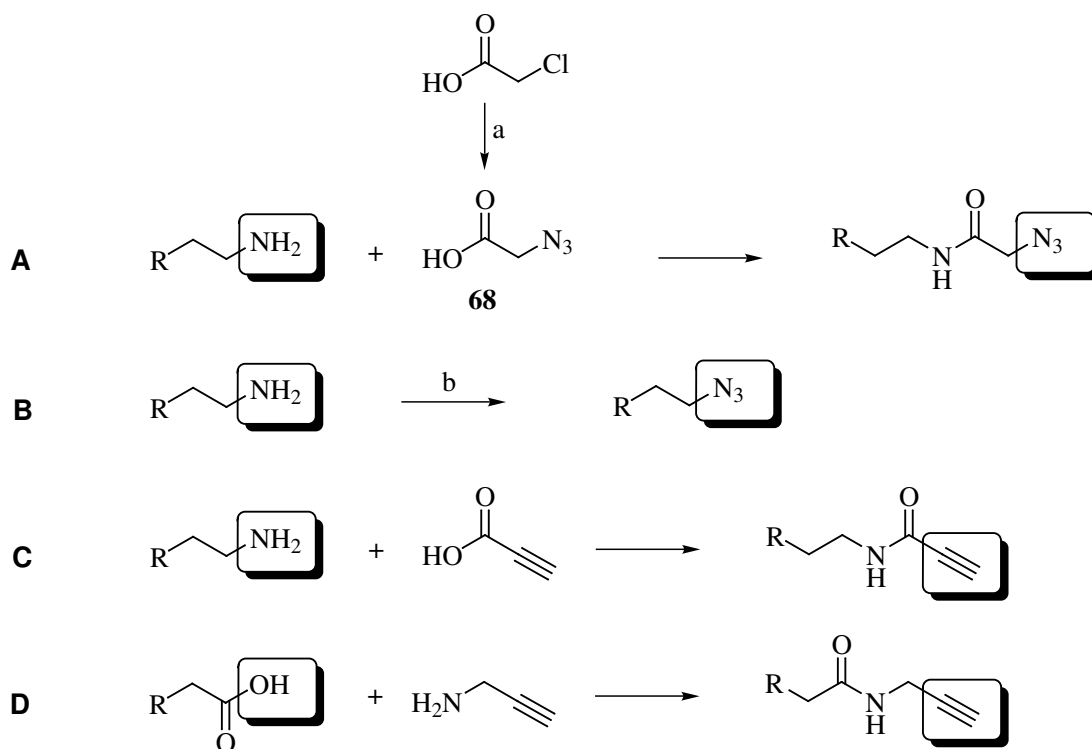
## 5.4.2 Spacer-funktionalisierte Glycomimetika durch Click-Chemie

Um zu Glyco-SAMs zu gelangen, die für biologische Untersuchungen sinnvoll eingesetzt werden können, mußte der Aspekt der unspezifischen Wechselwirkung des SAMs mit Proteinen berücksichtigt werden. Entsprechend den bisherigen Ansätzen mußte ein molekularer Abschnitt zur Unterdrückung dieser unerwünschten Interaktion zwischen Analyt und Oberfläche eingebaut werden; es wurde wieder eine Hexaethylenglycol-Erweiterung angestrebt.

Da das Azid **9** bereits vorlag und auf direktem Weg in einer vierstufigen Sequenz aus wohlfeilen Startmaterialien synthetisiert werden konnte, wurde die erste Syntheseroute entsprechend ausgelegt: Es mußten vorhandene Rezeptorbausteine mit einem Alkin ausgestattet oder vollständig neue Bausteine mit Alkinterminus aufgebaut werden.

Prinzipiell war die Überführung eines terminalen, primären Amins in das entsprechende Azid sehr leicht durch Ankupplung von Azidoessigsäure **68** möglich (Schema 5.21 **A**).<sup>[212,213]</sup> Diese war durch nukleophile Substitution von Chloressigsäure mit Natriumazid leicht zugänglich. Die Umsetzung erfolgte im wässrigen Medium mit quantitativer Ausbeute, wobei die beim Arbeiten mit Aziden notwendigen Sicherheitsmaßnahmen zu beachten waren.

Ebenfalls bequem zugänglich war das Azid ohne Kettenverlängerung durch einen Metall-katalysierten Diazotransfer<sup>[214–216]</sup> (Schema 5.21 B).

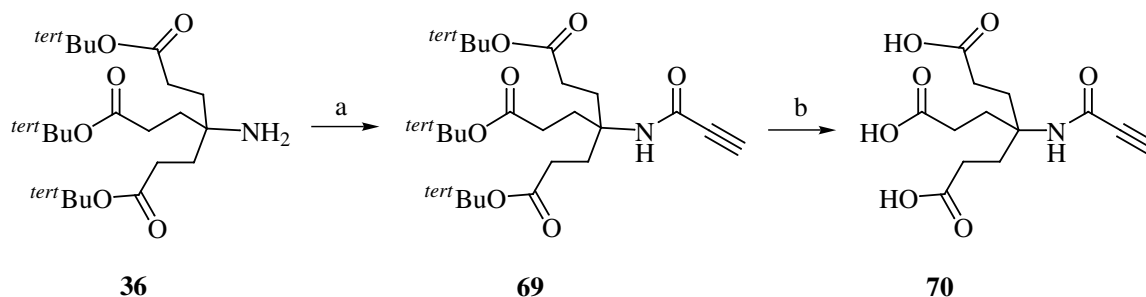


Schema 5.21: Funktionsgruppenmodifizierungen für „Click“-Bausteine. Reaktionsbedingungen: a)  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $70\text{--}80^\circ\text{C}$ , 8 h, quant.; b)  $\text{TfN}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$ , RT.

Die Umsetzung vom Amin zum terminalen Alkin war durch die  $\text{C}_3$ -Erweiterung mit Propargylsäure möglich (Schema 5.21 C). Interessanterweise waren Peptidbildungsbedingungen mit DCC-Aktivierung oder die Verwendung von HATU notwendig, da die Anwendung von IBCF lediglich zu einer komplexen Mischung ohne isolierbares Produkt führte.

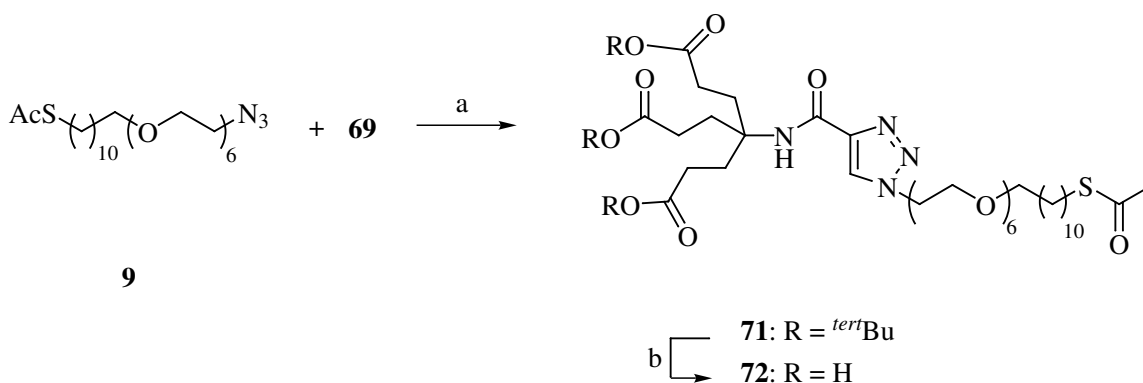
Schließlich konnten analog zur Umsetzung in Schema 5.17 auf Seite 71 Carbonsäuren durch Anknüpfung von Propargylamin in terminale Alkine überführt werden (Schema 5.21 D).

Exemplarisch ist die Alkinfunktionalisierung für den Fall des dendritischen Bausteins **36** durchgeführt worden (Schema 5.22). Das fokale Amin des *tert*-Butyl-geschützten Esters wurde HATU-vermittelt in das Alkin **69** überführt. Die Ausbeute lag bei moderaten 56 %, allerdings konnte unreactiertes Startmaterial zurückgewonnen werden. Die nachfolgende Entschützung mit 50 %iger TFA in Dichlorethan lieferte die freie Trisäure **70** in quantitativer Ausbeute.



Schema 5.22: Synthese der Alkin-terminierten Trisäure. Reaktionsbedingungen: a) Propiolsäure, HATU, DIPEA, DMF, 0 °C → RT, 18 h, 56 %; b) TFA, DCE, RT, 2.5 h, quant.

Mit dem Alkin **69** wurde nun die Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycladdition durchgeführt. Hierbei ergaben die klassischen Bedingungen unter Verwendung der Kombination von DIPEA in Acetonitril als Lösungsmittel das Triazol **71** in ausgezeichneten 91 % Ausbeute (Schema 5.23). Die anschließende saure Entschützung der Estergruppen erfolgte mit 50 %iger TFA in CDE und lieferte quantitativ den vollständig entschützten Baustein **72**.



Schema 5.23: Synthese eines thiofunktionalisierten SAM-Bausteins mit dendritischer Trisäure durch „Click-Chemie“. Reaktionsbedingungen: a) CuI, DIPEA, MeCN, RT, 15 h, 91 %; b) TFA in DCE, RT, 1 h, 98 %.

Nachdem diese Ergebnisse erzielt worden waren, wurden erste Untersuchungen zur Immobilisierung und Verwendbarkeit der synthetisierten Moleküle auf Gold-Wafern unternommen. Detailliert wird darauf in Abschnitt 5.6.2 eingegangen. In diesem Zusammenhang sei aber vorweg folgendes wichtige Ergebnis vorgestellt: Die EG<sub>6</sub>-freien, Alkin-tragenden Bausteine konnten problemfrei als Monoschicht auf Au abgeschieden werden und die anschließende Cycloadditionsreaktion war ebenfalls erfolgreich. Auch das Hexaethylenglycol-tragende Azid **9** konnte als SAM auf Gold fixiert werden, al-

lerdings war die „Click-Reaktion“ hier weniger erfolgreich. Es wurde festgestellt, daß es zu erheblichen Nebenreaktionen bei der Cycloaddition kam, wenn das Azid immobilisiert und das Alkin in Lösung vorlagen (Abbildung 5.3 A). Die gemessenen Schichtdicken nach der Cycloaddition waren viel zu gering, was auf Desorption von der Oberfläche oder unvollständig ausgebildete Schichten schließen ließ. Außerdem bildeten sich in der Lösung feste Niederschläge. Offenbar kam es in der Phase der Cycloaddition zur Reaktion der Alkine untereinander, u. U. in Form einer Glaser-Typ-Reaktion.<sup>[217]</sup> Als Ursache für dieses unerwartete Phänomen kann angenommen werden, daß durch die recht starre Ordnung innerhalb der selbstangeordneten Monoschicht die Alkine nicht in einer für die Glaser-Reaktion notwendigen Konformation angeordnet werden können.

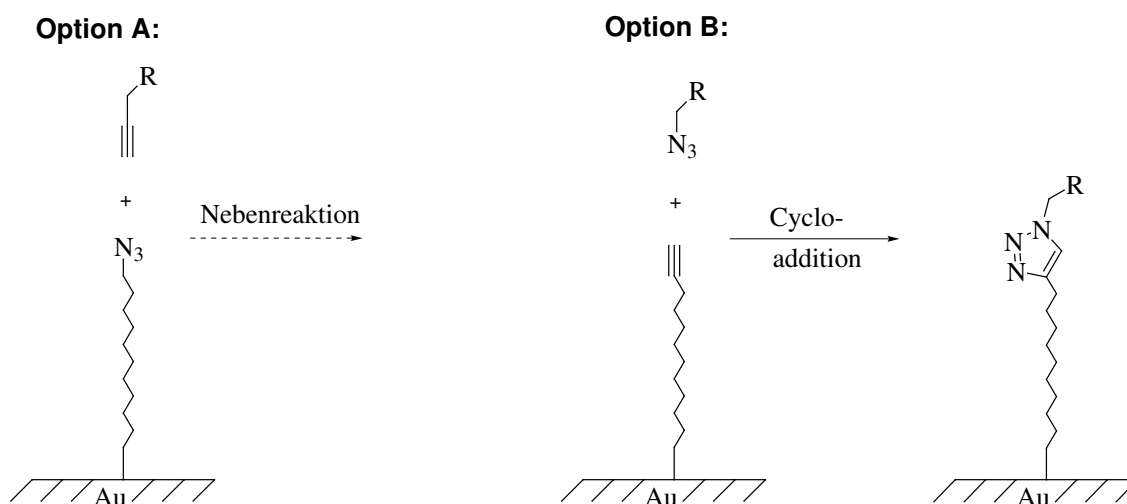


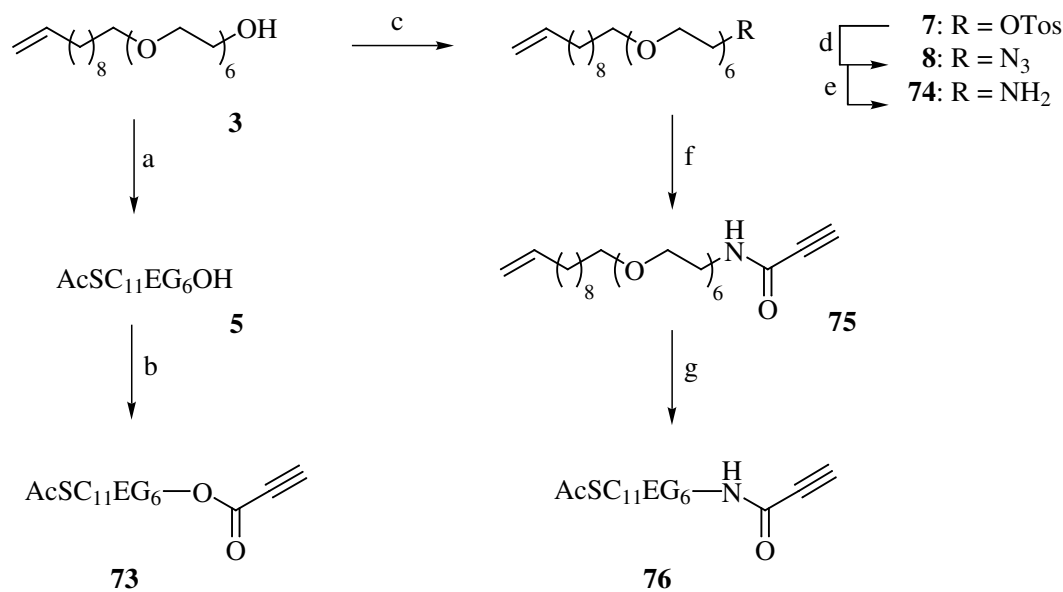
Abbildung 5.3: Zwei Strategien für „Click on SAM“

Da im umgekehrten Falle der Reaktion immobilisierter Alkine mit gelösten Aziden (Abbildung 5.3 B) diese unerwünschte Nebeneaktion nicht beobachtet wurde, wurden alle folgenden Synthesen entsprechend ausgerichtet. Das Thio-funktionalisierte Spacermolekül hatte die terminale Alkingruppe zu tragen und Kopfgruppen sollten Azid-funktionalisiert werden. Wieder wurden zwei parallele Syntheserouten verfolgt: Über einen internen Ester oder ein Amid sollte der Alkinterminus am langkettigen Spacer angebracht werden (Schema 5.24).

Die Sequenz zum Aufbau der Ester war einfach und lieferte ausgehend vom Alken **3** in einer kurzen zweistufigen Synthese effektiv das Alkin **73** in 71 %iger Ausbeute. Für die Synthese konnten Standardbedingungen angewandt werden, nach denen an das terminale Alken photochemisch Thioessigsäure addiert und der resultierende Alkohol **5** nach Aktivierung mit DCC und katalytischen Mengen DMAP mit Propiolsäure

verestert wurde. Mit dem Produkt **73** stand der erste Hexaethylenglycol-tragende Spacer mit Alkinterminus für die Huisgen-Cycloaddition zur Verfügung.

Da für die Cycloaddition auf der bereits immobilisierten Monoschicht eine möglichst rigide Struktur des SAMs optimal – wenn auch nicht essentiell – sein sollte, wurde neben dem Ester **73** ebenfalls der Aufbau des analogen Amids angestrebt. Hier wurde wieder mit der stabilisierenden Wirkung der intra-Schicht-Amidbrücken gerechnet.



Schema 5.24: Synthese des EG<sub>6</sub>-Spacers mit „Click“-Terminus. Reaktionsbedingungen: a) AcSH, AIBN, THF,  $h\nu$ , RT, 3 h, 97%; b) Propiolsäure, DCC, DMAP, DCM,  $-26^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 15 h, 73%; c) TosCl, DABCO, EE, 4 Å Molsieb,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 1.5 h, 82%; d) NaN<sub>3</sub>, TBAI, DMF,  $70^\circ\text{C}$ , 2 h, 97%; e) P(Ph)<sub>3</sub>, 1:1 THF / H<sub>2</sub>O, RT, 3 d, 63%; f) Propiolsäure, DCC, DCM,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 3 h, 70%; g) AcSH, AIBN, THF,  $h\nu$ , RT, 3 h, 83%.

Diese Synthese gestaltete sich als aufwendiger als beim vergleichbaren Ester. Beginnend mit dem Alkohol **3** wurde in der klassischen Sequenz zunächst das Tosylat **7** generiert. Nach dem Protokoll nach HARTUNG und HÜNIG konnte die Toluolsulfonsäuregruppe in guten 82% eingeführt werden. Das Tosylat wurde in das Azid **8** überführt, was in quantitativer Ausbeute möglich war. Anschließend wurde unter Staudinger-Bedingungen zum primären Amin **74** reduziert. Das Produkt konnte in 63% isoliert werden, wobei chromatographisch geringe Reste des intermediären Phosphanimins nicht restlos abgetrennt werden konnten. Wegen der Doppelbindung im Molekül schloß sich aber an dieser Stelle eine alternative Palladium-katalysierte Hydrierung mit Wasserstoff aus. Da es sich jedoch nur um nicht störende Nebenprodukte in zudem geringen Mengen handelte, wurde mit der anschließenden Peptidbindung fortgefahren. Die DCC-vermittelte Kupplung mit Propiolsäure lieferte das Amid **75**



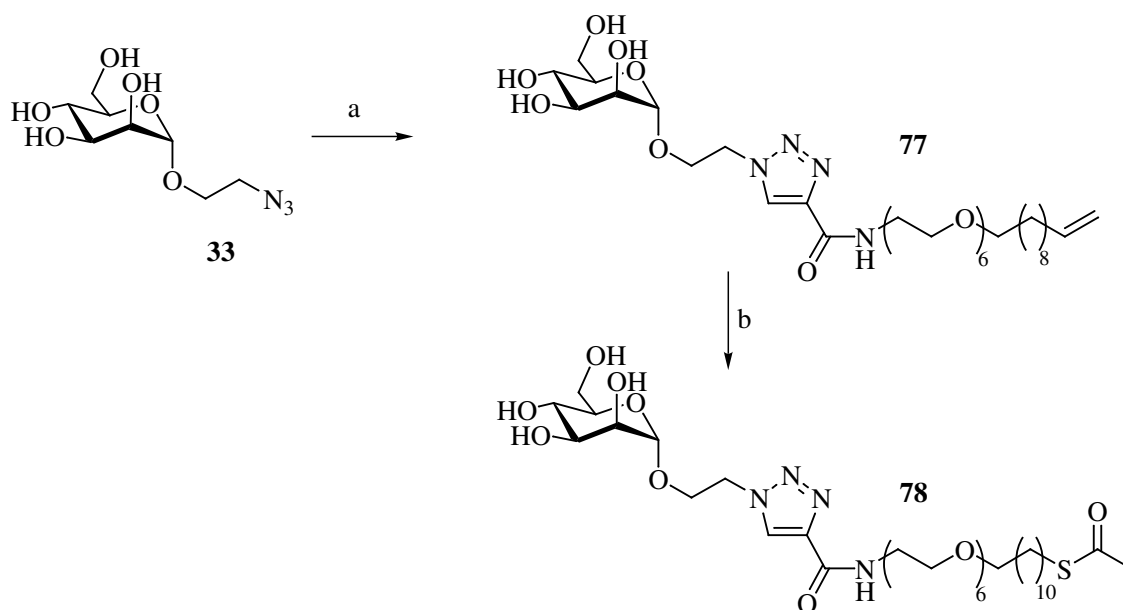
in guten 70 % Ausbeute. Erst an diesem Punkt in der Synthese konnte die Thioacetylierung der Doppelbindung erfolgen, um eine Wanderung der Acetylgruppe auf den Aminstickstoff auszuschließen. Die radikalische Addition von Thioessigsäure ergab das gewünschte Thioacetat **76** in sehr guten 83 % Ausbeute. Das durch die gleichzeitige Addition an die Dreifachbindung entstandene Molekül wurde als hauptsächliches Nebenprodukt eindeutig identifiziert. Es konnte ESI-massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Die hier gezeigten Reaktionsbedingungen mit einer relativ kurzen Reaktionszeit und einem im Strahlengang der UV-Beleuchtung installierten Wellenlängenfilter ( $\lambda \geq 295$  nm) geben die optimalen Bedingungen wieder.

Auf diese Weise konnte in guten 30 % in einer 5-stufigen Synthese ebenfalls der Amid-tragende Spacer **76** mit terminalem Alkin für die 1,3-dipolare Cycloaddition generiert werden.

### Amid-Linker

Das alkinterminierte Spacermolekül **75** wurde mit Azidoethylmannosid **33** über eine 1,3-dipolare Cycloaddition verbunden. Da es beim Aufbau des Thioacetats auch zur Bildung des unerwünschten zweifachen Additionsproduktes von AcSH an beide ungesättigte C–C-Bindungen gekommen war, wurde die Cycloaddition nicht mit **76**, sondern vor der Einführung der Schwefelfunktion durchgeführt (Schema 5.25). Außerdem konnte durch diese Sequenz überprüft werden, ob die Anwesenheit der Olefinfunktion zu Nebenreaktionen in der Huisgen-Cycloaddition führt.

Es zeigte sich, daß eine Doppelbindung im Molekül wie erwartet zu keiner Interferenz mit dem Azid im metallkatalysierten Schritt der Cycloaddition führte. Es wurden die optimierten Bedingungen mit einem 1:1-Lösungsmittelgemisch aus MeOH und DMF und 0.2 eq. Kupfer(I)iodid angewandt. Auf diese Weise wurden das Mannosid **33** und das Alkin **75** bei 45 °C erfolgreich der Cycloaddition unterzogen. Das Produkt **77** wurde in einer kurzen Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt und konnte mit guten 73 % Ausbeute erhalten werden. Im Anschluß daran wurde die Addition der Thioessigsäure photochemisch durchgeführt. Hier kam es allerdings aus ungeklärter Ursache zu einer unvollständigen Umsetzung. Die  $A_R$ -Reaktion verläuft zumeist mit quantitativer Ausbeute. Der Reaktionsverlauf wurde üblicherweise durch MALDI-ToF-Messungen verfolgt. Es konnte festgestellt werden, daß der Umsatz unvollständig war und trotz erneuter Zugabe von AcSH sowie AIBN als Radikalstarter kein zusätzliches Produkt gebildet wurde. Die Mischung aus Edukt und Produkt war chromatographisch äußerst schwer zu trennen, und dadurch konnte das Endprodukt **78** nur in mäßigen 40 % Ausbeute rein isoliert werden.



Schema 5.25: Synthese des Mannosid-tragenden Amid-Bausteins durch „Click“-Chemie. Reaktionsbedingungen: a) **75**, CuI, DMF / MeOH, 45 °C, 15 h, 73 %; b) AcSH, AIBN, THF,  $h\nu$ , RT, 5 h, 40 %.

### Ester-Linker

Das unverzweigte Azidoethylmannosid **33** sowie das komplexe (1→3), (1→6)-di-*O*-verknüpfte Trimannosid **79** wurden erfolgreich über ein 1,4-Triazol an den Ester **73** gekuppelt (Schema 5.26).

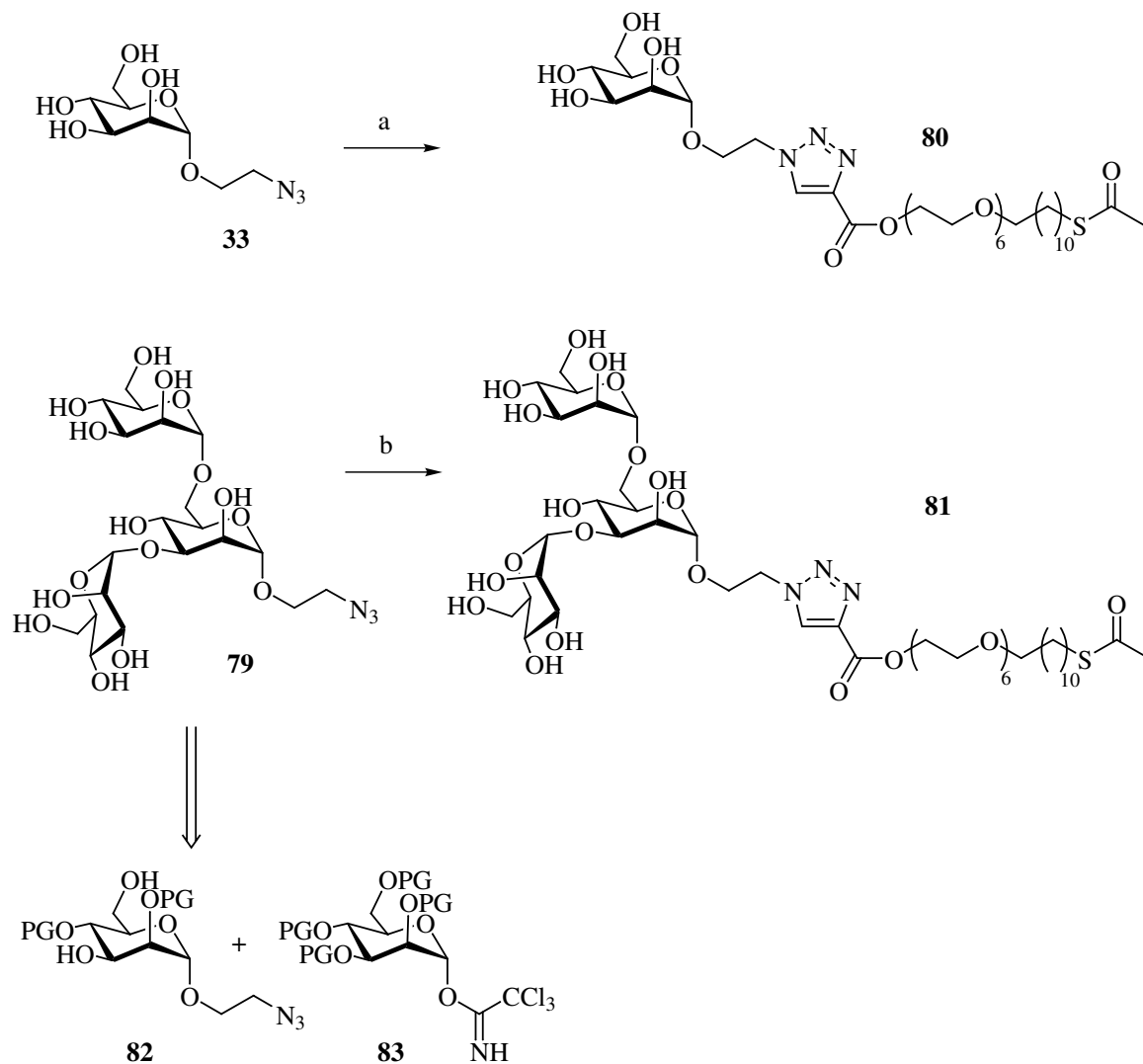
Da im Falle des Azidoethylmannosids **33** die Synthese noch vor den Optimierungsversuchen durchgeführt wurde, ist die Cycloaddition nach den alten Kupplungsbedingungen mit DIPEA in Acetonitril durchgeführt worden. So konnte das thiofunktionalisierte, gespacerte Mannosid **80** in moderaten 44 % isoliert werden.

Das Trimannosid **78** ist ein Kernbaustein aller N-Glycoproteine und daher für glycobiochemische Arbeiten hochrelevant. In diesem Zusammenhang steht auch die Synthese und Testung von Kohlenhydratstrukturen, die mit der Kohlenhydrat-erkennenden Domäne des FimH-Proteins wechselwirken.<sup>[188]</sup> Durch eine Hemmung der CRD ließe sich möglicherweise die Adhäsion von *E. coli* an Wirtszelloberflächen inhibieren.<sup>[218]</sup> Diese biologisch hochinteressante Struktur ist bisher noch nicht auf Monoschichten immobilisiert worden.

Für die Synthese von (1→3), (1→6)-verzweigten Mannotriosen gibt es zahlreiche literaturbekannte Verfahren, in denen auch unterschiedliche Aglycon-Einheiten beschrieben werden.<sup>[219, 220]</sup>

Der Aufbau des Azidoethyltrimannosids **79** wurde nach der Synthese von K. DÖGE durchgeführt.<sup>[221]</sup> Ausgehend vom Glycosyldonor **82** wurde durch Glycosylierung mit dem Trichloracetimidat **83** die Mannotriose in etwa 60 % generiert.

Die anschließende Cycloaddition nach optimierten Bedingungen mit dem polaren Lösungsmittelgemisch aus MeOH und DMF lieferte das Zielprodukt **81** in guten 70 %. Zur Aufreinigung wurde eine Gel-Permeationschromatographie an Sephadex LH-20 mit Methanol als Eluens gewählt.



Schema 5.26: Synthese der monomeren und der dendritischen, EG<sub>6</sub>-tragenden Mannoside durch 1,3-dipolare Cycloadditionen. Reaktionsbedingungen: a) **73**, CuI, DIPEA, MeCN, RT, 2 h, 44 %; b) **73**, CuI, DMF / MeOH, 45 °C, 15 h, 70 %

## 5.5 Fluoreszenzmarkierung

Die 1,3-dipolare Cycloaddition eignet sich generell sehr gut zur Verknüpfung zweier Moleküle. So lassen sich nicht nur Proteine miteinander verbinden oder Kohlenhydrate an Proteine heften, sondern es können auch kleine molekulare Einheiten auf einem Biopolymer oder -oligomer platziert werden. Gerade für den Fall von biologischen Systemen mit der ihnen eigenen strukturellen Komplexität und Diversität an funktionellen Reaktivitäten bietet sich die Huisgen-Cyloaddition an. Als Beispiel für die von Biochemikern oder Chemikern häufig angewandten Methoden sei die Installation von Affinitätsmarkern wie beispielsweise Biotin<sup>[222]</sup> oder auch die Fluoreszenzmarkierung hervorgehoben.<sup>[223]</sup>

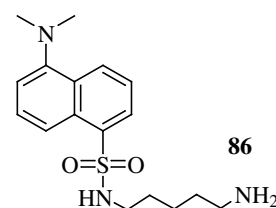
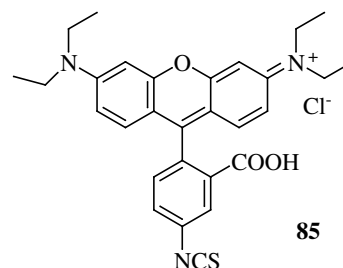
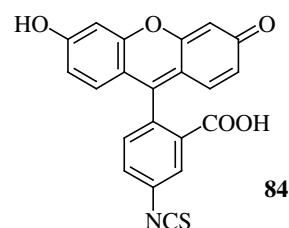
Es sind einige Beispiele beschrieben, in denen Fluoreszenzmarker durch einen für die Cycloaddition geeigneten Terminus „click-bar“ gemacht worden sind. Dabei fanden die gängigen Fluoreszenz-tragenden Gruppen wie Fluorescein **84**,<sup>[175, 208, 224]</sup> Rhodamin **85**<sup>[225]</sup> oder Dansylcadaverin **86**<sup>[226]</sup> Verwendung.<sup>[98]</sup>

Wie bereits in Abschnitt 5.2.3 angedeutet wurde, ist es wünschenswert, die exakte Dichte von rezeptorischen Einheiten, die auf einer biorepulsiven Oberfläche eines SAM exponiert sind, zu bestimmen. Nur auf diese Weise können Meßergebnisse, die beispielsweise anhand von SPR-Untersuchungen ermittelt wurden, quantitativ ausgewertet werden. Gerade im Falle von sterisch anspruchsvollen Kopfgruppen, die zusammen mit biologisch inerten Verdünnungsmolekülen auf die Oberfläche aufgebracht werden, ist eine *einheitliche Fixierung* der Thiobausteine im *definierten Verhältnis*, wie sie in der Immobilisierungslösung vorgegeben wurde, idealerweise zu überprüfen.

Mit dem Know-How zum Aufbau gemischt-funktionalisierter, dendritischer Bausteine (Abschnitt 5.2.3) stand beispielsweise in Form des Mannosids **53** ein Molekül zur Verfügung, das zur Immobilisierung auf Au-Wafern geeignet war. Hierbei war durch die enthaltene terminale Alkin-Funktionalität ebenfalls die Möglichkeit zur weiteren Funktionalisierung gegeben.

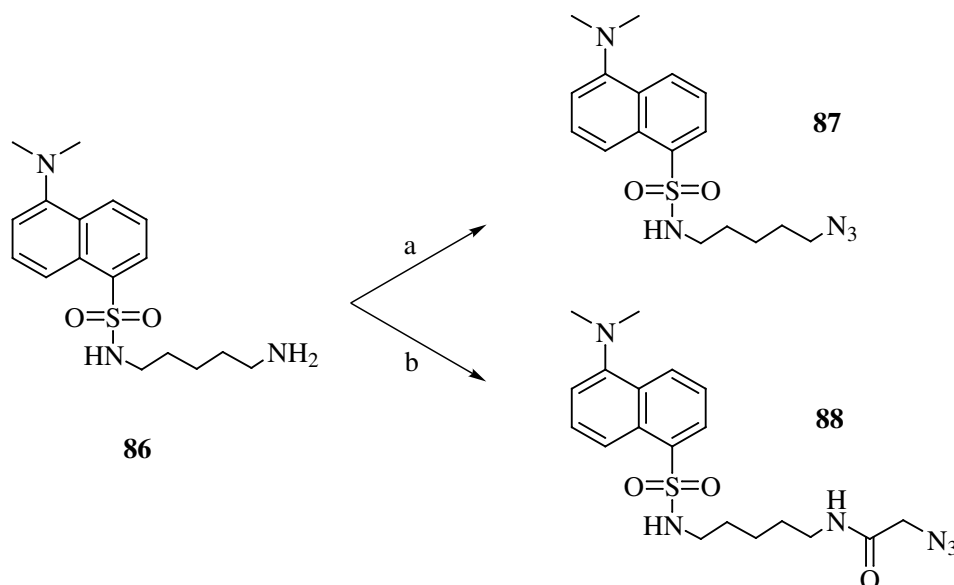
Es wurden eingangs Versuche mit Rhodamin B Isothiocyanat **85** unternommen, allerdings unterliegt dieses Molekül einer massiven Tautomerie durch ein pH-abhängiges Gleichgewicht, was die NMR-Analytik stark erschwert.<sup>[227, 228]</sup>

Zur Fluoreszenzmarkierung wurde stattdessen mit Dansylcadaverin ein relativ kostengünstiger aromatischer Bicyclus gewählt. Die maximale Emmisionswellenlänge



beträgt  $Em_{max} = 508$  nm und da die Extinktion in MeOH bei  $Exc. = 335$  nm liegt, kann die Dansylgruppe mit üblichen Lichtquellen und Filtersets visualisiert werden.

Dansylcadaverin besitzt eine terminale Aminofunktion, die in eine Azidfunktion überführt werden mußte (Schema 5.27). Hier bieten sich die beiden in Schema 5.21 als **A** und **B** bezeichneten Optionen an. Zum einen wurde Triflylazid hergestellt, was anschließend in Gegenwart von Kaliumcarbonat und Kupfersulfat das Dansylazid **87** in 63 % Ausbeute lieferte.



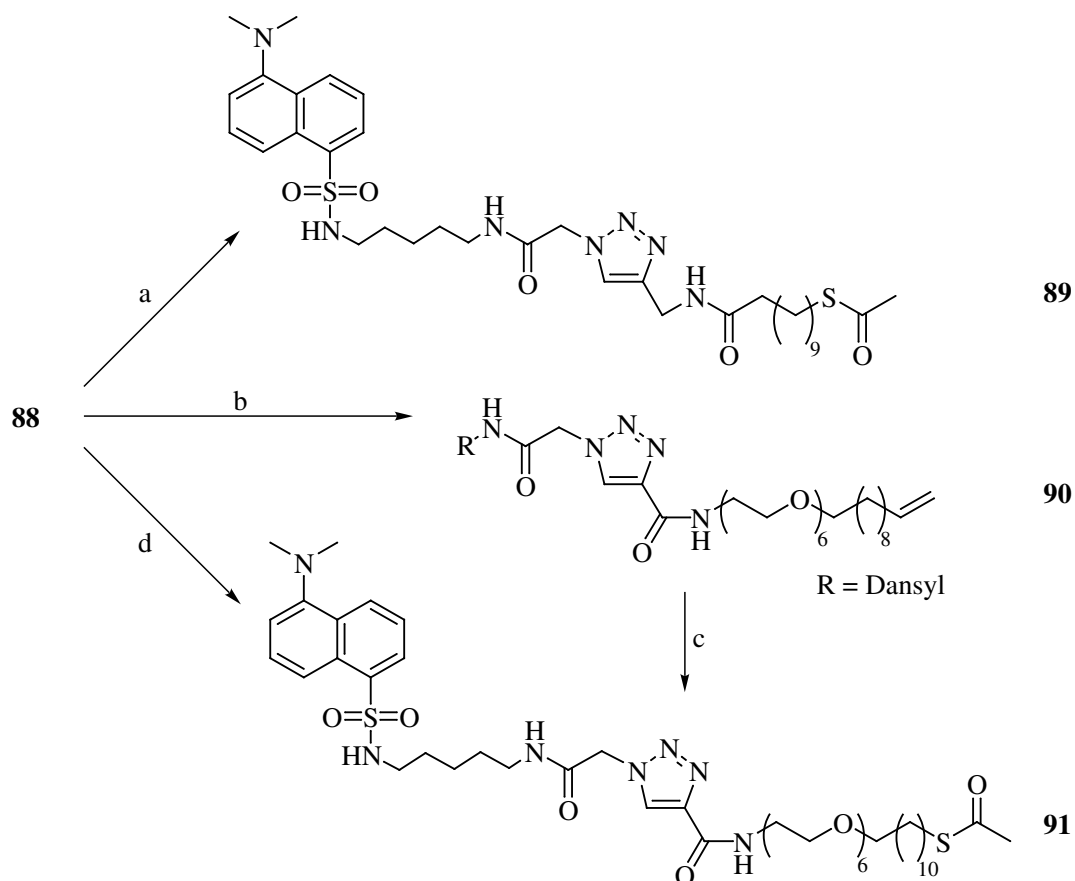
Schema 5.27: Synthese eines „click-baren“ Fluoreszenzmarkers aus Dansylcadaverin. Reaktionsbedingungen: a)  $TfN_3$ ,  $K_2CO_3$ ,  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ ,  $H_2O / MeOH$ , RT, 15 h, 63 %; b) **68**, DCC, HOBT, DCM,  $0^\circ C \rightarrow RT$ , 15 h, 92 %.

Zum anderen führte die Peptidkupplung von **86** mit der Carbonsäure **68** unter Standardbedingungen mit DCC / HOBT in ausgezeichneten 92 % zum Azidoessigsäureamid **88**. Die Säulenchromatographie des Rohprodukts wurde bei abgedunkeltem Licht mit schwacher UV-Beleuchtung durchgeführt. Auf diese Weise war die Trennung der Fraktionen optisch erkennbar und machte eine Dünnschichtkontrolle obsolet.

Dieser stark fluoreszente Baustein wurde nun mit verschiedenen Spacern über ein 1,4-Triazol gekuppelt (Schema 5.28). Das Dansylazid wurde zunächst mit der  $C_{11}$ -Alkinkomponente **54** unter den alten „Click“-Bedingungen in Acetonitril mit DIPEA bei  $45^\circ C$  zur Reaktion gebracht. Nach säulenchromatographischer Trennung an Kieselgel konnte die thiofunktionalisierte Verbindung **89** mit guten 84 % Ausbeute isoliert werden.

Für die Kupplung mit dem Hexaethylen-Spacer wurde die Cycloaddition wieder zunächst mit dem thiofreien Alkin **77** durchgeführt (Schema 5.28). Die optimierten,

basenfreien Kupplungsbedingungen mit Kupfer(I)iodid unter Verwendung des 1:1-Gemisches von Methanol und DMF lieferte das Alken **90** mit einer befriedigenden Ausbeute von 61 %. Die anschließende Thioacetylierung ergab jedoch aus unbekannter Ursache nur eine geringe Umsetzung von etwa 10 %. Wurde die Cycloaddition allerdings mit dem bereits thiofunktionalisierten Alkin-Baustein **76** durchgeführt, so konnte das erwünschte Zielprodukt **90** in befriedigender Ausbeute von etwa 60 % isoliert werden.



Schema 5.28: Synthese der immobilisierbaren Fluoreszenzlabel durch „Click-Chemie“. Reaktionsbedingungen: a) **54**, CuI, DIPEA, MeCN, 45 °C, 15 h, 84 %; b) **75**, CuI, DMF / MeOH, 45 °C, 15 h, 61 %; c) AcSH, AIBN, THF,  $h\nu$ , RT, 2 h, 10 %; d) **76**, CuI, DMF / MeOH, 45 °C, 15 h, 59 %.

## 5.6 SAM-Bildung

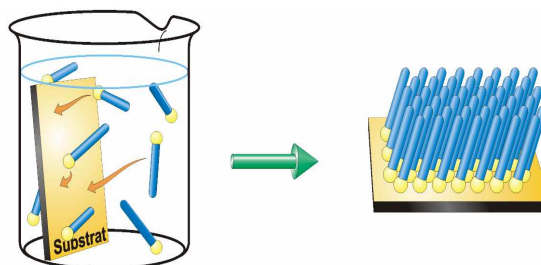
Einige der beschriebenen Moleküle wurden auf Gold-bedampften Glasplatten immobilisiert, um anschließend Untersuchungen über die Dicke der gebildeten Monoschichten sowie ihrer Biorepulsivität durchführen zu können. Darüber hinaus wurden an BIAcore-Geräten SPR-Messungen durchgeführt (Kapitel 5.7).

Bei den verwendeten Wafern handelte es sich um Glasplättchen, auf die zunächst eine 50 Å dicke Chromschicht, gefolgt von einer 200 nm starken Goldschicht gedampft wurde. Es wurden auf jedem Wafer drei Meßpunkte markiert und alle Meßergebnisse über die drei Punkte gemittelt. Diese Substrate wurden unmittelbar vor der Immobilisierung für 30 s im Wasserstoffplasma gereinigt.

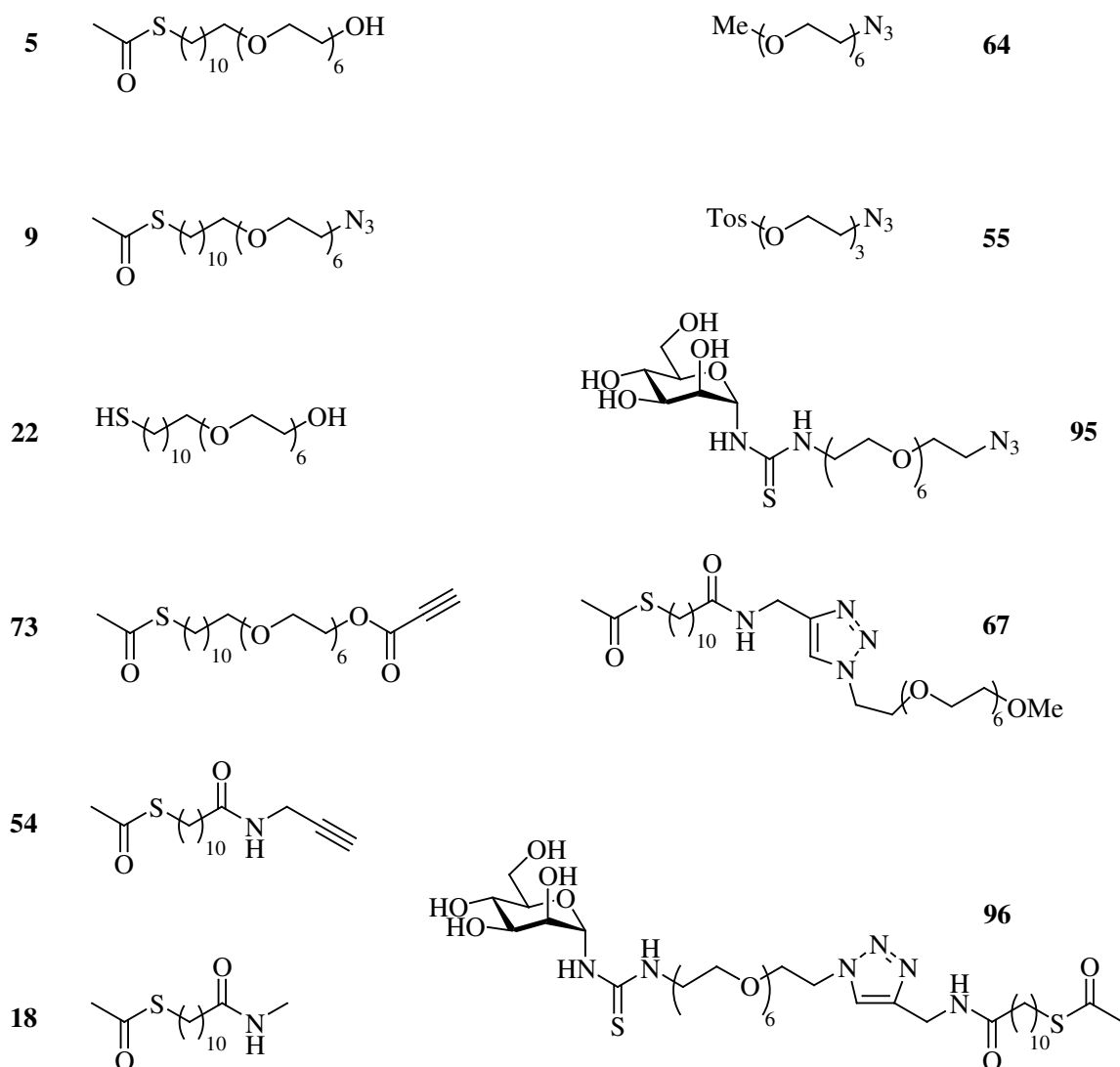
Zur Quantifizierung der Repulsivität der Schichten gegenüber unspezifischer Adhäsion von Proteinen wurde eine BSA-Lösung verwandt. Der Analyt wurde jeweils frisch angesetzt und bestand aus einer Lösung von 1 mg / ml BSA in Phosphatpuffer, der auf pH 7 eingestellt war. Nach 2 h Einwirkung der Lösung auf den SAM wurde gründlich mit *aqua dem.* gespült und im Stickstoffstrom trocken geblasen. Als Referenz diente in jedem Versuch eine unbeschichtete Au-Probe. Die präparativen Arbeiten wurden von T. WINKLER im Arbeitskreis von PD Dr. A. TERFORT, Universität Hamburg, durchgeführt.

### 5.6.1 Immobilisierung

Die Immobilisierung der Thiokomponente erfolgte aus einer 5 mM ethanolischen Lösung, die zuvor entgast worden war. Die Goldplättchen wurden bei RT unter Schutzgas in die Lösung eingelegt und für 12 - 16 h ruhen gelassen. Anschließend wurde der Wafer sofort mit viel Ethanol gespült, im Stickstoffstrom trocken geblasen und vermessen.



Ziel von Voruntersuchungen war es zu erkunden, wie sich Alkin- und Azid-terminierte SAMs auf Gold darstellen lassen. Dann sollte untersucht werden, ob die 1,3-dipolare Cycloaddition direkt auf der Goldoberfläche an immobilisierten Molekülen realisierbar ist und welche Bedingungen hierfür ideal sind. Ziel dieser Untersuchungen war es, die Oberflächeneigenschaften u. a. im Hinblick auf „anlickbare“ Biorepulsivität zu modifizieren. Durch die *schaltbare Funktionalisierbarkeit* der Oberfläche ließen sich mit der Installation geeigneter Strukturen beispielsweise aus bereits etablierten selbstangeordneten Monoschichten sensorische Oberflächen generieren.



Schema 5.29: Übersicht der zur Immobilisierung auf Gold eingesetzten Thioacetate sowie der zur Cycloaddition auf SAMs verwandten Moleküle.

**Schichtbildung** Die Bildung der Schichten aus den Schwefel-tragenden Komponenten wurde per Ellipsometrie untersucht. Für die Bausteine **18** und **54** wurde festgestellt, daß die aufgebauten SAMs Schichtdicken aufwiesen, die im erwarteten Bereich lagen (Tabelle 5.2): Es wurden aus theoretischen Berechnungen etwa 17–18 Å vorausgesagt, und die gemessenen Werte lagen zwischen 16 und 20 Å mit Fehlergrenzen von etwa 2.4 Å. Im Rahmen der Meßgenauigkeit sind die ermittelten Werte akzeptabel bis gut.

Wurden vergleichbare Messungen mit den Hexaethylenglycol-tragenden Molekülen **5** und **9** durchgeführt, so zeigten die gemessenen Schichtdicken signifikant ge-



ringere Werte als in der Berechnung. Als mögliche Ursache für die Diskrepanz zwischen Theorie und Praxis konnte angenommen werden, daß die Ausbildung der Monoschichten unvollständig verlaufen war und sich eine einheitliche Schicht im Prozeß der Selbstanordnung nicht gebildet hatte. Hierfür sprachen auch die Ergebnisse der Untersuchungen zur Biorepulsivität.

**BSA-Repulsivität** Die Moleküle **18** und **54**, die keinen EG<sub>6</sub>-Abschnitt enthalten, zeigten wie erwartet eine nur schwach ausgeprägte Unterdrückung der unspezifischen Adhäsion von BSA aus einer Analytlösung. Im Vergleich zur unbehandelten Referenz, auf der BSA mit einer Dicke von etwa 27 Å physisorbierte, wurden hier zwischen 8 und 18 Å gefunden. Dagegen sollte BSA-Adhäsion auf den SAMs, auf denen Hexaethylenglycoleinheiten aus **5** und **9** immobilisiert waren, keine Zunahme der Schichtdicke zulassen. Hier wurde aber unerwartet eine starke Adhäsion in Höhe von 20–25 Å gefunden. Diese Schichten waren also keineswegs biorepulsiv. Es wurde angenommen, daß die unvollständig aufgebauten Schichten die Ursache für die BSA-Anlagerung sind.

Um zunächst weiterführende Experimente zur Optimierung der Immobilisierung durchzuführen, wurden die EG<sub>6</sub>-freien Spacer **18** und **54** eingesetzt. Hierbei handelt es sich beim Alkin **54** zum einen um ein potentiell Molekül für eine „Click“-Reaktion auf dem SAM und zum anderen um das Methyramid **18**, das ein sinnvolles „Verdünnungsmolekül“ hierzu darstellt.

Tabelle 5.2: Schichtbildung und BSA-Repulsivität einiger Thioacetate

Verbindung	d (SAM) [Å]	d (SAM) <sub>theor.</sub> [Å]	Δd (BSA) [Å]
AcSC <sub>10</sub> C(O)NHMe <b>18</b>	16.0 ± 2.4	16.6	8.3 ± 2.4 †
AcSC <sub>10</sub> C(O)NHCH <sub>2</sub> C≡CH <b>54</b>	20.6 ± 1.2	17.6	17.9 ± 2.0 *
AcSC <sub>11</sub> EG <sub>6</sub> OH <b>5</b>	11.1 ± 1.3	33.7	20.5 ± 2.8 *
AcSC <sub>11</sub> EG <sub>6</sub> N <sub>3</sub> <b>9</b>	15.9 ± 0.9	34.2	25.1 ± 1.2 *

\* : Δd (BSA) unbehandelter Au-Wafer: 26.2 ± 0.5 Å

† : Δd (BSA) unbehandelter Au-Wafer: 27.0 ± 0.6 Å

**Thermische Stabilität** Es wurde überprüft, ob Temperaturerhöhung Einfluß auf bereits immobilisierte Verbindungen nimmt, sowie, ob es zur Desorption oder Zerstörung des SAM kommt. Hierzu wurde ein gemischter SAM aus einer 1 : 1-Mischung aus **54** sowie **18** aufgebaut und in Acetonitril als dem üblichem Lösungsmittel für die

„Click-Reaktion“ für 5 h behandelt (Tabelle 5.3). Durch die Acetonitrilbehandlung nahm die Schichtdicke minimal ab, jedoch lag die Änderung im Rahmen der Meßgenauigkeit. Ein negativer Einfluß der erhöhten Temperatur konnte demnach nicht gefunden werden – die Monoschichten auf Gold waren bis mindestens 80 °C stabil (vergl. Tab. 5.3, # 1 – # 4).

Tabelle 5.3: Einfluß der Temperatur auf die Stabilität eines gemischten SAM

#	Verbindung <sup>§</sup>		d (SAM) <sub>vorher</sub> [Å]	d (SAM) <sub>nachher</sub> [Å]	T [°C]	Δd (BSA) [Å]
1	1 : 1	<b>18</b> : <b>54</b>	14.1 ± 0.3	13.1 ± 0.2	50	
2	1 : 1	<b>18</b> : <b>54</b>	12.6 ± 0.3	12.9 ± 0.5	60	
3	1 : 1	<b>18</b> : <b>54</b>	14.2 ± 0.1	13.1 ± 0.2	70	
4	1 : 1	<b>18</b> : <b>54</b>	16.1 ± 0.4	13.7 ± 1.0	80	
5	1 : 1	<b>73</b> : <b>22</b>	20.9 ± 0.3	24.1 ± 0.7	50	3.7 ± 1.6 *
6	1 : 2	<b>73</b> : <b>22</b>	22.0 ± 0.5	23.1 ± 1.2	50	4.1 ± 2.3 *

<sup>§</sup> : Vergl. Schema 5.29 auf Seite 88

\* : Δd (BSA) unbehandelter Au-Wafer: 23.7 ± 0.6 Å

Da durch eine erhöhte Temperatur eine bessere Ausbildung der Monoschichten vermutet wurde, wurden nun bei 50 °C gemischte SAMs aus **22** und **73**, die einen Ethylenglycolspacer enthielten, aufgebaut (siehe # 5 und # 6). Auch hier hat eine 5-stündige thermische Behandlung der SAMs in Acetonitril nach der Immobilisierung die Schichtdicken nicht wesentlich verändert. Bei diesen Monoschichten handelte es sich aber nun um fast vollständig biorepulsive Schichten. Es wurden nur 3–4 Å Schichtdickenzunahme durch die BSA-Behandlung gemessen im Vergleich zu 24 Å bei der unbeschichteten Referenz. Offenbar kam es durch die erhöhte Temperatur während der Phase der Selbstanordnung zu einer besseren und vollständigen Ausbildung der Monoschichten. Alle folgenden Immobilisierungsexperimente wurden daher bei 50 °C durchgeführt.

## 5.6.2 Click auf SAM

Es wurden mehrere Meßreihen zur Untersuchung der 1,3-dipolaren Cycloaddition auf Monoschichten auf Au angestellt. Zunächst wurden vergleichend das Thioacetat-haltige Azid **9** und das EG<sub>6</sub>-freie Alkin **54** immobilisiert und eine Cycloaddition nach SHARPLESS-Protokoll untersucht (Tabelle 5.4). Bei allen Experimenten wurde ein 1 : 1-Verhältnis der beiden Cycloadditionsedukte eingehalten und eine Konzentration

von 5 mM in entgastem Acetonitril eingestellt. Es wurden als Base 1.3 eq. DIPEA und ein Überschuß an CuI eingesetzt.

Tabelle 5.4: „Click on SAM“ an  $\text{AcSC}_{11}\text{EG}_6\text{N}_3$  **9** und  $\text{AcSC}_{10}\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$  **54**

Verbindung <sup>§</sup>	d (SAM) [Å]	d (SAM) <sub>theor.</sub> [Å]	$\Delta d$ (click) [Å]	$\Delta d$ (click) <sub>theor.</sub> [Å]	$\Delta d$ (BSA) * [Å]
<b>9</b>	$15.7 \pm 0.6$	34.2	$3.5 \pm 1.3$ †	15.8	$19.2 \pm 1.7$
<b>54</b>	$20.6 \pm 1.2$	18.8	$10.8 \pm 1.2$ ‡	23.7	$10.6 \pm 1.1$

§ : Vergl. Schema 5.29 auf Seite 88

\* :  $\Delta d$  (BSA) unbehandelter Au-Wafer:  $26.2 \pm 0.5$  Å

† : „Click“ mit  $\text{C}_{12}\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$  ‡ : „Click“ mit  $\text{N}_3\text{EG}_6\text{Tos}$

Offensichtlich war die Cycloaddition auf dem Azid-terminierten SAM mißlungen. Hierfür sprach zum einen die vergleichsweise hohe BSA-Adhäsion von 19 Å im Vergleich zu 26 Å bei der unbehandelten Probe. Des weiteren wurde eine deutlich zu geringe Schichtdickenzunahme nach der „Click“-Reaktion ermittelt: Statt einer theoretischen Dicke von etwa 16 Å wurden nur etwa 4 Å gemessen. Darüber hinaus konnte das Ausfallen eines schwerlöslichen Niederschlags aus der „Click“-Lösung beobachtet werden, was auf die Bildung von Nebenprodukten schließen läßt.

Die Reaktion auf der Monoschicht, die das  $\text{C}_{11}$ -Alkin **54** trug, zeigte mit 11 Å ebenfalls eine geringere Steigerung der Schichtdicke als die erwarteten 24 Å. Hier war die Differenz allerdings nicht so eklatant. Ferner konnte eine deutliche Unterdrückung der unspezifischen Adhäsion von BSA an die Oberfläche festgestellt werden.

Die Ursachen für die nicht vollständig oder einheitlich aufgebauten Monoschichten mußten gefunden werden. Da es wiederholt zu Nebenreaktionen für den Fall von gelösten Alkinen und oberflächengebundenen Aziden kam, wurde im folgenden ein Schwerpunkt auf die „Click“-Reaktion von Aziden aus der Lösung mit immobilisierten Alkinen gelegt (vgl. Option **B** in Abbildung 5.3 auf Seite 79). Die Cycloaddition wurde zwischen dem Alkin **54** und dem Azid **64** durchgeführt und anhand verschiedener Parameter evaluiert. Dieses System eignete sich besonders für Optimierungsansätze, da die initiale Immobilisierung mit dem Alkinyl-Baustein reproduzierbar sehr gut definierte und einheitliche Monoschichten bereitstellte, die die theoretisch berechnete Schichtdicke von etwa 20 Å aufwiesen. Diese SAMs waren, da sie noch keinen Oligoethylenglycolteil trugen, nicht biorepulsiv, und diese Eigenschaft sollte durch eine „Click“-Reaktion mit dem  $\text{EG}_6$ -Methylether **64** auf dem Wafer eingeführt werden.

Es wurde festgestellt, daß durch die Reaktion mit dem  $\text{EG}_6$ -Azid eine Schichtdicke resultierte, die viel zu groß war. Entgegen der theoretisch erwarteten 20 Å Schicht-

dickenzunahme wurden rund 60 Å gefunden (Tab. 5.5, # 1). Wurde die Monoschicht unmittelbar nach der Cycloaddition mit der BSA-Analytlösung behandelt, so kam es zu einer signifikanten Verringerung der Schichtdicke von etwa -40 Å. Offenbar wurde auf der Schicht während der „Click-Reaktion“ viel unreaktiertes Edukt angelagert, was die Höhe der Monoschicht stark vergrößerte. Durch die Behandlung mit wässriger BSA-Lösung wurde dieser Überschuß dann von der Schicht gewaschen. Nur so ist die erhöhte Belegung und anschließende, negative Änderung der Schichtdicke erklärbar. Um dies zu eruieren, wurde der Wafer nach der Cycloaddition für 2 h mit *aqua dem.* gespült.

Tabelle 5.5: Variation der Reaktionsbedingungen für „Click on SAM“ mit **64** an unverdünntem Alkin **54**-SAM

#	Verbindung §	d (SAM) [Å]	$\Delta d$ (click) [Å]	$\Delta d$ (click) <sub>theor.</sub> [Å]	$\Delta d$ (BSA) [Å]	Zeit [h]	Temp. [°C]
1	<b>54</b>	20.4 ± 0.4	61.3 ± 3.5	18.6	-37.5 ± 4.4 *	16	RT
2	<b>54</b>	20.3 ± 0.8	11.4 ± 1.0	18.6	4.9 ± 0.8 †	16	RT
3	<b>54</b>	15.7 ± 0.6	10.7 ± 0.8	18.6	9.0 ± 0.6 †	1	50
4	<b>54</b>	15.8 ± 0.9	11.1 ± 1.0	18.6	11.0 ± 1.9 †	2	50
5	<b>54</b>	21.9 ± 0.4	11.6 ± 0.7	18.6	2.2 ± 0.7 †	4	50
6	<b>54</b>	21.5 ± 1.1	11.4 ± 1.7	18.6	1.2 ± 1.5 †	8	50
7	<b>54</b>	17.8 ± 0.7	14.9 ± 1.6	18.6	0.5 ± 2.6 †	16	50

§ : Vergl. Schema 5.29 auf Seite 88

\* :  $\Delta d$  (BSA) un behandelter Au-Wafer: 27.0 ± 0.6 Å

† : 2 h mit *aqua dem.* gespült,  $\Delta d$  (BSA) un behandelter Au-Wafer: 26.1 ± 0.3 Å

Die derartig erhaltenen Schichtdicken sprachen für die Hypothese der Physisorption auf sowie Einlagerung von „Click-Azid“ in der Monoschicht. Nach dem Waschprozeß konnten realistische Werte für Schichtdicke und BSA-Repulsivität gemessen werden (siehe Tab. 5.5, # 2).

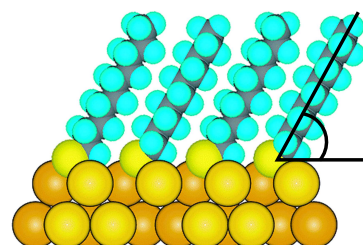
Um die Ausbildung einer geordneten Monoschicht zu untersuchen, wurde neben der Temperatur (Tabelle 5.3) auch die Reaktionszeit der Cycloadditionen auf dem SAM variiert (vergl. Tab. 5.5, # 3–7). Durch die Messung der unspezifischen Adhäsion von BSA auf der Oberfläche ließ sich auf diese Weise halbquantitativ die einheitliche Anordnung der Schicht überprüfen. Es wurde festgestellt, daß bei einer Reaktionszeit von ca. 1–4 h die Schichtdicke zwar schwach anstieg, daß aber auch bei verlängerter Reaktionsdauer keine signifikante Änderung bemerkbar war. Allerdings konnte bei Reaktionen ab etwa 8 h im Rahmen der Meßgenauigkeit zum ersten Mal eine voll-

ständige Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen des Serum Albumins mit der Oberfläche beobachtet werden (siehe # 6–7).

Betrachtet man allgemein die bis dahin erhaltenen Werte für die Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen von BSA mit den generierten Oberflächen, so ließ sich zwar z. T. eine befriedigende Biorepulsivität feststellen, jedoch blieben die Ergebnisse hinter den Erwartungen zur vollständigen Abwehr solcher Interaktionen zurück. Insbesondere für die angestrebten Untersuchungen mit biorelevanten Kopfgruppen und die dafür notwendige quantitative Messung spezifisch bindender Lektine sollte jedoch eine weitestgehende Unterbindung von nicht selektiv haftendem Albumin gewährleistet werden können. Entsprechend wurden alle Folgeexperimente mit einer Cycloaddition auf einem Alkin-terminierten SAM über 16 h bei einer Temperatur von 50 °C durchgeführt.

Die Dicke der Schichten nach der Cycloaddition war mit ca. 11–15 Å stets 20–30 % geringer als theoretisch berechnet (siehe # 2–7). Als Ursache waren mehrere Erklärungen denkbar. Es konnte sich einerseits um einen systematischen Fehler der Messungen handeln, weil alle Werte unter den Berechnungen der Theorie lagen. Eine Erklärung für einen globalen Meßfehler konnte aber nicht gefunden werden, und wiederholte Messungen mit jeweils aus drei Meßpunkten erhaltenen Durchschnittswerten ergaben reproduzierbare Ergebnisse. Andererseits konnte der Fehler auch in der Theorie liegen.

Generell wurden für die Berechnung der Schichtdicken  $d(\text{Schicht})_{\text{theor.}}$  die theoretisch maximalen Längen der kettenförmigen Thiobausteine mit  $n$  Methylengruppen zugrunde gelegt und daraus die Höhe der Schicht unter Einbeziehung einer Kettenverkipfung um 30° relativ zur Oberfläche berechnet (Gl. 5.1). Dieser Winkel gilt streng jedoch nur für  $n$ -Alkylthioverbindungen auf Au(111)-Substraten.<sup>[229, 230]</sup>



$$d(\text{Schicht})_{\text{theor.}} = (1.27 \text{ \AA} \cdot n + 4 \text{ \AA}) \cdot \underbrace{\sin 60}_{30^\circ \text{ Kippung}} \quad (5.1)$$

Als weitere mögliche Ursache wurde angenommen, daß es im Verlauf der „Click-Reaktion“ durch die Bildung der 1,4-Triazole zu einer sterischen Hinderung kam. Es wurde vermutet, daß die Struktur der gestreckten, sterisch wenig anspruchsvollen Alkine durch die Bildung der Triazole stark aufgeweitet wird, so daß die vollständige Reaktion aller Alkine der Schicht möglicherweise verhindert wird.

Es wurden daher gemischte SAMs aufgebaut, wobei der Anteil an biologisch inaktivem Verdünnungsmolekül variierte (Tabelle 5.6). Um vorab zu testen, ob das einzusetzende Methylamid **18** unter den gegebenen Sharpless-Bedingungen stabil und inert ist, oder ob es zu einer Physisorption des Azids **64** kommt, wurde eine Monoschicht des Verdünnungsbausteins **18** immobilisiert und der Au-Wafer den „Click“-Bedingungen unterzogen.

Tabelle 5.6: „Click on SAM“ mit verdünnten Thioacetaten

#	Verbindung <sup>§</sup>	d (SAM) [Å]	d (SAM) <sub>theor.</sub> [Å]	$\Delta d$ (click) [Å]	$\Delta d$ (click) <sub>theor.</sub> [Å]	$\Delta d$ (BSA) [Å]
1	<b>18</b>	12.2 ± 0.4	16.6	-0.6 ± 1.0	16.6	—
2	1:0 <b>54</b> / <b>18</b>	17.8 ± 0.7	18.8	14.9 ± 1.6	18.6	0.5 ± 2.6 *
3	1:3 <b>54</b> / <b>18</b>	16.4 ± 1.0	17.2	12.0 ± 1.6	5.0	1.0 ± 1.7 *
4	1:4 <b>54</b> / <b>18</b>	18.9 ± 0.9	17.0	7.0 ± 1.1	4.0	11.2 ± 0.8 *
5	<b>67</b>	19.9 ± 2.7	37.4			1.8 ± 3.2 †
6	1:1 <b>73</b> / <b>22</b>	26.2 ± 1.0	35.3	-11.6 ± 1.3	9.9	2.9 ± 1.2 *

<sup>§</sup> : Vergl. Schema 5.29 auf Seite 88

\* :  $\Delta d$  (BSA) unbehandelter Au-Wafer: 19.2 ± 1.7 Å

† :  $\Delta d$  (BSA) unbehandelter Au-Wafer: 27.1 ± 5.4 Å

Es konnte gezeigt werden, daß das Amid **18** recht gute Schichten aufbaute und die Sharpless-Bedingungen der Cycloaddition im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht zur Desorption des immobilisierten Bausteins oder anderer Nebenreaktionen wie beispielsweise Abscheidungsprozessen des Kupferkatalysators führte (siehe Tab. 5.6, # 1).

Wurde das „click-bare“ Alkin **54** allein immobilisiert, so konnte erwartungsgemäß die berechnete Schichtdicke von ca. 19 Å gut angenähert werden (siehe # 2). Die Werte nach der Cycloaddition bestätigten die Meßergebnisse aus Tabelle 5.5: Die Höhe der Monoschicht mit internem Triazol lag mit Werten um 15 Å etwas unter den mathematisch ermittelten Werten. Allerdings konnte an diesem Beispiel hervorragend bewiesen werden, daß durch die „Click“-Reaktion die Oberflächeneigenschaft der Biorepulsivität modifiziert werden konnte. Es kam zu keiner meßbaren Anlagerung der BSA-Analytlösung.

Wurde der „Click“-Baustein **54** gemeinsam mit dem Methylamid **18** auf die Goldschicht gebracht, so ergaben sich je nach Verdünnung ebenfalls sehr gute Monoschichten mit den erwarteten Schichtdicken (siehe Tab. 5.6, # 3–4). Durch die Cycloaddition mit dem Azid wurde wieder eine biorepulsive Einheit eingeführt, die die BSA-Lösung z. T. sehr wirkungsvoll von der unspezifischen Adhäsion bewahrte. Man

konnte hierbei feststellen, daß der Grad der Verdünnung entscheidend für das Ausmaß der Hemmung der Albuminadhäsion ist. So wurde bei einer 1:3-Verdünnung von Alkin:Methylamid noch eine nahezu vollständige Repulsivität gegenüber BSA ermittelt, wohingegen schon bei einem Verhältnis von 1:4 eine markante Steigerung der BSA-Adhäsion gemessen wurde, die *de facto* nicht mehr als Biorepulsivität in diesem Kontext bezeichnet werden kann.

Zum Vergleich wurde das Triazol **67**, das zuvor in klassischer Weise in Lösung synthetisiert worden war, ebenfalls auf Gold immobilisiert (siehe Tab. 5.6, # 5). Hier wurde zwar wieder eine deutlich zu geringe Schichtdicke gemessen. Der unvollständige Aufbau der Monoschicht resultierte möglicherweise aus dem sterischen Anspruch des Stickstoffcyclus. Dennoch zeigte die Oberfläche dieses SAM wie erwartet biorepulsive Eigenschaften gegenüber BSA.

Es wurden bisher erfolgreich die Bedingungen für die Immobilisierung einiger schwefelhaltiger SAM-Bausteine evaluiert, und das Reaktionsprotokoll für die Cycloaddition nach HUISGEN direkt auf dem Goldsubstrat wurde optimiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Fähigkeit einer geeigneten Monoschicht auf Au(111), unspezifische Adhäsion von BSA zu unterbinden, gezielt durch die Installation einer Hexaethylen-glocoleinheit – auch nachträglich nach der Immobilisierung – erreicht werden konnte.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Fixierung von EG<sub>6</sub>-tragenden Thioacetaten und die anschließende Addition von biorelevanten Rezeptormolekülen wie beispielsweise saccharidischen Komponenten möglich war. Hierzu wurde der Alkin-spacer **73** eingesetzt (siehe Tab. 5.6, # 6). Es wurde festgestellt, daß in dem Fall einer synchronen Immobilisierung dieses Bausteins mit dem Thiol **22** die erreichten Schichtdicken wieder signifikant unter den theoretischen Idealwerten blieben. Zudem wurde ähnlich zum Beispiel # 1 aus Tabelle 5.5 eine deutliche Desorption in Höhe von 11.6 Å im Verlauf der Cycloaddition mit Azid **54** gefunden. Dieses Phänomen ist hier jedoch nicht auf das „Auswaschen“ von auf der Oberfläche physisorbierten Immobilisierungsbausteinen zurückzuführen, da weder mit BSA-Lösung noch mit *aqua dem.* gespült worden war. Vielmehr trat die Schichtdickenabnahme schon während der Cycloaddition auf. Da dieser Vorgang auch bei anderen Hexaethylenglycol-haltigen Molekülen unter „Click“-Bedingungen gefunden wurde, lag die Vermutung nahe, daß der EG<sub>6</sub>-Teil des kettenförmigen SAM-Bausteins entscheidende Bedeutung für die physikochemischen Prozesse der Adsorption und Desorption auf der Goldoberfläche hatte.

Tatsächlich ist die Affinität von Schwefel zu Kupfer (I) sehr hoch. Es konnte daher angenommen werden, daß die S–Au-Bindung in Konkurrenz zur S–Cu<sup>+</sup>-Bindung stand und es zur partiellen Desorption der bereits chemisorbierten Schwefelkomponente von der Goldschicht gekommen war. Dieser Konkurrenzeffekt war jedoch beim EG<sub>6</sub>-freien Molekül nicht so deutlich, da die Löslichkeit des unpolaren Alkinylnylspacers **54** im „Click“-Lösungsmittel wesentlich geringer war als die des hochpolaren Ethylenglycolspacers **73**. Dem Adsorptions–Desorptions-Gleichgewicht an der Goldoberfläche wurde so das EG<sub>6</sub>-haltige Alkin durch Solvatisierung in der Lösung entzogen.

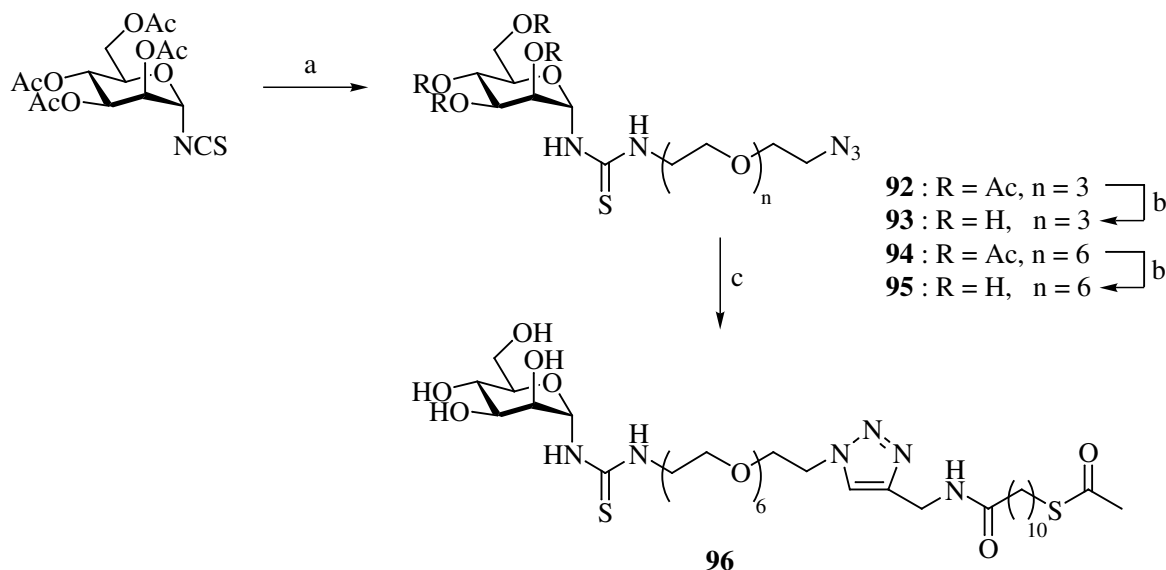
Als Lösung dieses Problems boten sich zwei Strategien an. Zum einen konnte im Rahmen einer Kooperation mit dem Arbeitskreis PD Dr. A. Terfort, Uni Hamburg, durch eine Variation des Lösungsmittels Einfluß auf die Löslichkeit des Ethylenglycolbausteins in der „Click“-Reaktion genommen und so das Gleichgewicht in die gewünschte Richtung dirigiert werden. Mit sehr lipophilen Lösungsmitteln wie beispielsweise Hexan traten jedoch Probleme mit der generellen Reaktivität in der 1,3-dipolaren Cycloaddition auf, die zumeist in polaren Lösungsmitteln wie Methanol, DMF oder Wasser durchgeführt wird. Komplexliganden für das Cu<sup>+</sup>-Ion könnten hier Abhilfe bieten, indem sie a) die Metallzentren teilweise maskieren und die unerwünschte Koordination an Schwefel erschweren sowie b) die Löslichkeit des Metallkations im Lösungsmittel erhöhen. Hier wurden bereits erste Erfolge mit Trialkylaminen der Struktur NMe<sub>2</sub>Alkyl (mit Alkyl = Butyl – Octadecyl) erzielt.<sup>[73]</sup>

Der zweite Ansatz befaßte sich mit der Modifikation der Ausgangsmaterialien für die Cycloaddition. Da selbstanordnende Monoschichten aus dem Alkinylnylbaustein **54** sehr gut und reproduzierbar aufgebaut werden konnten, sollten derartige Substrate als leicht modifizierbare Grundgerüste dienen. Da biofunktionale Eigenschaften, wie es für das Beispiel der Biorepulsivität bereits gezeigt werden konnte, modular „an-clickbar“ waren, sollte nach dem Baukastenprinzip auch eine biorelevante Funktionalität auf dem SAM installierbar sein. Hier war es nun denkbar, die Eigenschaft der Biorepulsivität schon in der Azidkomponente vorzulegen und so die Monoschicht auf dem Gold-Wafer gleichzeitig mit einer Rezeptorfunktionalität und einem molekularen Abschnitt zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen zu versehen.

Da inzwischen Oligoethylenglycole mit diskriminierten Stickstofftermini als  $\omega$ -Azido-EG<sub>n</sub>-Amin–Spacer kommerziell bei einigen Anbietern erhältlich waren, boten sich die Isothiocyanate verschiedener Monosaccharide als Kohlenhydratkomponenten an. Diese relativ gut zugänglichen Bausteine lassen sich in einer Schmelzreaktion mit Kaliumisothiocyanat aus den acetylgeschützten Zuckern aufbauen und sind leicht mit primären Aminen zu kuppeln.<sup>[231]</sup>



Es wurde konsistent wieder mit Mannopyranosiden gearbeitet (Schema 5.30). Aus dem vollständig acetylgeschützten Isothiocyanat wurde zunächst unter Standardbedingungen in Dichlormethan das Triethylenglycol-Harnstoffderivat **92** synthetisiert.



Schema 5.30: Synthese der saccharidischen, EG<sub>n</sub>-haltigen Isothioharnstoffderivate. Reaktionsbedingungen: a) H<sub>2</sub>NEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> oder H<sub>2</sub>NEG<sub>6</sub>N<sub>3</sub>; DCM, 0 °C → RT, 15 h, **92**: 63%; **94**: 79%; b) NaOMe, MeOH, 0 °C → RT, 30 min, **93**: 93%; **95**: 91%; c) **54**, CuI, DMF / MeOH, 45 °C, 15 h, 78 %.

Dies war mit befriedigenden 63 % Ausbeute möglich. Die anschließende Entschützung unter Einwirkung katalytischer Mengen Natriummethanolat in MeOH lieferte die OH-freie Komponente **93** in 93 %. Parallel dazu wurde das Hexaethylenglycol-Analogen aufgebaut: Die Kupplung mit dem ω-Azido-EG<sub>6</sub>-Amin ergab in fast 80 % Ausbeute die peracetylgeschützte Verbindung **94**, aus der dann ebenfalls unter Zemplén-Bedingungen in sehr guten 91 % das Zielprodukt **95** erhalten werden konnte.

Zur Verknüpfung mit einem Alkin per 1,3-dipolarer Cycloaddition nach dem Sharpless-Protokoll wurde das Mannose-EG<sub>6</sub>-Azid **95** gewählt. Hier wurde eine besser abschirmende Wirkung im Hinblick auf Biorepulsivität erwartet.

Die „Click“-Reaktion mit dem Alkynylbaustein **54** unter optimierten Bedingungen in Methanol / DMF bei 45 °C lieferte das 1,4-Triazol **96** in einer guten Ausbeute von 78 %. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß, wie auch schon früher (siehe Tabelle 5.19 auf Seite 73), die von SHARPLESS propargiierten Cyclisierungsbedingungen mit Cu<sup>2+</sup> und Natriumascorbat in Wasser nur zu schlechter oder gar keiner Umsetzung führten. Dies traf auch auf die zuerst getestete Cycloaddition mit dem kleineren Azid **93** zu.

Die Cycloaddition zwischen dem Alkin **54** und dem Azid **95** wurde sowohl in Lösung als auch „on SAM“ durchgeführt. In Tabelle 5.7 sind die Ergebnisse der „Click“-Reaktion auf der Oberfläche wiedergegeben. Zum Vergleich sind auch die Werte eines „Click“-Experiments mit dem EG<sub>6</sub>-Azid **64**, das keine Saccharidstruktur trägt, aufgeführt.

Tabelle 5.7: „Click on SAM“ mit den Aziden **64** und **95** auf Alkin **54**-SAM

Azid <sup>§</sup>	$\Delta d$ (click) [Å]	$\Delta d$ (click) <sub>theor.</sub> [Å]	$\Delta d$ (BSA) [Å]	Kontaktwinkel [°]		
				receding	advancing	$\Delta$
<b>95</b>	$51.7 \pm 1.3$	26.5	$13.4 \pm 4.1$ <sup>†</sup>	$13.1 \pm 4.1$	$48.1 \pm 7.1$	$\approx 31$
<b>64</b>	$16.3 \pm 1.9$	18.6	$-2.7 \pm 2.1$ <sup>‡</sup>	$34.3 \pm 2.5$	$54.2 \pm 2.5$	$\approx 44$
Unbehandelter Au-Wafer:				$27.7 \pm 3.4$	$46.3 \pm 4.4$	$\approx 37$

<sup>§</sup> : Vergl. Schema 5.29 auf Seite 88

<sup>†</sup> :  $\Delta d$  (BSA) unbehandelter Au-Wafer:  $21.6 \pm 0.4$  Å

<sup>‡</sup> :  $\Delta d$  (BSA) unbehandelter Au-Wafer:  $23.2 \pm 1.2$  Å

Es handelte sich bei den Substraten um Goldwafer, auf denen das Alkylalkin **54** immobilisiert worden war. Die Dicke dieser SAMs lag mit  $19.3 \pm 0.7$  Å exakt im Bereich der nach der Theorie erwarteten Schichtdicke von  $18.8$  Å und läßt somit auf eine vollständig und einheitlich aufgebaute Schicht schließen.

Für den Fall des Mannose-EG<sub>6</sub>-Bausteins **95** war die Schichtdicke nach der Cycloadditionsreaktion mit ca.  $52$  Å etwa doppelt so hoch wie erwartet. Die Gründe hierfür sind bislang unklar; es war wie üblich gründlich mit *aqua dem.* gespült worden. Auch ein Wässern bei Raumtemperatur über Nacht änderte die Ergebnisse der Schichtdickenmessung nicht.

Der Test mit BSA-Analytlösung zeigte auf dem Mannose-terminierten SAM hohe Adhäsion an. Dies ist allerdings in diesem Fall leicht zu erklären und auch zu erwarten, da dieser Test lediglich zur Indizierung einer komplett unspezifischen Haftung des Biomoleküls an Oberflächen geeignet ist. Ist jedoch, wie in diesem Experiment, eine mehr oder weniger vollständig Mannosid-beladene Oberfläche vorhanden, so sind Interaktionen dieser polaren Zuckereinheiten mit dem Serum Albumin verständlich, und es kommt zur unspezifischen Anlagerung des Proteins. Dieser Test konnte also hier wenige Aussagen über die Beschaffenheit des neu aufgebauten, Zucker-terminierten SAMs bieten. Aus diesem Grund wurden neben der Erfassung der Biorepulsivität mittels BSA-Analytlösung auch Kontaktwinkelmessungen (KW) zur Bestimmung der Benetzbarkeit der Oberfläche unternommen. Hier zeigten sich nun signifikante Unterschiede zur unbehandelten Referenzoberfläche (Tabelle 5.7).

Angegeben sind jeweils der Rückzugs (receding)- sowie der Fortschritt (advancing)-Winkel. Der advancing-KW ist der „Fortschreitwinkel“, das heißt der KW, den der Tropfen aufweist, wenn man ihn solange mit Wasser aufpumpt, bis er sich auf dem Substrat flächenmäßig ausdehnt. Entsprechend bezeichnet der receding-KW den Winkel, der gemessen wird, wenn man den Tropfen auf dem Substrat so lange leersaugt, bis er sich zusammenzieht und sich seine Benetzungsfläche auf dem Substrat verringert. Die Differenz zwischen diesen Werten wird als Kontaktwinkelhysterese bezeichnet und ist ein Maß für die Rauigkeit der Oberfläche.<sup>[232]</sup>

Man erkennt vor allem an den Werten des receding-KW, daß durch die Installation der polaren Zucker-Kopfgruppen die Benetzbarkeit der Monoschichten mit Wasser deutlich zunahm. Gegenüber der unbehandelten Referenz (ca.  $28^\circ$ ) wurde auf dem Zucker-SAM ein Kontaktwinkel von  $13^\circ$  gemessen. Diese starke Veränderung hin zu einer wesentlich hydrophileren Oberfläche konnte auch umgekehrt werden, wie die Messungen der Goldschicht, auf der der Hexaethylenglycolmonomethylether **64** exponiert worden war, zeigen. Hier wurde eine deutliche Steigerung des receding-Kontaktwinkels auf etwa  $43^\circ$  ermittelt, was auf eine hydrophobere Oberfläche schließen ließ. Dies stand im Einklang mit den Erwartungen, die sich aus der Polarität der exponierten Termini auf den Monoschichten ergeben.

Die große Kontaktwinkelhystere im Fall des EG<sub>6</sub>OMe-terminierten SAM deutete auf eine ungeordnete Schicht hin. Dennoch lag eine vollständig biorepulsive Schicht vor, was die Behandlung mit BSA-Analytlösung zeigt: Es hat keine unspezifische Adhäsion stattgefunden.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß der einheitliche Aufbau von selbstanordnenden Monoschichten durch thioacetathaltige, kettenförmige Moleküle erfolgreich war. Zunächst zeigten SAMs aus Hexaethylenglycol-tragenden Molekülen Probleme bei der Einheitlichkeit der Schichtdicken, was aus teilweise unvollständig ausgebildeten Monoschichten resultierte. Die entsprechenden SAMs wiesen nur eine schwache Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen mit Biomolekülen auf. Dagegen konnten Bausteine, die zunächst noch keinen Abschnitt zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen auf dem SAM enthielten, einheitlich und reproduzierbar immobilisiert werden. Sie wiesen die theoretisch vorhergesagte Schichtdicke auf. Auch die anschließende Modifizierung der Oberflächeneigenschaften durch eine 1,3-dipolare Cycloadition war möglich, und hierzu wurden passende Reaktionsbedingungen evaluiert.

Diese Strategie stellt eine geeignete Methodik dar, nach der initialen Immobilisierung der Monoschichten gezielt Biofunktionalitäten zu installieren. Hier konnte die

Einführung eines biorepulsiven Abschnitts oder die Installation von Zucker-tragenden Kopfgruppen gezeigt werden.

Als nächstes sollten eingehende Untersuchungen mit Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR) durchgeführt werden, um die Immobilisierung synthetisierter, Kohlenhydrat-funktionalisierter Bausteine zu testen und deren Wechselwirkung mit verschiedenen Lektinen zu untersuchen.

## 5.7 SPR–Untersuchungen

### 5.7.1 Allgemeines

Die SPR-Untersuchungen wurden von mir an der Universität zu Lübeck im Rahmen einer Zusammenarbeit innerhalb des Sonderforschungsbereichs 470 durchgeführt. Zu den experimentellen Vorbemerkungen siehe Abschnitt 7.1.

#### Als Analyt verwendete Biomoleküle:

**Concanavalin A (Con A):**<sup>[34, 169, 233–235]</sup> Con A ist ein häufig genutztes und gut beschriebenes Pflanzenlektin aus der Schwertbohne *Concanavalia ensiformis*. Es hat eine hohe Spezifität gegenüber  $\alpha$ -gebundener Mannose sowie eine weniger ausgeprägte  $\alpha$ -Glucosespezifität. Die höchste Spezifität besteht zu 3,6-Di-*O*-( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)- $\alpha$ -D-mannopyranosid, welches das minimale Kohlenhydratepitop darstellt, das komplett die Zucker-Bindungstasche ausfüllt.<sup>[236]</sup> Da viele Serum- und Membranglycoproteine eine „Core“-Oligosaccharidstruktur, die  $\alpha$ -Mannoseeinheiten enthält, besitzen, sind bereits viele Glycoproteine mittels Con A und dessen Konjugaten untersucht worden. Auch zur Glycoproteinreinigung und bei Zell–Agglutinationsstudien ist das Lektin eingesetzt worden. Es ist kommerziell erhältlich und relativ kostengünstig (100 mg  $\cong$  45 €).

Con A benötigt Calcium- und Manganionen für die Bindung von Mannosiden (siehe Abbildung 2.3 auf Seite 13). Es liegt oberhalb pH 7 als  $\alpha_2$ -Homodimer und unterhalb etwa pH 6 als  $\alpha_4$ -Tetramer vor. Die vier identischen Einheiten weisen jeweils eine Masse von etwa 26 kDa auf.<sup>[237]</sup>

***Galanthus nivalis*–Lektin (GNL):**<sup>[34, 233, 238]</sup> GNL wird aus Schneeglöckchen gewonnen. Es ist ein vergleichsweise kleines Lektin, dessen tetramere Struktur aus vier Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 13 kDa besteht. Zur spezifischen Bindung von  $\alpha(1,3)$ -Mannosiden benötigt es keine  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen.

Im Unterschied zu den meisten anderen Mannose-bindenden Lektinen, bindet GNL keine  $\alpha$ -Glucoside.

***Maclura pomifera*-Lektin (MPL):**<sup>[233]</sup> MPL ist ein aus Maulbeerbaumgewächsen isoliertes Lektin mit einem Molekulargewicht von 40–46 kDa, das ebenfalls aus vier Untereinheiten besteht. Kohlenhydratspezifität besteht bevorzugt zu  $\alpha$ -gebundenen GalNAc- und Galaktoseeinheiten.

***Aleuria aurantia*-Lektin (AAL):**<sup>[233]</sup> AAL wird aus dem eßbaren Pilz *Orangerotter Becherling* isoliert. Es besteht aus einem Dimer von identischen Untereinheiten, die je 36 kDa groß sind. AAL besitzt eine Fucosespezifität und bindet bevorzugt Fucose, die  $\alpha(1,6)$ -glycosidisch an N-Acetylglucosamin,  $\alpha(1,3)$ -glycosidisch an N-Acetyllactosamin und an ähnlichen Strukturen gebunden ist.

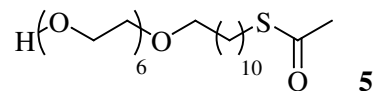
**Bovine Serum Albumin (BSA):** BSA ist ein Serumprotein, das im Rinderblut vorkommt. Es hat ein Molekulargewicht von 68 kDa und bindet unspezifisch an viele Oberflächen, vor allem auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhend.



## Immobilisierte, monovalente Bausteine:

**Referenzmolekül** In Flußzelle 1 wurde standardmäßig das Thioacetat **5** aufgebracht, um eine biologisch inaktive Referenzoberfläche vorliegen zu haben.

Der unfunctionalisierte Baustein trägt einen Abschnitt mit Ethylenglycoleinheiten zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkung zwischen Analyt und SAM-



Oberfläche. Die Immobilisierung erfolgte über einen Zeitraum von 30 min mit einer 50  $\mu\text{M}$  Lösung in HBP-S-Puffer mit einer Flußgeschwindigkeit von 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Das Sensogramm in Abbildung 5.4 zeigt den Verlauf der Immobilisierung. Die Injektion beginnt bei (A). Das Signal steigt sofort an, weil unmittelbar alle freien Plätze auf der Au-Oberfläche von Schwefel-tragenden Molekülen sehr rasch besetzt werden. Anschließend ist ein kurzer Abfall sichtbar, der die beginnende Selbstanordnung kennzeichnet. Dieser Kurvenverlauf ist charakteristisch und bei allen Folgeexperimenten sichtbar. Bei (B) ist ein Sättigungszustand annähernd erreicht, und die Injektion endet. Im Punkt (C) ist die finale Immobilisation des Bausteins **5** erkennbar: Es wurden 1682 RU auf der Schicht abgeschieden.

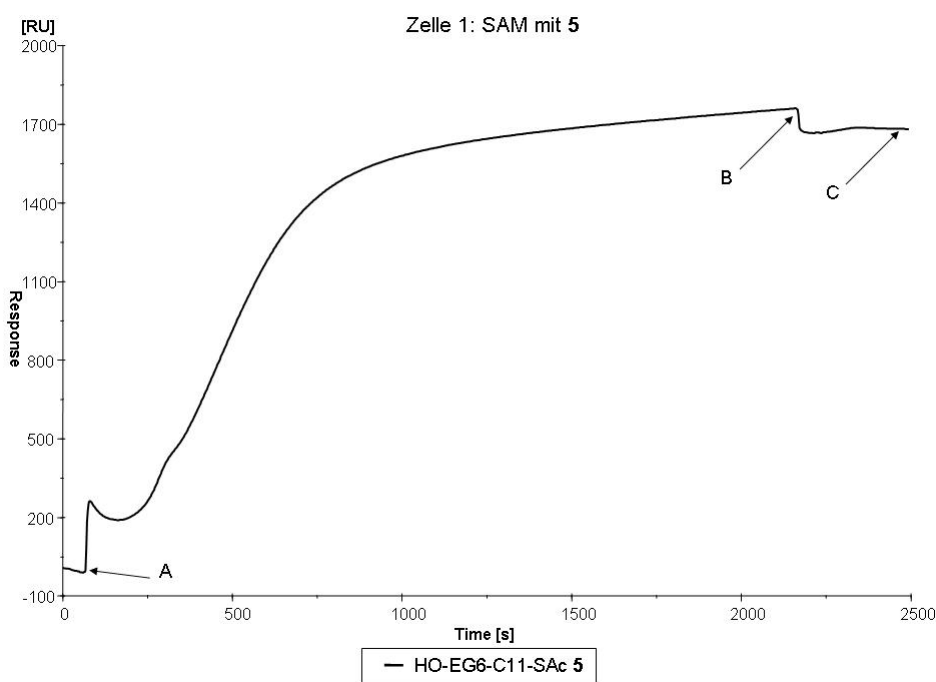
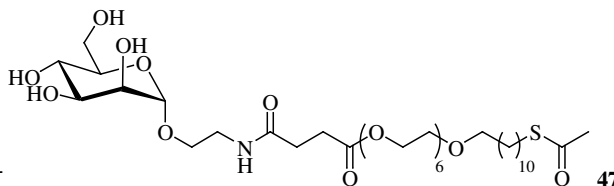


Abbildung 5.4: Initiale Immobilisierung von **5**. (A) Beginn der Injektion; (B) Gleichgewichtszustand, Ende der Injektion; (C) Sättigungszustand = Finale Immobilisation des Moleküls in Höhe von 1682 RU.

**Testmoleküle:** Für die Experimente zur Messung der Wechselwirkung von verschiedenen Lektinen mit unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen wurden zunächst das monovalente Mannosid **47** sowie das analoge Fucosid **45** auf der Schicht installiert. Testhalber wurden auch deutlich kleinere Moleküle wie beispielweise Mercaptoethanol auf der Goldoberfläche fixiert. Hierbei konnte die gewählte Flußrate z. T. bis zu 15  $\mu\text{l}/\text{min}$  oder mehr betragen, da der Faktor der sterischen Hinderung bei diesen Strukturen keine Auswirkungen auf den Grad der Selbstordnung hatte. Im Fall von Mercaptoethanol wurde mit hohen Fließgeschwindigkeiten bei relativ geringer Konzentration von 1  $\mu\text{mol}/\text{l}$  gearbeitet. Die notwendige Dauer der Immobilisierungsphase bis zum Sättigungszustand hing ebenfalls entscheidend von der molekularen Struktur der Thioverbindungen ab. Freie Thiole besitzen eine ganz elementar höhere Affinität zu Gold als Thioacetate. Aus diesem Grund mußten, um eine einheitliche Belegung der Schicht zu erreichen, die Thioacetate auf zuvor gereinigten Oberflächen immobilisiert werden (siehe Abschnitt 7.1). Diese Bedingungen einer Voraktivierung durch Reinigung der Goldschicht erlaubten allerdings im Falle des vergleichsweise kleinen Mercaptoethanols keine gesteuerte Schichtbildung.

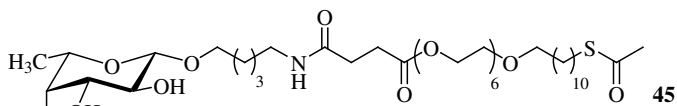
Die monomeren saccharidischen Bausteine konnten prinzipiell ohne den Zusatz von Verdünnungsmolekülen auf der Schicht fixiert werden. Es wurde hier jeweils eine Flußgeschwindigkeit von 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{mol}/\text{l}$  eingestellt. Für die Dauer der Immobilisierung wurden etwa 30 min gewählt. Durch diese Bedingungen (*niedriger Fluß bei hoher Konzentration über lange Zeit*) sollte eine möglichst gute Selbstordnung der Schicht sichergestellt werden. Dies war notwendig, um möglichst wenige bzw. keine Fehlstellen in der Schicht zu haben, an denen unspezifische Adsorption der Analytmoleküle auf Gold stattfinden kann.

Vergleichbare Ansätze zur Immobilisierung von Thiokomponenten auf Au lassen nach der Injektion der Thiobausteine einen kurzen Puls von üblicherweise verdünntem Mercaptoethanol erfolgen. Hiermit können Fehlstellen ausgeglichen werden. Diese Methode birgt aber die Gefahr einer Substitution der immobilisierten Zielmoleküle durch die hochgradig Gold-affinen Thiolgruppen der Sättigungsbausteine. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit, wo durch Vorbehandlung hochreine Oberflächen Anwendung fanden, auf diese terminale Absättigung durch ein freies Thiol verzichtet. So konnte das Mannosid **47** auf der Oberfläche von Zelle 2 erfolgreich installiert werden. Bereits nach 15 min hatte sich auf der Oberfläche ein Gleichgewicht eingestellt. Es wurde über einen Zeitraum von 20 min injiziert und im Sättigungszustand ein Signal von 2443 RU erhalten (Abbildung 5.5).





Das Fucosid **45** wurde unter gleichen Bedingungen auf die Goldoberfläche der Flußzelle 3 gebracht.



Es wurde über 30 min injiziert, und der Gleichgewichtszustand ergab eine Immobilisierung in Höhe von 1820 RU (Abbildung 5.5).

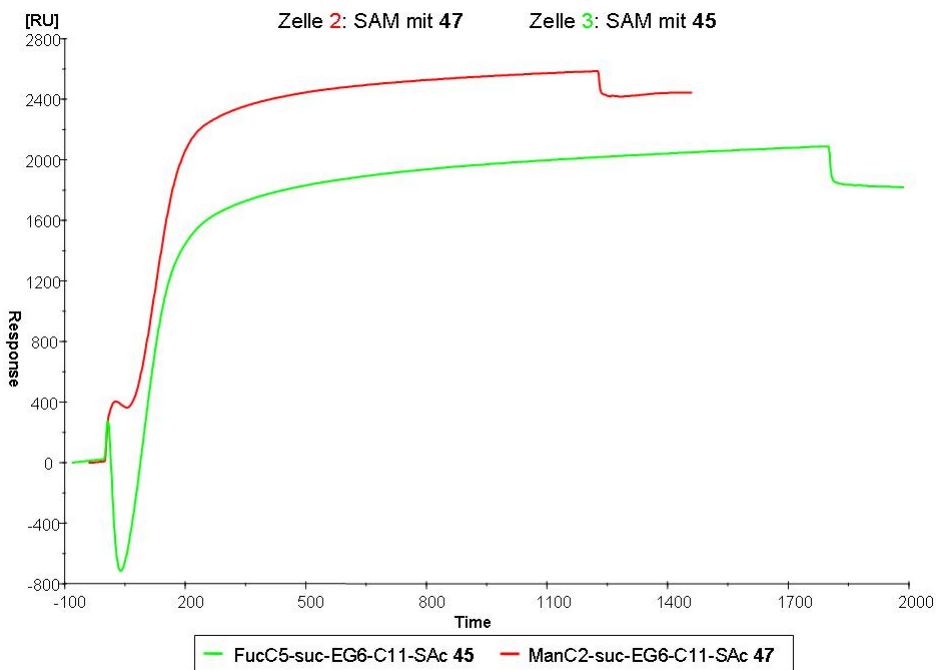
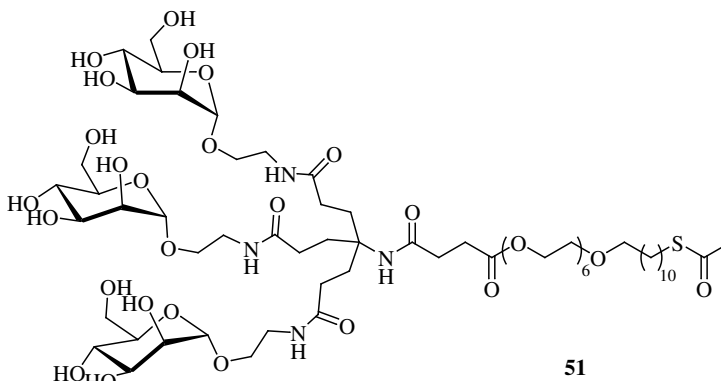


Abbildung 5.5: Initiale Immobilisierung von Fucosid **45** (grün) mit 1820 RU und Mannosid **47** (rot) mit 2443 RU.

## Immobilisierte, trivalente Bausteine

Im Bereich der Messungen mit dendritischen Glycosiden wurde ein trimerer Baustein in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit einem Verdünnungsmolekül zusammen auf der Schicht fixiert. Es wurde das Clustermannosid **51** gewählt und im Mischungsverhältnis 1:10 sowie 1:25 mit dem Alkohol **5** zusammen auf den Zellen 4 und 5 immobilisiert.



Hierbei wurden die bewährten Bedingungen beibehalten: Die Flußgeschwindigkeit betrug  $2 \mu\text{l}/\text{min}$  und wurde diesmal über 30–40 min gehalten, um eine möglichst wohlgeordnete und einheitliche Schicht zu gewährleisten. Die Konzentration der Mischung aus **5** und **51** betrug  $50 \mu\text{mol}/\text{l}$  (Abbildung 5.6).

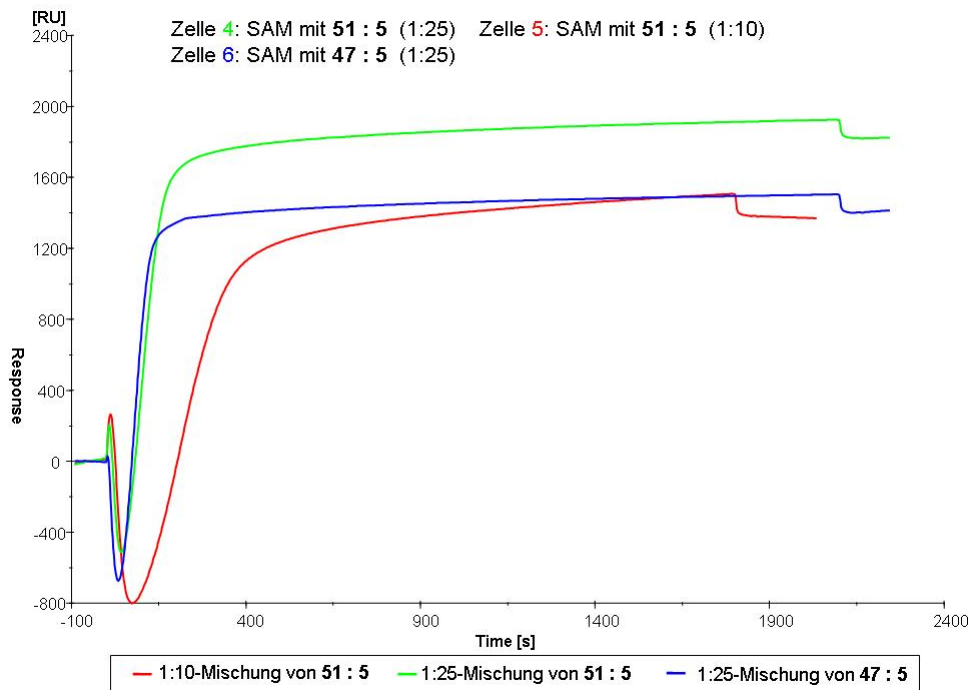


Abbildung 5.6: Initiale Immobilisierung des Mannosids **51** mit Verdünnungsbaustein **5**. Rot: Bei einer 1:10-Mischung ergab sich eine Fixierung in Höhe von 1364 RU. Grün: Eine 1:25-Mischung zeigte Adsorption in Höhe von 1830 RU. Blau: Zu Vergleichszwecken wurde auch der monomere Mannose-Baustein **47** in einer 1:25-Verdünnung immobilisiert, was hier ebenfalls dargestellt ist. Hier wurde eine Adsorption in Höhe von 1450 RU gefunden.

Tabelle 5.8: Übersicht der einzelnen SPR-Zellen und ihrer Belegungen

Zelle	Thiobaustein	
1	100 %	AcSC <sub>11</sub> EG <sub>6</sub> OH <b>5</b>
2	100 %	AcSC <sub>11</sub> EG <sub>6</sub> sucC <sub>2</sub> Man <b>47</b>
3	100 %	AcSC <sub>11</sub> EG <sub>6</sub> sucC <sub>5</sub> Fuc <b>45</b>
4	1:25	AcSC <sub>11</sub> EG <sub>6</sub> suc(C <sub>2</sub> Man) <sub>3</sub> <b>51</b> : AcSC <sub>11</sub> EG <sub>6</sub> OH <b>5</b>
5	1:10	AcSC <sub>11</sub> EG <sub>6</sub> suc(C <sub>2</sub> Man) <sub>3</sub> <b>51</b> : AcSC <sub>11</sub> EG <sub>6</sub> OH <b>5</b>
6	1:25	AcSC <sub>11</sub> EG <sub>6</sub> sucC <sub>2</sub> Man <b>47</b> : AcSC <sub>11</sub> EG <sub>6</sub> OH <b>5</b>

## 5.7.2 Ergebnisse der SPR-Untersuchungen

Es wurden Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Messungen durchgeführt, um

1. die Unterdrückung nichtspezifischer Adhäsion von Biomolekülen an die Goldoberfläche von SAMs durch Einführung einer Hexaethylenglycolsequenz in die SAM-Bausteine zu untersuchen („Biorepulsivität“),
2. spezifische Interaktionen von verschiedenen Lektinen mit Mannose- und Fucose-terminierten Oberflächen zu messen, sowie
3. vergleichend die nichtspezifische Interaktion von unterschiedlichen Proteinen an Kohlenhydrat-funktionalisierten SAMs halbquantitativ zu testen und
4. den Einfluß der Multivalenz auf die Zucker-Protein-Wechselwirkung durch Anwendung trivalenter Mannosidcluster für die SAM-Bildung zu ermitteln.

### 5.7.2.1 Unterdrückung nichtspezifischer Adhäsion

Der Grad der Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen zwischen der variabel funktionalisierten SAM-Oberfläche und einer Analytlösung wurde mit dem Lektin Con A untersucht. Läßt man über eine Hexaethylenglycol-terminierte Oberfläche einerseits und eine mit Mercaptoethanol belegte Schicht andererseits Con A-Lösung fließen, so wird im zweiten Fall ein deutliches, im Falle der EG<sub>6</sub>-tragenden Schicht ein geringes Signal erwartet.

Zur Erläuterung wurden die Meßergebnisse in Form verschiedener Graphen dargestellt. Neben den bekannten Sensogrammen (Abb. 5.4 – 5.6), die das direkte Antwortsignal der Meßzelle wiedergeben, wurden zur Auswertung *Differenzsensogramme* angefertigt.

Durch Differenzmessungen gegen eine Referenzflußzelle wird sichergestellt, daß nur die tatsächlichen Wechselwirkungen zwischen immobilisiertem Ligand und Analyt untersucht werden. In einem Differenzsensogramm wird das Signal einer Zelle von dem einer anderen Zelle nach einem in der Evaluationssoftware implementierten Algorithmus subtrahiert. Da alle Zellen sequentiell von der Analytlösung durchströmt werden, kommt es zu einer sehr kurzen aber meßbaren Zeitdifferenz zwischen den Signalen der Flußkammern. Durch die Differenzbildung kann es dann zu Artefakten kommen, die durch sog. „Spikes“ im Differenzsensogramm deutlich werden. Je nach dem gewählten Injektionsverfahren (Quickinject *vs.* Kinject) sind die Spikes unterschiedlich stark ausgeprägt.

Abbildung 5.7 zeigt eine Kombination des direkten und des Differenz-Sensogramms. Dargestellt sind die Sensogramme, die sich ergeben aus

1. dem direkten Meßsignal einer Vergleichszelle (V) mit Mercaptoethanol,
2. dem Differenzsignal der Zellen 1 – V (AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>OH **5** – HSEtOH) sowie
3. dem Differenzsignal der Zellen 2 – V (ManC<sub>2</sub>sucEG<sub>6</sub>C<sub>11</sub>SAC **47** – HSEtOH).

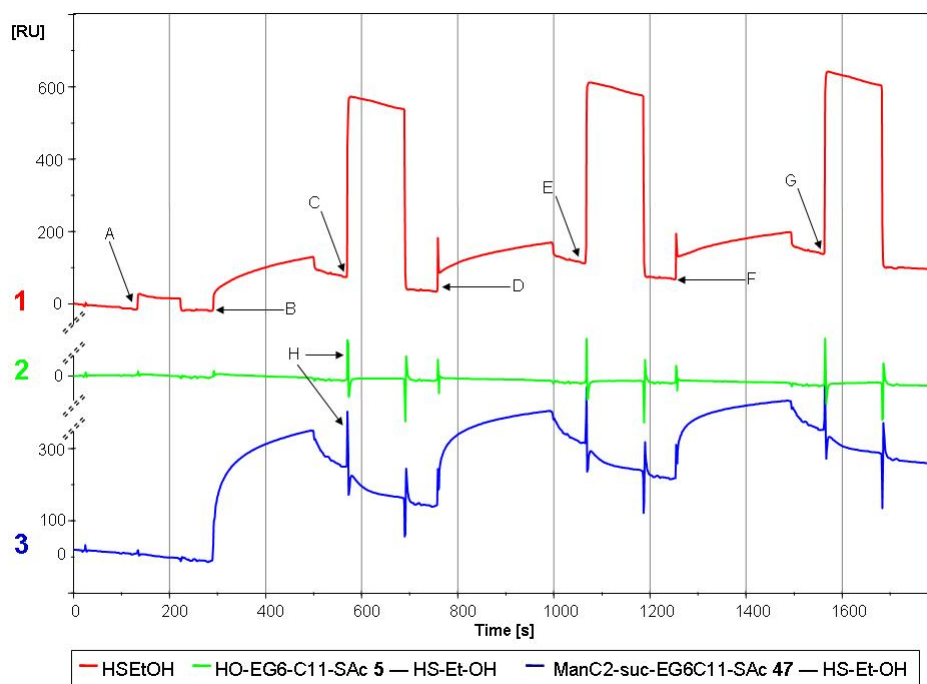


Abbildung 5.7: Synchronisiertes Sensogramm nach SPR-Experiment mit Con A-Lösung. Rot: Meßsignal aus Vergleichszelle V (SAM mit HSEtOH). Grün: Differenz aus Meßsignal Zelle 1 (SAM mit **5**) und Meßsignal V (SAM mit HSEtOH). Blau: Differenz aus Meßsignal Zelle 2 (SAM mit **47**) und Meßsignal aus V (SAM mit HSEtOH).

(A): Kurze Injektion reinen HBS-P-Puffers; (B), (D), (F): Injektion einer 5  $\mu$ M Con A-Lösung; (C), (E), (G): Injektion einer 10 mM Lösung von  $\alpha$ -D-Methylmannosid; bei (D), (F) ist ein sog. „Spike“ zu erkennen. Da es sich um kein Differenzsensogramm handelt, läßt sich dieses Artefakt der mechanischen Störung in der Flußzelle durch Aufsetzen der Injektionsnadel zuordnen; (G): In den Differenzsensogrammen **2** und **3** resultieren die „Spikes“ aus der Verzögerung im sequentiellen Durchströmen der Zellen.

Bei (A) wurde eine kurze Zeit reiner HBS-P-Puffer injiziert, um die Zellen zu spülen. Der kleine Ausschlag im roten Graphen bei  $t = 135$  s zeigt die kurze Spülsequenz,

was bei den anderen Zellen zu exakt demselben Resonanzsignal führte und durch die Nulllinie in den Differenzsensogrammen verdeutlicht wird.

Bei (B) wurde mit der Injektion von 5  $\mu\text{M}$  Con A-Lösung begonnen. Die rote Kurve zeigt deutlich die erfolgte Adhäsion an der Vergleichszelle (V). Das grüne Differenzsignal von Zelle 1–V (AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>OH **5**–HSEtOH) verdeutlicht, daß in diesem Fall das Biomolekül ähnlich stark auf der Mercaptoethanoloberfläche und der EG<sub>6</sub>-Schicht haftete, was entgegen den Erwartungen ist. Im Gegensatz dazu erhielt man einen deutlichen Signalunterschied zwischen Zelle 2 und V (ManC<sub>2</sub>sucEG<sub>6</sub>C<sub>11</sub>SAc **47**–HSEtOH), was durch die blaue Kurve dargestellt ist: Die Interaktion von Concanavalin A mit der Mannose-tragenden Monoschicht der Zelle 2 war wesentlich stärker ausgeprägt als im Falle der „unfunktionalisierten“ Oberfläche der Mercaptoethanol-Vergleichszelle. Dies ist durch das positive Vorzeichen der Kurve ausgedrückt. Anhand der absoluten Zahlen erkennt man außerdem, daß durch nichtspezifische Adhäsion auf dem Mercaptoethanol–SAM nur etwa 120 RU haften. Auf der aus dem Mannosid **47** aufgebauten Monoschicht physisorbierten hingegen ca. 350 RU mehr als auf der HSEtOH-Oberfläche.

Bei (C), (E) und (G) wurde eine konzentrierte Lösung (10 mM)  $\alpha$ -D-Methylmannosid injiziert, um auf der Schicht adhäriertes Con A von der Oberfläche zu eluieren und die Schicht zu regenerieren. Es handelte sich um kurze Injektionen über 3 min bei einer gesteigerten Flußgeschwindigkeit von 15  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Durch einen einzelnen Peak konnte der ursprüngliche Belegungsgrad jedoch nicht vollständig wiederhergestellt werden: Die Niveaus von (B) und (D) unterschieden sich in der Vergleichszelle (rot) sowie ebenfalls in der Differenz von Zelle 2–V (blau). Aus dieser Erkenntnis heraus wurden in folgenden Meßreihen stets mehrere kurze Mannosepeaks mit gesteigerter Flußgeschwindigkeit injiziert, um eine vollständige Regenerierung der Testoberflächen sicherzustellen.

### 5.7.2.2 Spezifische Interaktionen

Um ein „proof of principle“ bezüglich des gewählten Setups zur Messung der spezifischen Wechselwirkung zwischen Mannose-haltiger und Mannose-freier SAM-Oberfläche zu erhalten sowie die für Verdünnungsexperimente notwendige Regeneration der Zelloberfläche zu testen, wurde zunächst mit Con A experimentiert.

Im weiteren Verlauf wurde dann die spezifische Interaktion zwischen Mannose-terminierter Schicht und Con A sowie GNL vergleichend untersucht, und es wurden Meßreihen mit verschiedenen Analytkonzentrationen angestellt. Am Kurvenverlauf und an der Signalintensität ließ sich die spezifische Wechselwirkung belegen.

Aus der Höhe des Sättigungsbereichs lassen sich zudem Rückschlüsse auf zu wählende Konzentrationen für die Messungen zur unspezifischen Wechselwirkung mit anderen Biomolekülen ziehen.

**Adhäsion von Con A** In Abbildung 5.8 ist das Sensogramm dargestellt, das aus der Differenz der Zellen 2 und 1 (ManC<sub>2</sub>sucEG<sub>6</sub>C<sub>11</sub>SAC **47** – AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>OH **5**) gebildet wurde. Es gibt den unterschiedlichen Grad der Adsorption von Con A aus einer Analytlösung in der Mannose-freien Zelle 1 und der mannosidtragenden Oberfläche der Zelle 2 wieder. Ein positives Signal bedeutet eine stärkere Wechselwirkung auf Zelle 2 als auf Zelle 1.

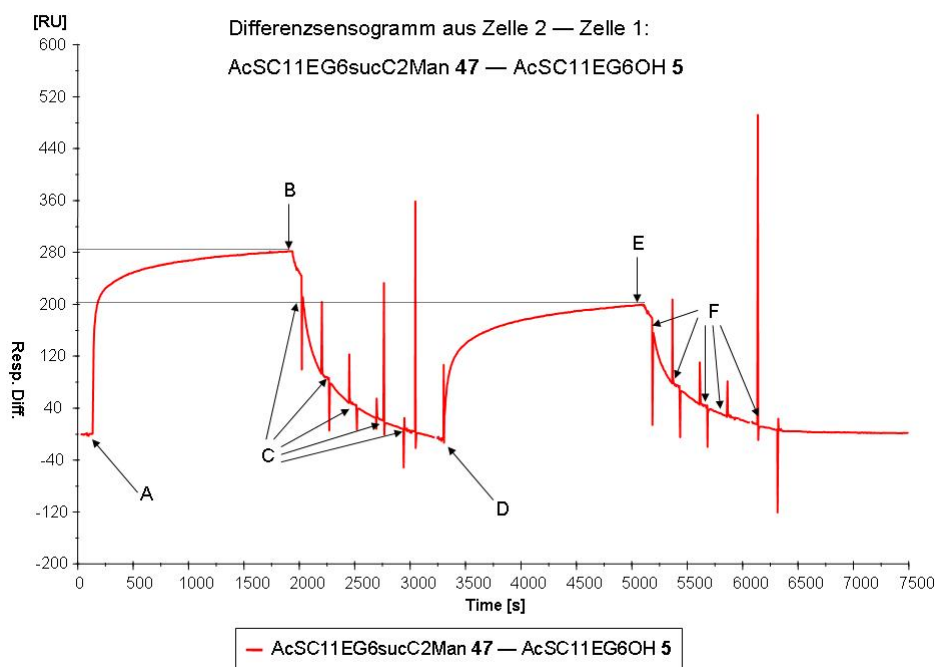


Abbildung 5.8: „proof of principle“: Mannose-spezifische Wechselwirkung mit Con A. Differenzsensogramm aus Meßsignal Zelle 2 (SAM mit **47**) und Meßsignal Zelle 1 (SAM mit **5**). (A): Injektion einer 50  $\mu\text{M}$  Con A-Lösung; (B): Ende der Injektionsphase, annähernd Gleichgewichtszustand bei Immobilisierung mit 281 RU; (C), (F): Eluationsvorgänge mit 50  $\mu\text{M}$  Mannose-Lösung; (D) Injektion einer 10  $\mu\text{M}$  Con A-Lösung als Analyt; (E) Ende der zweiten Injektionsphase, annähernd Gleichgewichtszustand bei Immobilisierung mit 204 RU.

Bei (A) erfolgte die Injektion einer 50  $\mu\text{M}$  Lösung Con A bei einer Flußgeschwindigkeit von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Der Gleichgewichtszustand war nach etwa 30 min erreicht (B), und es waren 281 RU mehr in Zelle 2 als in Zelle 1 adsorbiert. Um die Schicht zu regenerieren, folgte hiernach eine Eluationsphase, in der in mehreren, aufeinander

folgenden Sequenzen Mannoselösung injiziert wurde, um das Lektin von der Oberfläche zu „waschen“. Man nutzt dabei die hohe Mannose-Spezifität von Con A aus. Es sind hierzu Zuckerkonzentrationen bis in den hohen millimolaren Bereich möglich, wobei in diesem Fall eine 50 mM Lösung von D-Mannose in HBS-P-Puffer für jeweils vier Minuten bei einer erhöhten Flußgeschwindigkeit von 15  $\mu\text{l}/\text{min}$  über den SAM gespült wurde. Die positiven und negativen Spikes (C) sowie (F) sind Artefakte, die Start und Ende jeder Injektion markieren. Sie entstehen zum einen rechnerisch durch Differenzbildung der beiden Zellen, die sequenziell durchströmt werden. Zum anderen resultieren sie aus der mechanischen Störung in der Zelle durch das Aufsetzen der Einspritznadel in die Flußkammer beim Injektionsverfahren „Quickinject“, welches hier verwandt wurde.

Man konnte an den einzelnen Eluationsvorgängen gut die Desorption erkennen, die sich, genau wie die Adsorption, asymptotisch einem Sättigungsbereich näherte: Wurde noch bei der ersten Injektion von Mannoselösung Con A in Höhe von 157 RU von der Schicht eluiert, so waren es in den Folgeschritten nur noch 116 RU, 24 RU, 16 RU und schließlich 11 RU, womit die Anfangsbelegung wieder erreicht wurde und die Flußzellen für die nächste Messung zur Verfügung standen.

In (D) wurde mit 10  $\mu\text{M}$  eine geringere Con A-Lösung als Analyt für 30 min bei 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  Flußgeschwindigkeit injiziert. Wie zu erwarten, adhärierte bei der geringeren Konzentration weniger Con A auf Oberfläche der Kohlenhydrat-terminierten Schicht in der vorgegebenen Zeit. Die Differenz lag bei nur 204 RU, wobei auch nach 40 min der Sättigungspunkt (E) noch nicht ganz erreicht war. Reaktivierung erfolgte wieder durch Sequenzen von Mannoseinjektionen (F), wonach der ursprüngliche Zustand der Oberfläche wiederhergestellt werden konnte.

Nachdem unter den gewählten Bedingungen die vollständige Regeneration erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wurde bei allen Folgemessungen dieses Verfahren verwandt. Als einzige Änderung wurde stets der „Kinject“-Prozeß angewandt. Hierbei bleibt nach dem Ende des Injektionsvorgangs die Injektionsnadel noch auf der Flußkammer ruhen, wodurch Artefakte durch die mechanische Störung des Flußvorgangs vermieden werden können.

Im Rahmen einer Verdünnungsreihe wurde als nächstes die Wechselwirkung zwischen Con A-Lösung verschiedener Konzentrationen und Mannose-tragender bzw. Mannose-freier Oberfläche untersucht. In Abbildung 5.9 ist das Differenzsensogramm aus den Zellen 2 – 1 (ManC<sub>2</sub>sucEG<sub>6</sub>C<sub>11</sub>SAC **47** – AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>OH **5**) gezeigt.

Es ist zu sehen, daß die benötigte Zeit bis zur Einstellung eines Adhäsionsgleichgewichts auf der Oberfläche stark konzentrationsabhängig ist. Bei hoher Lektin-Konzentration wird die Sättigung erwartungsgemäß schneller erreicht als bei niedriger Konzentration. Da es sich bei der Adhäsion des Proteins auf dem Glyco-SAM um ein Physisorptionsgleichgewicht ohne feste chemische Bindung handelt, ist bei geringen Konzentrationen (nM) der Betrag der Desorption ähnlich hoch wie der der Adsorption (untere Kurvenschar in Abbildung 5.9). Entsprechend werden nur vergleichsweise geringe Beladungen der Zelle gemessen und nach Beendigung der Injektion (bei  $t = 2400$  s) ändert sich das Resonanzsignal nur wenig. In der oberen Kurvenschar ist deutlich zu erkennen, daß die maximale Gesamtadhäsion einen Sättigungsgrad erreicht, der weniger von der Konzentration der Analytlösung abhängt. Anschaulich läßt sich dies durch eine vollständige Bedeckung der Zucker-exponierenden Oberfläche mit Protein erklären, so daß kein weiteres Con A adhären kann. In diesem Konzentrationsbereich ( $\mu\text{M}$ ) fällt das Signal sofort nach Beendigung der Analytinjektion deutlich ab. Dies dokumentiert die einsetzende Desorption des Lektins von der Mannose-terminierten Oberfläche während des Spülvorgangs.

Die Messungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 10 nM bis etwa 50  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Bei Verdünnung bis in den niedrigen nanomolaren Bereich ist bei dem gewählten Geräte-Setup und der vorliegenden Immobilisierung kein auswertbares Resonanzsignal erhalten worden. Eine wichtige Aussage des Differenzsensogramms ist daher der Verdünnungsbereich, in dem sinnvolle Folgemessungen mit anderen Lektinen angestellt werden können. Für weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Analytlösungen wurde ein Konzentrationsbereich von 100 nM – 50  $\mu\text{M}$  gewählt.

In Abbildung 5.10 ist die Sättigungskurve der ermittelten Ergebnisse gezeigt. Aus den bei verschiedenen Analytkonzentrationen erhaltenen Sensogrammen wurden die jeweiligen Signale (RU) für das Gleichgewicht entnommen. Die Auftragung dieser Gleichgewichtswerte gegen die entsprechende Konzentration des Analyten führt zu einem Kurvenverlauf, der durch das „steady state“-Modell („LANGMUIR-Bindung“, in der Evaluationssoftware implementiert) gefittet werden konnte.

Streng genommen können die Daten aus obigem Experiment nur für einfache, bimolekulare Komplexe Anwendung finden. In diesem Fall kann dann aus einer solchen Adsorptionsisotherme nach dem Massenwirkungsgesetz die Dissoziationskonstante ermittelt werden. Da für die Wechselwirkung von Con A mit Mannose ein multivalentes Bindungsverhalten bekannt ist, lassen sich hier keine Aussagen zur Kinetik sowie zu Assoziations- und Dissoziationskonstanten der Interaktion treffen. Außerdem wäre eine weitere Messung bei einer Analytkonzentration von etwa 1–2  $\mu\text{M}$  sinnvoll, um den wenig abgedeckten Bereich der Verdünnungsreihe auszufüllen.



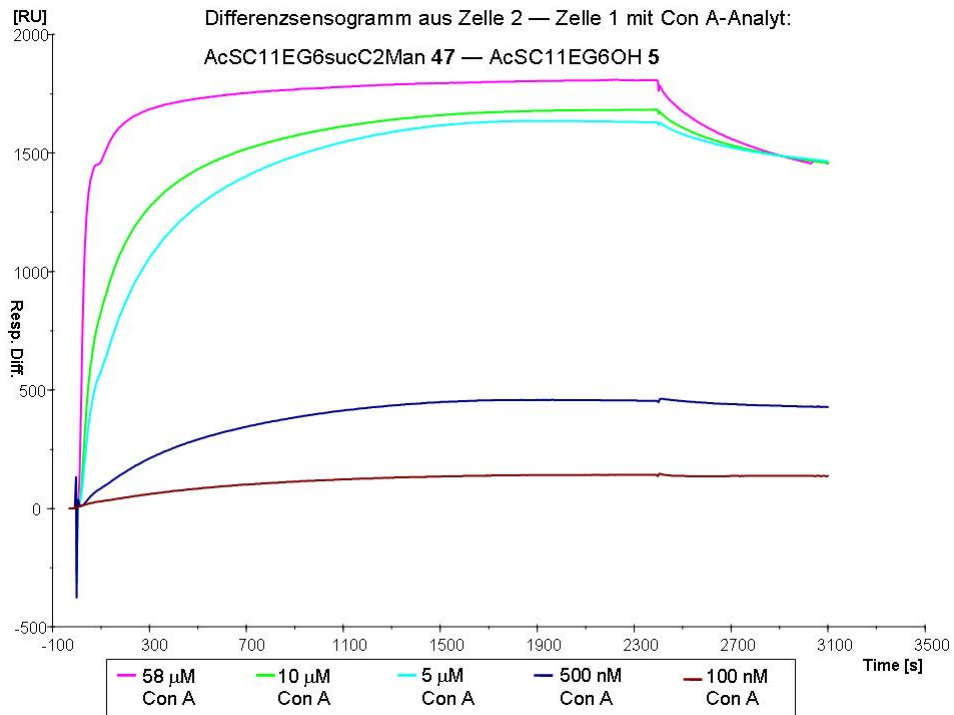


Abbildung 5.9: Differenzsensogramm aus Meßsignal Zelle 2 (SAM mit 47) und Meßsignal Zelle 1 (SAM mit 5) bei verschiedenen Analytkonzentrationen von Con A.

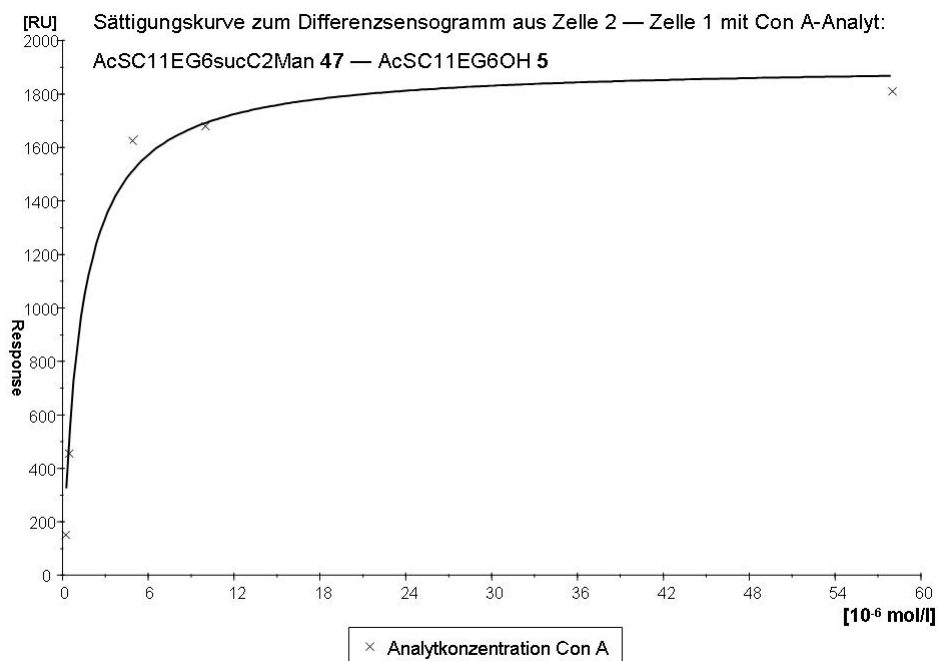


Abbildung 5.10: Sättigungskurve zum Sensogramm aus Abbildung 5.9.

**Adhäsion von GNL** Neben der in der Literatur vielfältig beschriebenen und gut untersuchten Wechselwirkung zwischen Con A und Mannosiden<sup>[57]</sup> wurde hier außerdem die Adhäsion des Mannose-spezifischen Lektins aus *Galanthus nivalis* an der Mannose-funktionalisierten Oberfläche in Zelle 2 getestet.

Das Differenzsignal der Zellen 2 und 1 (ManC<sub>2</sub>sucEG<sub>6</sub>C<sub>11</sub>SAc **47** – AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>OH **5**) bei sechs verschiedenen Konzentrationen des Lektins ist in Abbildung 5.11 gezeigt. Wie zu erwarten adhärierte das gelöste Lektin an der Mannose-tragenden Monoschicht wesentlich stärker als an der Kohlenhydrat-freien Oberfläche. Im Vergleich zu den bei der Testreihe mit Con A verwandten Konzentrationen war absolut eine geringere Wechselwirkung zu beobachten. Man sieht außerdem, daß die Einstellung des Gleichgewichts zwischen GNL und den Mannosiden wesentlich langsamer erfolgte: Nach der 40-minütigen Injektion von 50  $\mu\text{M}$  GNL-Lösung mit einer Flußgeschwindigkeit von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  war noch kein Zustand erreicht, der einem Immobilisierungsgleichgewicht entsprach. Bei Con A hingegen war unter diesen Bedingungen schon nach etwa der Hälfte der Zeit das Gleichgewicht eingestellt.

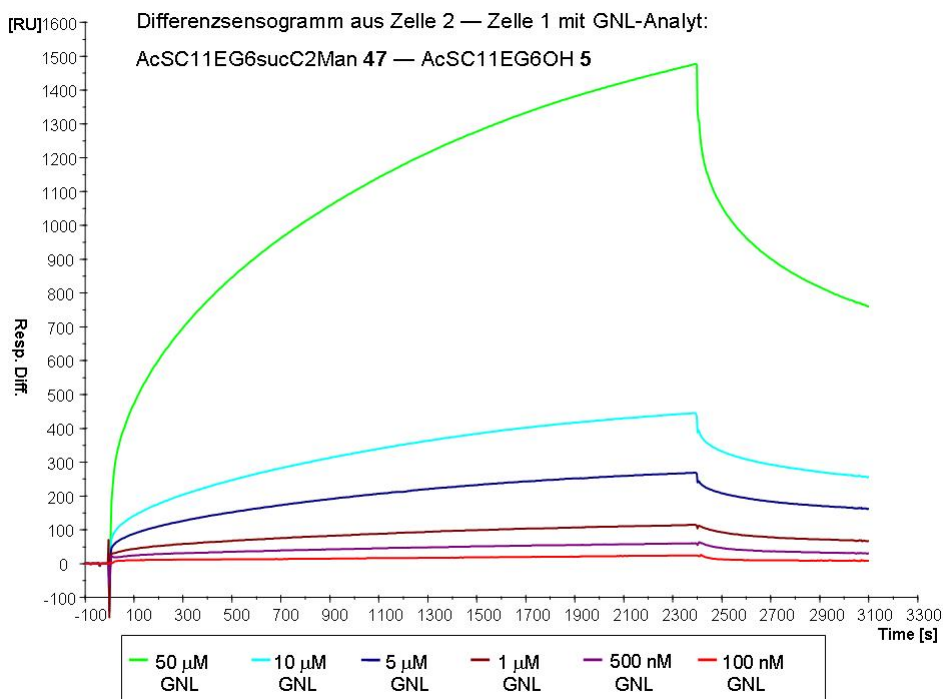


Abbildung 5.11: Differenzsensogramm aus Meßsignal Zelle 2 (SAM mit Mannosid **47**) und Meßsignal Zelle 1 (SAM mit **5**) bei verschiedenen Analytkonzentrationen von GNL.

Für den Bereich nach Beendigung der Analytinjektion (ab  $t = 2400$  s) erkennt man ebenfalls einen deutlichen Unterschied zum Bindungsverhalten von Con A mit Mannosiden. Dies ist auf die Bindungsspezifität von *Galanthus nivalis*-Lektin zurückzu-

führen. GNL besitzt eine ausgeprägte Spezifität zu  $\alpha(1,3)$ -verknüpften Dimannosiden. Vermutlich aus diesem Grund war die Dissoziation des Lektins von der mit Monomannosiden bedeckten Oberfläche erheblich beschleunigt. Das Spülen mit Puffer induzierte ein wesentlich schnelleres Ablösen des Analyten von der Monoschicht, als im vergleichbaren Fall mit Con A.

Der Vergleich mit der nichtspezifischen Adhäsion von Biomolekülen, wie sie in Abschnitt 5.7.2.3 dokumentiert ist, zeigte, daß diese Interaktion ganz erheblich geringere Resonanzsignale lieferte als im analogen, hier gezeigten Experiment mit GNL (Abbildung 5.11). Darüber hinaus war bei der nichtspezifischen Adhäsion, im Unterschied zum hier untersuchten System, die Analytkonzentration ohne Einfluß auf die Adhäsion auf der Saccharidstruktur. Dies belegt, daß die Adhäsion von GNL an einen SAM aus **47** substratspezifisch ist.

**Adhäsion von AAL** Im Rahmen der SPR-Untersuchungen zur spezifischen Wechselwirkung von verschiedenen Lektinen mit saccharidischen Strukturen auf selbstangeordneten Monoschichten wurde auch die Interaktion von *Aleuria Aurantia*-Lektin mit Fucose-tragenden Oberflächen getestet. Da AAL eine hohe Spezifität für Fucosehaltige Disaccharide besitzt (vergl. Abschnitt 5.7.1), ist bei immobilisierten Monosacchariden keine ähnlich starke Adhäsion wie im Fall Con A auf Mannose-SAMs zu erwarten. Es liegt hier also ein zu den oben beschriebenen GNL-Messungen vergleichbarer Fall vor: Es kann zwar eine Präferenz des Lektins für das Monosaccharid, hier L-Fucose, erwartet werden, eine ausgeprägte spezifische Wechselwirkung wird aber kaum stattfinden.

Abbildung 5.12 zeigt das Differenzsensogramm aus Zelle 3 und Zelle 1 (FucC<sub>5</sub>sucEG<sub>6</sub>C<sub>11</sub>SAc **45** – AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>OH **5**) bei verschiedenen Konzentrationen des Lektins AAL. Auch hier ergaben sich positive Differenzsignale, was der stärkeren Adhäsion des Analyten an die Zucker-terminierte SAM-Oberfläche im Vergleich zur Adhäsion an die EG<sub>6</sub>OH-terminierte Oberfläche entspricht. Allerdings war in diesem Beispiel ein eklatanter Unterschied zu den bisherigen Messungen festzustellen, da die Höhe des Differenzsignals, anders als im Fall der Adhäsion von Con A und GNL, mit steigender Analytkonzentration abnahm. Ein Blick auf die direkten Sensogramme von Meßzelle 3 und Meßzelle 1, die hier nicht dargestellt sind, dokumentiert wie erwartet eine mit Erhöhung der Lektinkonzentration proportional steigende Belegung mit Lektin. Daher kann eine auf beiden Oberflächen in ähnlichem Maße unterbliebende Gesamtadhäsion nicht die Ursache sein.

Die beobachtete Entwicklung der Differenzsensogramme mit zunehmender AAL-Konzentration läßt sich entsprechend nur durch sterische Hinderung der Adhäsion

von AAL auf dem Fucose-exponierenden SAM der Meßzelle 3 erklären. Bei geringen Konzentrationen bewirkten die attraktiven Interaktionen zwischen AAL und L-Fucose die stärkere Adhäsion auf der Oberfläche der Zucker-Flußzelle; das Differenzsignal stieg mit der Zeit schnell an. Wurde die Proteinkonzentration hoch genug gewählt (Abb. 5.12:  $50\ \mu\text{M}$ ), so konnte auf dem Fucose-SAM trotz der Fucose-Spezifität des Lektins nicht mehr AAL adhären als auf dem Zucker-freien SAM – das Differenzsignal ist nahezu null.

Die Regenerierung der Zellen wurde durch Spülen mit 50 mM Lösung von L-Fucose durchgeführt.

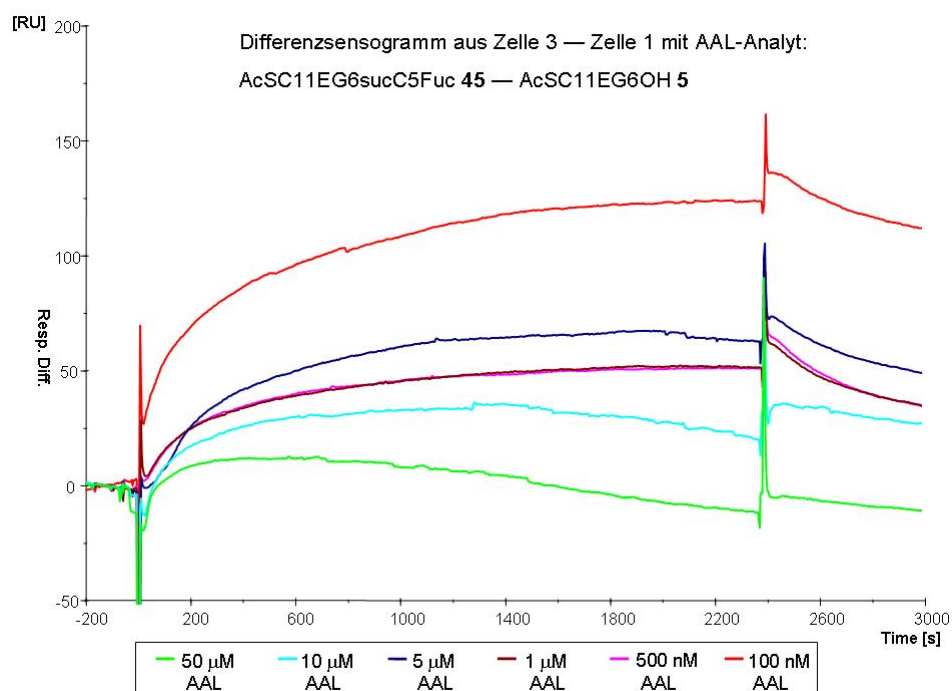


Abbildung 5.12: Differenzsensogramm aus Meßsignal Zelle 3 (SAM mit Fucosid **45**) und Meßsignal Zelle 1 (SAM mit **5**) bei verschiedenen Analytkonzentrationen von AAL.

### 5.7.2.3 Nichtspezifische Interaktionen

Um den Grad der nichtspezifischen Bindung von verschiedenen Biomolekülen an die immobilisierten Monoschichten mit Mannosiden und Fucosiden zu untersuchen, wurden Experimente mit für Galaktose spezifischem MPL und allgemein unspezifisch bindendem BSA durchgeführt.

**Adhäsion von BSA** Abbildung 5.13 zeigt das Differenzsensogramm aus Zelle 3 und Zelle 1 (FucC<sub>5</sub>sucEG<sub>6</sub>C<sub>11</sub>SAc **45** – AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>OH **5**) bei verschiedenen Konzentrationen von BSA-Analytlösung.

Es wurden im untersuchten Konzentrationsbereich von 100 nM – 10  $\mu$ M sehr geringe Werte der Differenzsignale gefunden. Während der 40-minütigen Injektion der Analytlösungen adsorbierten lediglich 30 – 40 Differenz-RUs mehr auf der Fucosid-beschichteten Au-Oberfläche als auf der EG<sub>6</sub>OH-terminierten Oberfläche. Diese nahezu vollständige Konzentrationsunabhängigkeit des Adsorptionsverlaufs ist das erste starke Indiz für nichtspezifische Wechselwirkungen. Zum zweiten zeigten die Differenzsignale nach beendeter Analytinjektion (bei t = 2400 s) eine rasche Annäherung an die initiale Belegung der Zellen. Das bedeutet, daß durch das Spülen mit Puffer sämtliches adsorbiertes Serum Albumin sehr schnell wieder von der Fucose-terminierten Oberfläche der Zelle 3 gespült wurde. Hier wird auch der Unterschied zu den bisherigen untersuchten Systemen deutlich, in denen sich die Gleichgewichtsbelegung (also nach Spülen mit Puffer) im gewählten Zeitrahmen signifikant von dem Ausgangszustand unterschied. Dies wird auch aus Abbildung 5.14 im Abschnitt 5.7.2.4 deutlich.

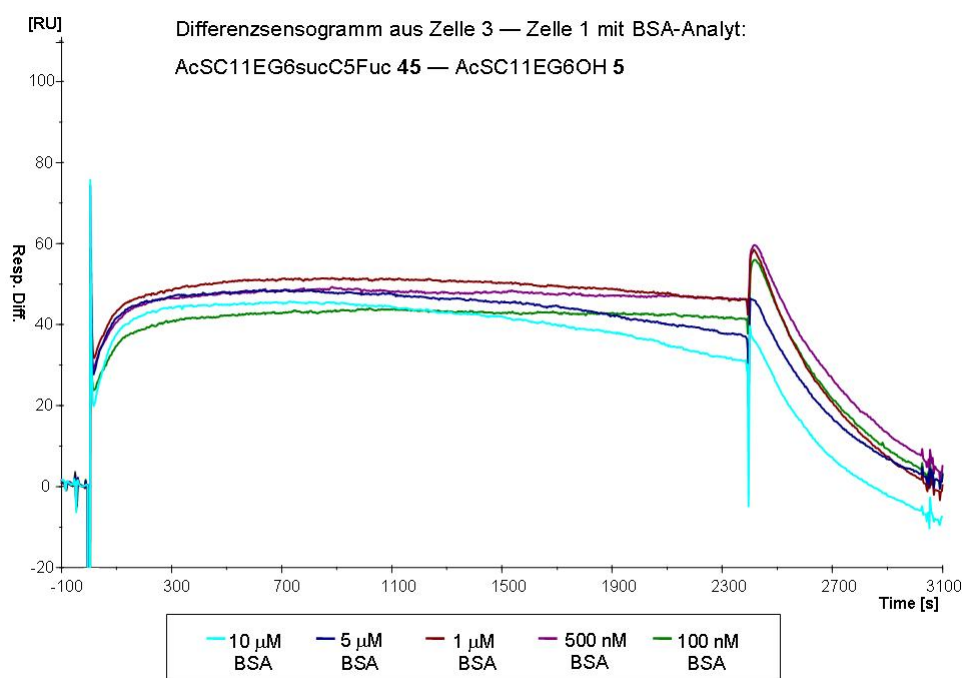


Abbildung 5.13: Differenzsensogramm aus Meßsignal Zelle 3 (SAM mit Fucosid **45**) und Meßsignal Zelle 1 (SAM mit **5**) bei verschiedenen Analytkonzentrationen von BSA.

**Adhäsion von MPL** Im Falle der analogen Differenz-Experimente zur Adhäsion von MPL an der Mannose-exponierenden Oberfläche der Zelle 2 (SAM mit ManC<sub>2</sub>sucEG<sub>6</sub>-C<sub>11</sub>SAc **47**) und der EG<sub>6</sub>OH-terminierten Oberfläche der Zelle 1 (SAM mit AcSC<sub>11</sub>-EG<sub>6</sub>OH **5**) wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten, die hier nicht graphisch dargestellt wurden. Absolut wurde eine im Vergleich zu BSA leicht erhöhte Signaldifferenz von 20 – 100 Differenz-RUs festgestellt. Dennoch konnte auch hier eindeutig von nichtspezifischer Wechselwirkung des getesteten Lektins mit den immobilisierten Monoschichten gesprochen werden.

Um schließlich einen Vergleich der Interaktionen aller getesteten Proteine zu ermöglichen, wurde in Abbildung 5.14 das Differenzsensogramm der Mannose-funktionalisierten Zelle 2 (SAM mit ManC<sub>2</sub>sucEG<sub>6</sub>-C<sub>11</sub>SAc **47**) gegen die Hexaethylenglycol-belegte Flußzelle 1 (SAM mit AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>OH **5**) aufgetragen.

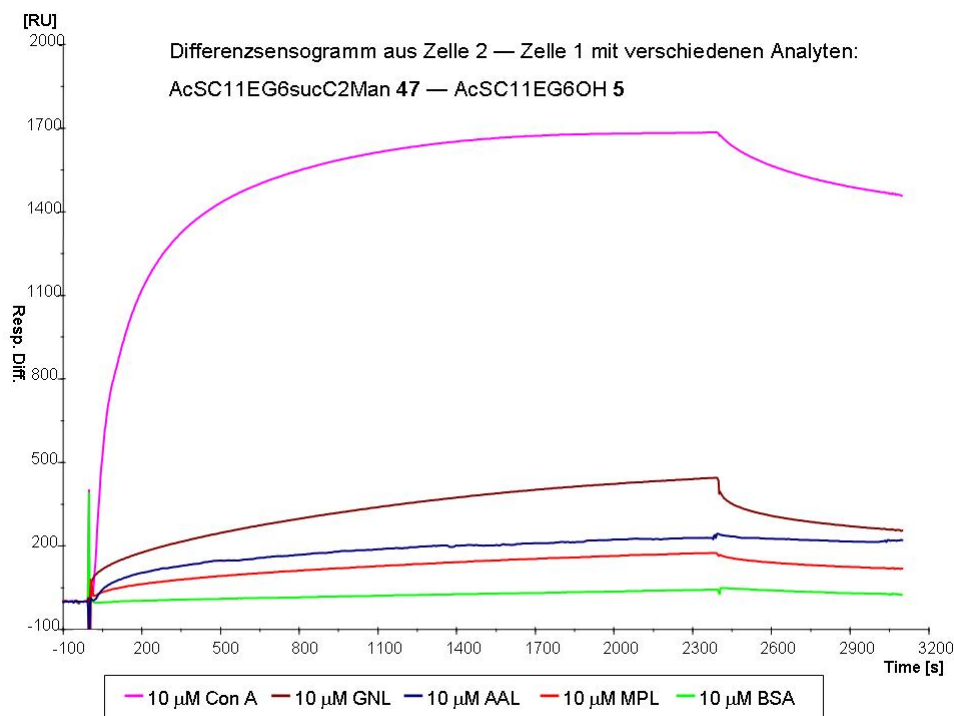


Abbildung 5.14: Vergleich der SPR-Differenzsignale von Zelle 2 (SAM mit **47**) und Zelle 1 (SAM mit **5**) bei verschiedenen Analyten aus den Proteinen Con A, GNL, AAL, MPL und BSA.

Man erkennt das im Vergleich zu allen anderen Lektinen wesentlich stärkere Differenzsignal des Concanavalin A. Dies bestätigte die eingangs hervorgehobene Hypothese, daß sich Con A hervorragend für Untersuchungen dieser Art eignet. Es ließ sich weiterhin feststellen, daß die Stärke der Interaktion zwischen *Galanthus nivalis*-Lektin und Mannose-funktionalisierten Oberflächen geringer als im Fall des Lektins Con A ist. Dennoch konnte eindeutig die selektive Wechselwirkung eines Mannose-tragenden

SAMs mit GNL belegt werden. Dies trifft auch auf den untersuchten Fall von AAL für die Fucose-tragenden Monoschichten zu (hier nicht gezeigt). Auch der umgekehrte Fall – die nichtspezifische Interaktion von Proteinen mit den aufgebauten, Saccharid-beladenen Monoschichten – ließ sich belegen. In Abb. 5.14 ist dies durch die nichtspezifischen Wechselwirkungen von AAL, MPL sowie BSA mit der Mannosid-Oberfläche dokumentiert.

#### 5.7.2.4 Einfluß von Multivalenz

Um das Phänomen der Multivalenz in einem analogen Ansatz untersuchen zu können, wurde das dendritische Mannosid **51** mit einem geeigneten Verdünnungsmolekül auf die Goldoberfläche von SPR-Flußkammern aufgebracht. Als Verdünnungsbaustein wurde der Alkohol **5**, der einen Abschnitt mit Ethylenglycoleinheiten enthält, eingesetzt. In Abbildung 5.15 sind zwei Differenzsensogramme dargestellt.

Die obere Kurvenschar zeigt das Differenzsensogramm aus Zelle 4 und Zelle 1 (1:25-Mischung **51:5** – AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>OH **5**) bei verschiedenen Konzentrationen von Con A-Analytlösung.

Beide Resonanzexperimente ergaben sehr ähnliche Ergebnisse. Der Kurvenverlauf ist in beiden Fällen annähernd identisch. Man konnte keine auf multivalenten Wechselwirkungen beruhende Unterschiede feststellen. Erst die genaue Betrachtung der Differenz-RUs zeigte, daß kleine Unterschiede in der Höhe des Gleichgewichtssignals auftraten.

Lektinkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	<b>47-5</b> [Diff.-RU]	1:25 <b>51:5-5</b> [Diff.-RU]
0.05	71	33
0.1	107	84
1	745	572
5	1635	1574
10	1696	1761
50	1696	1870

Dieser Effekt trat allerdings nur im nanomolaren Bereich auf. Ab Proteinkonzentrationen von ca.  $5 \mu\text{M}$  adhärierte im Vergleich zur Referenzzelle 1 (SAM mit **5**) ähnlich viel Con A auf der einheitlich-monovalent wie auf der gemischt-trivalent beschichteten Oberfläche.

Offenbar entsprach bei einem Mischungsverhältnis von ca. 1 : 25 des dendritischen Bausteins AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>suc(C<sub>2</sub>Man) **51** mit Spacer **5** die „effektive Mannosidkonzentration“ in etwa der der einheitlich Mannosid-funktionalisierten Goldoberfläche. Bei

dieser Interpretation der Meßergebnisse wurde allerdings davon ausgegangen, daß die sterischen Effekte der voluminösen Kopfgruppe für den Prozeß der Immobilisierung von nur untergeordneter Bedeutung sind. Nur in diesem Fall wird sich eine Oberflächenbedeckung der gezeigten Idealverteilung annähern. Man hat jedoch keine Möglichkeit, die strukturelle Zusammensetzung des SAM einer Zelle zerstörungsfrei zu ermitteln.

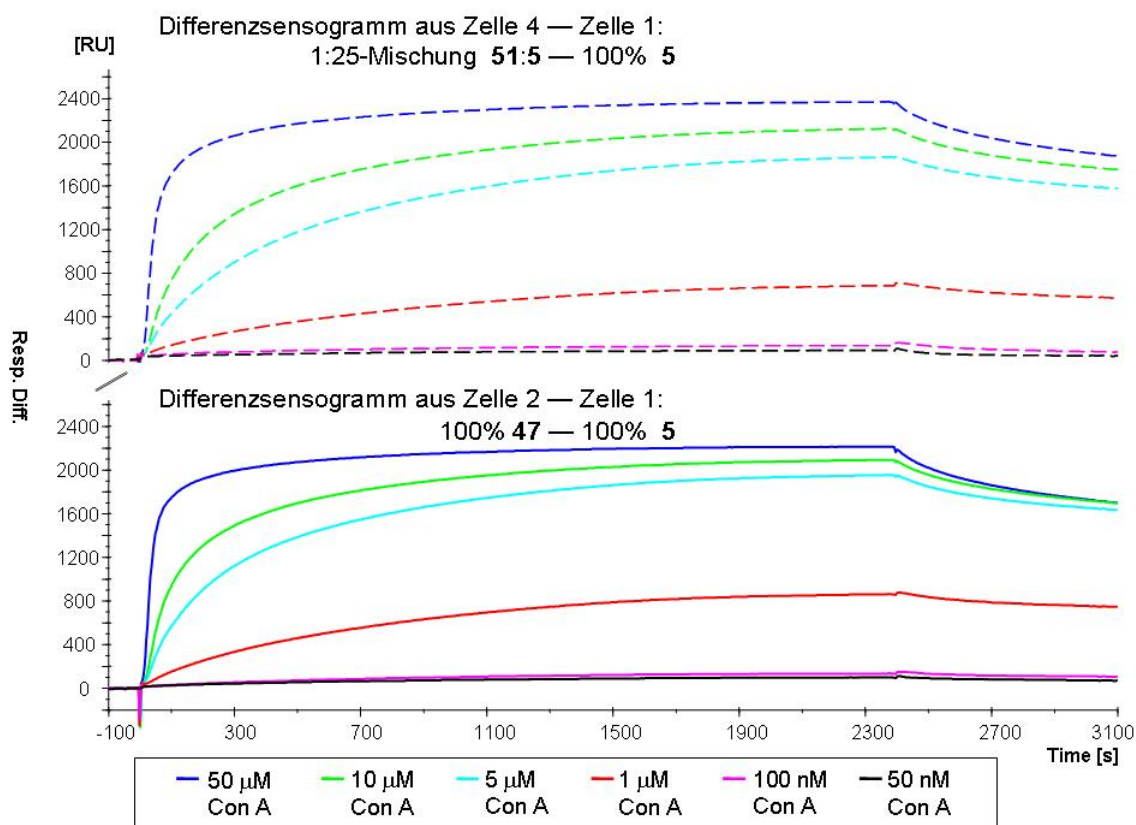
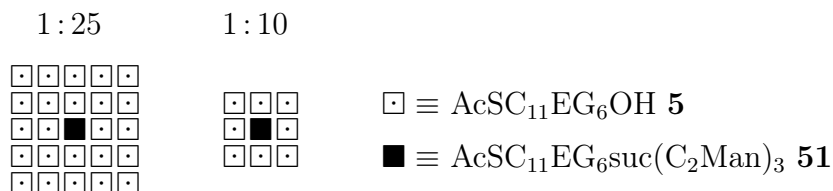


Abbildung 5.15: Differenzsensogramme gemischter und einheitlicher Monoschichten bei verschiedenen Analytkonzentrationen von Con A.

Oben (gestrichelt) Zelle 4 (SAM mit 1 : 25 Verdünnung von **51 : 5**) abzüglich Zelle 1 (SAM mit **5**);

Unten (durchgezogen): Zelle 2 (SAM mit **47**) abzüglich Zelle 1 (SAM mit **5**)



Um diese Ergebnisse weiter zu beleuchten, wurde nun eine andere Verdünnung des Glycoclusters **51** auf dem SAM gewählt. Das Molekül **51** wurde in einer 1 : 10-Verdünnung mit dem Alkohol **5** in einer weiteren Flußkammer fixiert. Auch hier wurde für die jeweiligen Analytkonzentrationen an Con A-Lösung ein vergleichbarer Kurvenverlauf gefunden. In Abbildung 5.16 ist eine andere Auftragung gewählt, um die Unterschiede der Differenz-RUs bei jeweils gleichen Lektinkonzentrationen besser zu verdeutlichen. Gezeigt sind die Differenzsensogramme aus Zelle 5 und Zelle 1 (1:10-Mischung **51:5** – 100% **5**). Man erkennt hier eindeutig den Unterschied zum oben beschriebenen Fall der 1:25-Verdünnung. Die absoluten Adhäsionen auf mono- und trivalentem Rezeptor unterschieden sich deutlich voneinander.

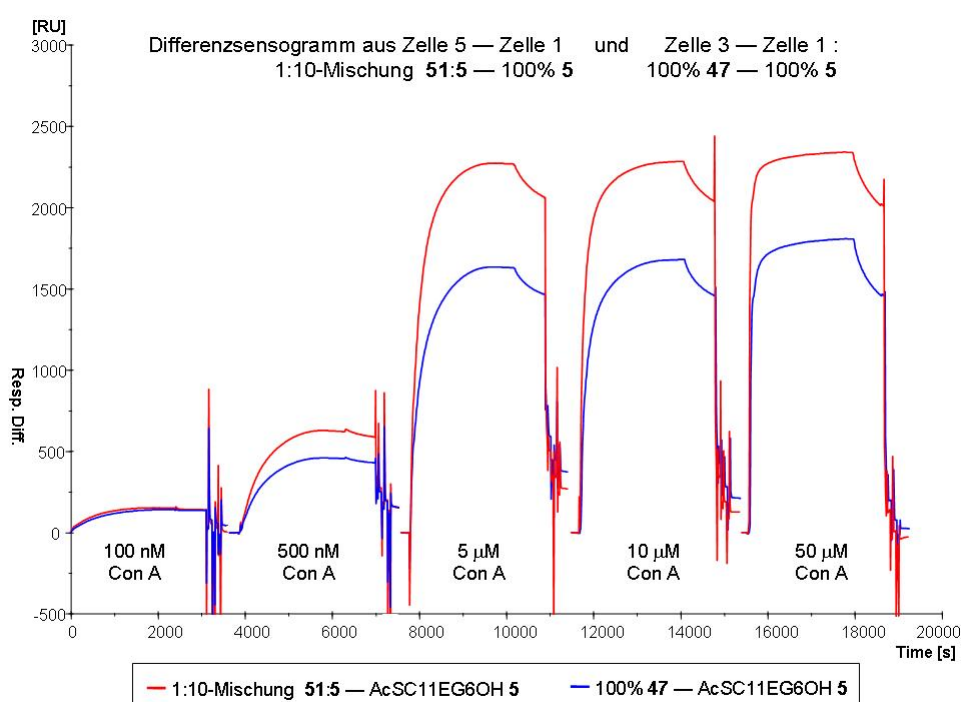


Abbildung 5.16: Differenzsensogramme gemischter und einheitlicher Monoschichten bei verschiedenen Analytkonzentrationen von Con A.

Rot Zelle 5 (SAM mit 1:10-Mischung **51 : 5**) abzüglich Zelle 1 (SAM mit **5**)

Blau Zelle 2 (homogener SAM mit **47**) abzüglich Zelle 1 (SAM mit **5**)

Während bei 100 nM Con A-Lösung die Differenzsignale noch annähernd identisch waren, traten bereits bei 500 nM Analytkonzentration deutliche Unterschiede in der Adsorption zwischen dem SAM mit trivalenten Mannose-Einheiten (Zelle 5, rot) und der Oberfläche mit einheitlich monovalenten Mannosiden (Zelle 2, blau) auf. Adsorbierten auf Zelle 2 etwa 490 RU mehr als auf der Referenzzelle (SAM mit **5**), so konnten auf der mit einer dendritischen Struktur belegten Zelle 5 bereits etwa 680 Diff.-

RUs gemessen werden. Bei  $5 \mu\text{M}$  Con A-Lösung wurden für die Monomannosid-Zelle 1580 Diff.-RUs gemessen und rund 2300 Diff.-RUs für die Zelle, auf der in 1 : 10-Verdünnung das dendritische Mannosid **51** immobilisiert worden war. Ähnliche absolute Differenzen wurden auch für höhere Konzentrationen ermittelt.

Die Zahlenwerte spiegeln deutlich ein multivalentes Bindungsverhalten wider. Aus Abb. 5.5 sowie 5.6 auf Seite 106 wird deutlich, daß auf der vollständig Monomannosid-beladenen Schicht ohne Verdünnungsmolekül etwa 2400 RU deponiert waren. Auf der gemischten Schicht aus dem dendritischen Molekül **51** und bioinaktivem  $\text{EG}_6\text{OH}$ -Spacer **5** wurde eine Belegung in Höhe von nur 1400 RU gefunden. Da hier jedoch zudem die absolute Zahl der fixierten saccharidischen Einheiten durch die 1 : 25-Verdünnung erheblich geringer als in der homogenen Mannose-Zelle ist, kann die starke Interaktion schon bei geringen Lektinkonzentrationen durch multivalente Wechselwirkung erklärt werden. Möglicherweise ist auch die dendritische Grundgerüststruktur des Clusters **51** für die signifikante Steigerung der Protein-Kohlenhydrat-Interaktion verantwortlich.

Das beschriebene System, bestehend aus thiofunktionalisiertem Glycobaustein, Goldoberfläche in SPR-Flußkammer sowie Analytlösung mit diversen Proteinen stellte sich als sehr gut geeignet für umfangreiche Messungen zur Wechselwirkung zwischen Lektinen und Kohlenhydraten heraus.

Da auf einem mit einer vollständig ausgebildeten Zuckerschicht bedecktem SAM eine unkontrollierte Vielzahl von saccharidischen Einheiten exponiert wird, lassen sich *Multivalenzeffekte* hier nicht quantifizieren. In diesem Fall ist nur die Messung der *Selektivität* zwischen Ligand und Rezeptor sinnvoll.

Wird eine geringere Anzahl von verzweigten Zuckerbausteinen auf dem SAM immobilisiert, so läßt sich multivalentes Bindungsverhalten untersuchen. Für diesen Fall ist die konzertierte Fixierung von biologisch inaktiven Verdünnungsmolekülen und sterisch anspruchsvollen, dendritischen Bausteinen nötig, um eine einheitliche Selbstanordnung der Schicht zu gewährleisten. Durch die Option der Fluoreszenzmarkierung sollte sich die Dichte der rezeptorischen Einheiten bestimmen lassen und so den Zugang zu quantitativen Messungen ermöglichen. Hat man die Möglichkeit, die Konzentration von rezeptorischen Einheiten auf dem SAM nach den SPR-Untersuchungen mit Biomolekülen wie z. B. Proteinen zu bestimmen, so kann die unerwünschte Wechselwirkung des Fluoreszenzmarkers im Bioassay ausgeschlossen werden. Dieses Konzept ist durch die 1,3-dipolare Cycloaddition auf dem Gold-Wafer zugänglich.

Trotz der latenten Rigidität der immobilisierten Glycobausteine in Monoschichten auf Gold konnten die erwarteten Lektinspezifitäten bestätigt werden. Auch der Aspekt der Multivalenz in diesen Systemen wurde erfolgreich angesprochen: Durch eine Mischung mit geeigneten Verdünnungsmolekülen ließen sich dendritische Glycocluster hinsichtlich ihrer multivalenten Wechselwirkungen zu kohlenhydratspezifischen Proteinen untersuchen.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die konvergente Synthese von diversen Glycosiden, an die ein lineares Spacermolekül mit terminaler Schwefelfunktion gebunden ist, erreicht. Sowohl monomere als auch geclusterte, trimere Bausteine mit Kohlenhydraten aus der Reihe der L-Fucoside und der D-Mannoside konnten in guten bis sehr guten Ausbeuten aufgebaut werden. Des Weiteren konnten diese Moleküle erfolgreich auf Goldoberflächen in Form von selbstanordnenden Monoschichten immobilisiert werden. Diese SAMs wurden bezüglich ihrer Eigenschaften wie der Schichtdicke oder der Fähigkeit, unspezifische Adhäsionen von Biomolekülen zu unterbinden, getestet. Auch Oberflächen-Plasmonen-Resonanz wurde mit Erfolg angewandt, um die Wechselwirkung von unterschiedlichen, Kohlenhydrat-bindenden Proteinen, den Lektinen, mit diesen Glyco-SAMs quantitativ zu untersuchen und Multivalenzaspekte der Lektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkung zu adressieren.

Um die Synthese mit einem Höchstmaß an Flexibilität auszustatten und die modulare Bauweise der genannten Verbindungen zu gewährleisten, wurde neben der in diesem Zusammenhang literaturbekannten Amidverknüpfung auch die 1,3-dipolare Cycloaddition von Alkinen und Aziden nach HUISGEN in der Kupfer(I)-katalysierten SHARPLESS-Variante eingesetzt. Diese Strategie stellte sich auch als sehr nützlich im Hinblick auf die Modifikation von bereits auf Gold-Wafern fixierten Molekülen dar. Exponierten solche Substrate auf der Au-Schicht terminale Alkinfunktionen, so konnten nach der Immobilisierung die Eigenschaften des Films manipuliert werden. Diesbezüglich wurde erstmalig die Einführung einer Hexaethylenglycolgruppe zur Bildung einer biorepulsiven Oberfläche erfolgreich durchgeführt. Auch andere biofunktionale Kopfgruppen, die einen saccharidischen Terminus trugen, konnten installiert werden.

Um schließlich die effektive Dichte der exponierten Liganden bzw. Rezeptoren auf gemischten Monoschichten, die ebenfalls biologisch inaktive „Verdünnungsmoleküle“ enthalten, bestimmen zu können, wurden parallel zu den beschriebenen homogenen, trivalenten Clustern auch solche aufgebaut, die neben zwei gleichartigen Glycosiden eine dritte Einheit mit Alkinterminus aufwiesen. An dieser Stelle sollte ein alternatives Strukturelement, wie beispielsweise ein anderer Zucker oder auch ein Fluoreszenzmarker angebracht werden können.

Als zu diesem Zweck geeigneter Baustein wurde das Dansylcadaverin-Gerüst gewählt, durch Azidoessigsäure elongiert und dadurch mit einer passenden terminalen Azidfunktion ausgestattet.

Zur Fortführung des Projekts sind mehrere Schwerpunkte möglich. Einerseits sollten weitere variable Kopfgruppen generiert werden, um durch eine Varianz der exponierten sacharidischen Strukturen auf Au-SAMs ein besseres Verständnis der Bindung von Liganden an Proteinoberflächen zu erhalten. Geordnete Monoschichten auf Goldoberflächen stellen in vielen Aspekten eine geeignete Plattform zur Mimikrierung der Glycocalix auf allen Zelloberflächen dar und bieten vielfältige Methoden der Analytik.

Darüber hinaus kann durch den Aufbau einer großen Diversität an immobilisierten Glycostrukturen dem Prinzip der Bindungsverstärkung durch Multivalenz Rechnung getragen werden. Nicht zuletzt sei in diesem Zusammenhang auf Struktur-Wirkungs-Studien hingewiesen.

Hier ist besonders der Aufbau von gemischten, dendritischen Strukturen anzustreben, die u. U. neben reinen Kohlenhydrat-Strukturen auch Säure- oder Ladungstragende Gruppen enthalten. Dies impliziert aus synthetischer Sicht die geschickte Anwendung von Schutzgruppentechniken. So ist, ausgehend vom leicht zugänglichen Tris-Molekül (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan), unter Verwendung der sterisch hoch anspruchsvollen Tritylschutzgruppe, die temporäre Maskierung der Hydroxyfunktion denkbar. An die freien Alkoholgruppen können dann verschiedene Glycosyldonoren angebracht werden. In diesem Kontext erscheint auch die Nutzung dendritischer Azidoglucuronsäuren<sup>[239]</sup> als geeignetes Strukturmotiv, das modular unter Nutzung der SHARPLESS-„Click“-Reaktion installiert werden kann.

Schließlich versprechen die immer weiter entwickelten Computer-gestützten Methoden ein umfassenderes, rationales Verständnis der genauen Vorgänge an der Grenzschicht zwischen Monolayer und flüssiger Phase mit Analytlösung. Dies kann möglicherweise Hinweise auf ein Zielstruktur-basiertes Liganddesign bieten und neue Wege in der Kohlenhydrat-basierten Wirkstoffforschung öffnen.

# 7 Experimenteller Teil

## 7.1 Durchführung der SPR-Experimente

Alle Experimente wurden an einem BIAcore 3000-Gerät der Firma Biacore unter Verwendung der zugehörigen Steuersoftware (Version 3.2) durchgeführt. Die Auswertung der Experimente erfolgte durch die mitgelieferte Evaluationssoftware (Version 4.1). In allen Versuchen wurden Sensorchips der Firma Biacore eingesetzt. Diese Chips besitzen vier einzelne Flußzellen, die separat angesteuert werden können.

Vor Benutzung wurden die Chips für 10 min in einer 70:30 Mischung aus 96 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  gereinigt. Alle Zellen wurden zunächst dreimal für ca. sechs Minuten mit dem Puffer gespült (priming), bevor das optische System ca. vier Minuten mit 70 % (w/w) Glycerin in Wasser normalisiert wurde (normalizing).

Der jeweilige Analyt wurde für alle Experimente in einem HBS-P-Puffer dieser Firma gelöst. Der Puffer wurde auf pH 7.4 eingestellt und bestand aus 0.01 M HEPES, 0.15 mM Natriumchlorid und 0.005 % Polysorbat 20 (v/v). Diesem Puffer wurden  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  und  $\text{MnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  zugesetzt, so daß die Lösung eine Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  bezüglich der Metallionen hatte. Der Puffer wurde täglich bei reduziertem Druck im Ultraschallbad entgast.

Die Flußgeschwindigkeit in den Immobilisierungsprozeduren betrug 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  und wurde über 30 min gehalten, bevor eine zweiminütige Spülphase mit Pufferlösung folgte. In allen Experimenten wurde der „Kinject“-Befehl der BIAcore-Steuersoftware verwandt. Zur Immobilisierung der Substanzen selbst wurde der „Quickinject“-Befehl benutzt. Alle Messungen wurden bei 25 °C thermostatisiert durchgeführt.

Concanavalin A aus *Concanavalia ensiformis* (Fluka) wurde vor Gebrauch 2 d in HBS-P-Puffer dialysiert (Slide-A-Lyzer, 10000 Da, Fa. Pierce), um Mannosereste im Lyophilisat zu entfernen, und anschließend durch einen Spritzenfilter (Spartan 30/0.22 RC der Fa. Schleicher & Schuell) mit einer Porengröße von 0.22  $\mu\text{m}$  filtriert. Die Konzentration wurde UV-spektrometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280 \text{ nm}$  über die optische Dichte bestimmt.

GNL, MPL und AAL der Firma VectorLabs wurden ohne Dialyse eingesetzt.

## 7.2 Vorbemerkungen und Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

### Reaktionsvorschriften

Alle luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden in ausgeheizten Glasgeräten unter Stickstoff- bzw. Argonatmosphäre durchgeführt. Alle kommerziell erhältlichen Reagentien wurden – sofern nicht anders vermerkt – ohne zusätzliche Reinigungsvorgänge eingesetzt. Es wurden ausschließlich vordestillierte bzw. absolutierte Lösungsmittel eingesetzt:

Cyclohexan	über Kaliumhydroxid
Dichlormethan	über Calciumhydrid
Essigsäureethylester	über Natriumcarbonat
Ethanol	über Magnesiumspänen
Methanol	über Magnesiumspänen
THF	über Na-K-Legierung / Benzophenon
Acetonitril	getrocknet vom Hersteller (Fluka)
DCE	getrocknet vom Hersteller (Fluka)
DMF	getrocknet vom Hersteller (Fluka)
DMSO	getrocknet vom Hersteller (Fluka)
Toluol	getrocknet vom Hersteller (Fluka)

Für die **Säulenchromatographie** wurde Kieselgel 60 (230–400 mesh, Korngröße 0.040–0.063 mm) von Merck eingesetzt. Dabei wurde leichter Überdruck verwandt.

**Dünnschichtchromatogramme** wurden auf Kieselfolie (GF<sub>254</sub>, Merck), **RP-Dünnschichtchromatogramme** auf DC-Folie RP-18 F<sub>254s</sub> (Merck) angefertigt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe einer UV-Lampe ( $\lambda = 254$  nm und  $\lambda = 366$  nm) sowie durch diverse Färbereagentien.

Für die **Gel-Permeations-Chromatographie** (GPC) wurden Sephadex LH-20 sowie LH-60 -Gele der Firma Amersham-Pharmazia-Biotech verwendet. Diese Trennmethode fand insbesondere bei Reinigungen von Molekülen mit Molmassen  $> 800$  g/mol Verwendung.

**Analytische HPLC** wurde mit einer Anlage der Fa. Merck-Hitachi betrieben, bestehend aus dem Interface D-7000, der Pumpe L-7100, dem Dioden-Array-Detektor L-7455, dem RI-Detektor L-7490, dem Säulenofen L-7350 und dem Autosampler L-7200.

**Präparative HPLC** wurde durchgeführt auf einer Anlage der Fa. Shimadzu, bestehend aus dem SCL-10A System Controller, Degasser DGU-14A, zwei LC-8A Pumpen, RID-10A Detektor und SPD-M10A Dioden-Array-Detektor. Es wurde eine Hibar RT 250-25 mm Säule, gepackt mit LiChrosorb RP-8 ( $7\mu\text{m}$ ) Kieselgel, der Fa. Merck benutzt.

**Belichtungen** wurden durchgeführt mit einer Mitteldruck-Quecksilberdampfampe mit einer Leistung von 150 W. Um minimale Wellenlängen zu definieren, wurden Kantenfilter WG 295 der Fa. Schott Glas eingesetzt. Die Reaktionen wurden in üblichen Schott-Duran Glaskolben durchgeführt.

Bei Huisgen-Cycloadditionen wurden zur Reaktionsaufarbeitung die **Spritzenfilter** Spartan 30/0.45 RC der Fa. Schleicher & Schuell mit einer Porengröße von  $0.45\ \mu\text{m}$  verwandt.

## Physikalische Daten

**NMR-Spektren** wurden auf Spektrometern der Marke Bruker (ARX 300 und DRX 500) gemessen. Dabei lagen die Meßfrequenzen für den  $^1\text{H}$ -Kern bei 500.13 MHz bzw. 300 MHz und bei 125.75 MHz bzw. 75.47 MHz für den  $^{13}\text{C}$ -Kern. Im Falle von  $\text{CDCl}_3$  als Lösungsmittel wurde auf Tetramethylsilan als internem Standard kalibriert, bei anderen Lösungsmitteln wurden deren jeweilige Signale verwendet. Damit ergeben sich folgende Verschiebungen:

$\text{CDCl}_3$	$^1\text{H}$ 7.26 ppm (s)	$^{13}\text{C}$ 77.00 ppm (t)
$\text{CD}_3\text{OD}$	$^1\text{H}$ 3.35 ppm (s)	$^{13}\text{C}$ 49.00 ppm (sept)
$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	$^1\text{H}$ 2.49 ppm (quint)	$^{13}\text{C}$ 39.70 ppm (sept)

$^1\text{H}$ -NMR-Verschiebungen sind in ppm auf einer  $\delta$ -Skala aufgelistet. Die folgenden Abkürzungen wurden zur Beschreibung der Multiplizitäten verwendet:

**s** = Singulett, **d** = Dublett, **t** = Triplett, **q** = Quartett, **quint** = Quintett,  
**sept** = Septett, **m** = Multiplett, **br** = breites Signal



Kopplungskonstanten ( $J$ ) werden in Hertz (Hz) angegeben. C-H-Kopplungen wurden durch Gated-Decoupling- $^{13}\text{C}$ -Spektren bestimmt bzw. durch Breitbandeinstrahlung unterdrückt, wo dies gewünscht war. Durch DEPT-135-Experimente wurden primäre, sekundäre, tertiäre und quartäre Kohlenstoffatome zugeordnet. In Einzelfällen wurden zur eindeutigen Bestimmung von Konfigurationen ( $^1\text{H}, ^1\text{H}$ )-COSY, HS-QC/HMBC oder ( $^1\text{H}, ^1\text{H}$ )-NOE-Experimente durchgeführt.

Die Indizierung der Kohlenstoff- und Wasserstoffatome wurde folgendermaßen vorgenommen: Der Kohlenhydratrest wird, wie üblich, von 1 bis 6 durchnummeriert mit H-1 an der anomeren Position. Die Atome des Spacerteils erhalten steigende Zahlen, beginnend bei der glycosidischen Bindung. In zuckerfreien Spacermolekülen wird der Thioacetatrest als Terminus bezeichnet und entsprechend mit der Zählung vom anderen Ende des Moleküls begonnen. Dies ist in Abbildung 7.1 exemplarisch gezeigt.

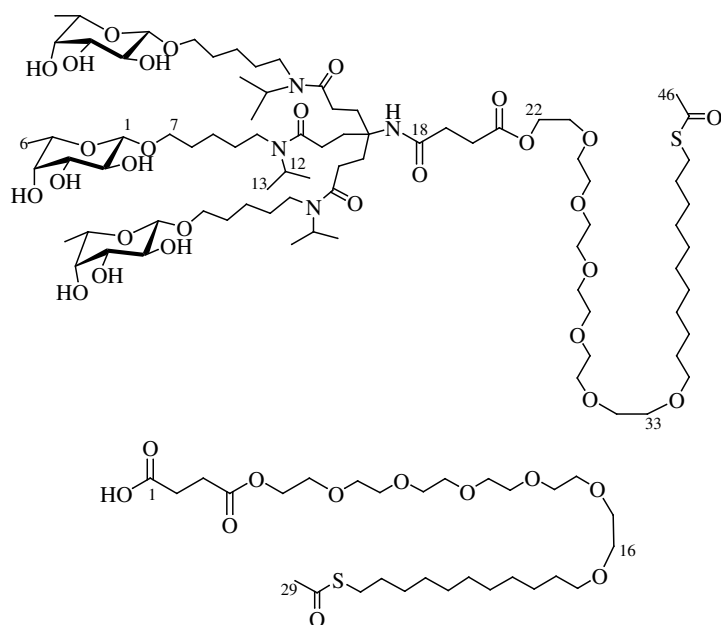


Abbildung 7.1: Indizierung der Atompositionen

Es wurde in Anlehnung an die „Authors Instructions“ vieler Journale auf die vollständigen Bezeichnungen der synthetisierten Verbindungen nach der IUPAC-Nomenklatur zugunsten einer eingängigen Benennung verzichtet. Um Mißverständnisse auszuschließen, sind alle Verbindungen als Strukturformel abgebildet, und die Indizierung der Atompositionen ist angegeben.

**CI- und EI-Massenspektren** wurden auf einem Massenspektrometer MAT 8200 der Fa. Finnigan bei Raumtemperatur aufgenommen. Als Kollisionsgas (CI) wurde Isobutan verwendet. Die relativen Intensitäten sind in Prozent bezogen auf das Basissignal angegeben.

**MALDI-ToF-Massenspektren** wurden an einem Biflex III-Gerät der Firma Bruker mit 19 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen. Als Matrizes wurden Norharman (9H-Pyrido-[3,4-b]indol) (ges. Lösung in THF) oder DHB ( $c = 10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  in Acetonitril/Wasser = 1:2 mit einem Zusatz von 0.1% TFA verwendet. Die Proben wurden im Schichtverfahren auf das Target aufgetragen. Bestrahlung erfolgte mit einem Stickstofflaser bei 337 nm.

**ESI-Massenspektren** wurden auf einem Mariner ESI-ToF 5280 der Fa. Applied Biosystems aufgenommen.

**Drehwerte**  $[\alpha]$  wurden mit dem Perkin-Elmer Polarimeter 243 in dem angegebenen Lösungsmittel gemessen (Natrium-D-Linie: 589 nm, Küvettenlänge = 10 cm).

**IR-Spektren** wurden auf einem FT-IR-Spektrometer Paragon 1000 der Fa. Perkin Elmer aufgenommen. Feste Substanzen wurden als gemischter KBr-Pressling, flüssige oder hochviskose Produkte wurden als Film, auf einen KBr-Pressling aufgetragen, vermessen. Die Bandenlagen sind in Wellenzahlen ( $\text{cm}^{-1}$ ) angegeben. Die Bandenformen sind wie folgt beschrieben:

**br** = breit, **w** = schwach, **m** = mittel, **s** = stark

**Schichtdicken** wurden mit dem Ellipsometer SE 400 der Firma Sentech Instruments gemessen.

## Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

### Peptidknüpfung (AAV 1):

Die Carbonsäure (1 eq.) wurde unter Stickstoffatmosphäre in 1-3 ml abs. DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Chlorameisensäureisobutylester (IBCF) (1.2 eq.) und Tripropylamin (2.0 eq.) wurden langsam zugegeben, und die Reaktionsmischung wurde zur Bildung des gemischten Anhydrids ca. 30 min gerührt, bevor eine konzentrierte Lösung des Amins (1.2 eq.) in abs. DMF und schließlich Tripropylamin (1 eq.) langsam der Reaktionsmischung zugegeben wurden. Die Lösung wurde auf RT erwärmt und 2-6 h gerührt.

### 1,3-dipolare Cycloaddition nach Huisgen/Sharpless (AAV 2):

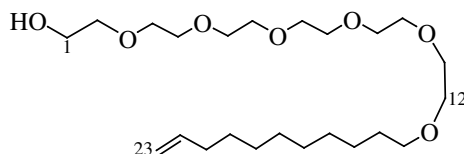
Das Azid (1.0 eq.) und das Alkin (1.0 eq.) werden in einem ausgeheizten und mit Schutzgas gespülten (sauerstofffreie Atmosphäre) Kolben in 0.5-1 ml des angegebenen, entgasten Lösungsmittels gelöst und mit Kupfer(I)iodid (0.2-5 eq.) versehen. Danach wird bei RT die Base zugegeben und meist über Nacht gerührt.

### Photochemische Addition vom Thioessigsäure (AAV 3):

Das terminale Alken wird unter Schutzgasatmosphäre in abs. THF gelöst und mit Thioessigsäure versehen. Unmittelbar vor der Bestrahlung durch die UV-Lampe mit vorgeschaltetem Wellenlängenfilter ( $\lambda \geq 295$  nm) wird Azobis-(isobutylnitril) zugegeben und der Ansatz für 2-6 h gerührt. Zur Aufarbeitung wurden vor dem Entfernen der Lösungsmittel *in vacuo* zumeist einige ml Dichlorethan der Reaktionsmischung zugegeben, damit diese relativ schwerflüchtige Komponente die Konzentration der Thioessigsäure während des Verdampfens nicht zu hoch werden ließ.

## 7.3 Experimentelle Daten

Undec-(10)-enyl-hexaethylenglycol (**3**) HOEG<sub>6</sub>C<sub>9</sub>CH=CH<sub>2</sub>



Zu 1.16 g (4.10 mmol) Hexaethylenglycol in 4 ml abs. DMF wurden unter Argonatmosphäre 101 mg (4.20 mmol) Natriumhydrid (60 %ige Dispersion in Mineralöl) geben und der Ansatz bei RT zunächst 30 min gerührt und danach auf 0 °C abgekühlt. 478 mg (2.05 mmol) 11-Bromundec-(1)-en, gelöst in 2 ml abs DMF, wurden langsam zugetropft und nach beendeter Zugabe wurde die trübe Reaktionsmischung auf RT erwärmt und für weitere 15 h gerührt. Zum Quenchen wurden 5 ml NH<sub>4</sub>Cl (aq) zugegeben und die orangefarbene Emulsion für 5 min gerührt. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Trennung über silica (MeOH/DCM 1:20) lieferte ein gelbliches Öl. Ausbeute: 711 mg (1.635 mmol, M = 434.61 g/mol) 80 %.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[150]</sup>

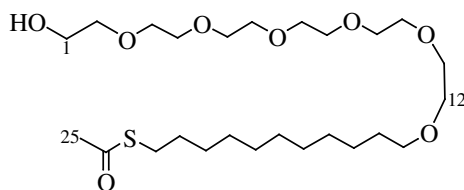
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 5.82 (ddt,  $J$  = 6.63 Hz,  $J$  = 10.28 Hz,  $J$  = 17.14 Hz, 1H, H-22), 5.03-5.01 und 4.97-4.90 (m, 2H, 2 H-23), 3.74-3.71 (m, 2H, 2 H-3), 3.66-3.56 (m, 22H, 2 (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12)), 3.44 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, 2 H-13), 2.74 (br, 1H, OH), 2.07-2.00 (m, 2H, 2 H-21), 1.55 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, 2 H-14), 1.37-1.28 (m, 12H, 2 ((H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-22))).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 139.16 (C-22), 114.04 (C-23), 72.46 (C-2), 71.46 (C-12), 70.50 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-10, C-11, C-12, C-13), 61.65 (C-1), 33.74 (C-21), 29.50 (C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21), 26.00.

**IR**  $\tilde{\nu}$  = 3452 (m), 3074 (w), 2924 (s), 2855 (s), 1960 (w), 1640 (m), 1462 (m), 1350 (m), 1297 (m), 1249 (m), 1118 (s), 994 (w), 947 (w), 910 (m), 722 (w).

**EI-MS**  $m/z$  434 ([M + H]<sup>+</sup>, 2.72), 391 (2.07), 347 (1.66), 301 (1.07), 257 (1.24), 241 (1.58), 208 (2.84), 177 (13.50), 133 (47.15), 89 (100.00).

**HR-MS** C<sub>23</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub> = M<sup>+</sup> berechnet: 434.3243 gefunden: 434.3240.

11-(Acetylthio-undecyl)-hexaethylenglycol (**5**), AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>OH

Gemäß AAV 3 werden 400 mg (0.920 mmol) des Alkohols **3** wurden unter Argonatmosphäre in 6 ml abs. THF gelöst, 156  $\mu$ l (2.30 mmol) Thioessigsäure und 75.6 mg (0.460 mmol) AIBN wurden zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 3 h unter UV-Bestrahlung gerührt. Da die DC-Kontrolle eine noch unvollständige Umsetzung zeigte, wurden zusätzliche 70 mg (0.426 mmol) AIBN zugegeben und für weitere 2 h bestrahlt. Hiernach wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der kristalline Rückstand durch Säulenchromatographie (EE/CH 4:1  $\rightarrow$  MeOH/DCM 1:20) gereinigt. Es wurde ein farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 455 mg (0.889 mmol, M = 510.73 g/mol) 97%.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[150]</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 3.73-3.68 (m, 2H, 2 H-1), 3.66-3.54 (m, 22H, 2 (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12)), 3.43 (t,  $J$  = 6.80 Hz, 2 H-13), 2.85 (t,  $J$  = 7.36 Hz, 2 H-23), 2.62 (br, 1H, OH), 2.31 (2, 3H, 3 H-25), 1.59-1.49 (m, 4H, 2 H-14, 2 H-22), 1.30-1.24 (m, 14H, 2 (H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 196.09 (C-24), 72.45 (C-2), 71.52 (C-13), 70.56-70.01 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12), 61.70 (C-1), 30.62 (C-25), 29.60-28.79 (C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21, C-22), 26.05 (C-23).

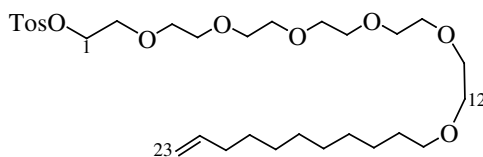
**IR**  $\tilde{\nu}$  = 3456 (m), 2925 (s), 2855 (s), 1959 (w), 1692 (s), 1462 (m), 1352 (m), 1297 (m), 1248 (m), 1116 (s), 952 (m), 884 (w), 726 (w), 627 (m).

**CI-MS**  $m/z$  511 ([M + H]<sup>+</sup>, 100.00), 496 (13.50), 435 (1.29), 361 (1.40), 325 (2.45), 317 (1.68), 283 (2.79), 229 (2.03), 187 (2.61), 177 (2.82) 133 (3.91).

**MALDI**  $m/z$  533.4 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 533.7 berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>50</sub>O<sub>8</sub>S + Na);  $m/z$  549.4 [M + K]<sup>+</sup> (M = 549.8 berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>50</sub>O<sub>8</sub>S + K).

**ESI-MS**  $m/z$  533.3154 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 533.3119 berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>50</sub>O<sub>8</sub>S + Na).

**1-O-Toluolsulfonyl- $\omega$ -(undec-(10)-enyl)-hexaethylenglycol (7),**

 TosOEG<sub>6</sub>C<sub>9</sub>CH=CH<sub>2</sub>


Es wurden 4.0 g (9.20 mmol) des Alkohols **3**, 2.065 g (18.4 mmol) DABCO und 100 mg 4 Å Molsieb in 13 ml Essigsäureethylester gelöst und auf 0 °C gekühlt. In diese gerührte Suspension wurden langsam 2.632 g (13.80 mmol) Tosylchlorid gegeben, worauf sich eine hochviskose Suspension im Kolben bildete, die, auf RT erwärmt, für 1.5 h gerührt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde durch Papier filtriert und das Filtrat mit 5 ml 2M HCl versetzt. Die organische Phase wurde mit 5 ml NaHCO<sub>3</sub> (aq) und anschließend 5 ml Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (EE/CH 2:1 → EE/CH 4:1) gereinigt und ergab ein blaß-gelbes Öl.

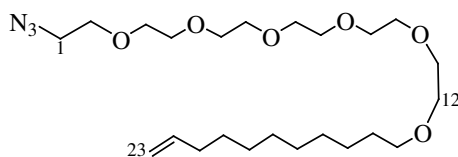
Ausbeute: 4.434 mg (7.531 mmol, M = 588.80 g/mol) 82 %.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 7.80 (dt,  $J$  = 1.88 Hz,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, 2 Ar-H), 7.48 (m, 2H, 2 Ar-H), 5.81 (ddt,  $J$  = 6.63 Hz,  $J$  = 10.29 Hz,  $J$  = 17.1 Hz, 1H, H-21), 5.03-5.01 und 4.97-4.90 (m, 2H, 2 H-23), 4.16 (t,  $J$  = 4.81 Hz, 2H, 2 H-1), 3.70-3.56 (m, 22H, 2 (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12)), 3.44 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, 2 H-15), 2.45 (s, 3H, 3 Ar-CH<sub>3</sub>), 2.07-2.00 (m, 2H, 2 H-21), 1.59-1.55 (m, 2H, 2 x H-14), 1.30-1.28 (m, 12H, 2 (H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 144.74 (Ar-C), 139.19 (C-22), 132.90 (Ar-C), 129.78 (Ar-C), 127.94 (Ar-C), 114.07 (C-23), 71.49 (C-2), 70.53 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11), 69.99 (C-1), 69.20 (C-12), 68.62 (C-13), 33, 77 (C-21), 29.10 (C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19), 26.03, 21.61 (Ar-C).

**IR**  $\tilde{\nu}$  = 3509 (w), 3072 (w), 2925 (s), 2856 (s), 1736 (w), 1640 (m), 1598 (m), 1454 (m), 1359 (s), 1292 (m), 1248 (m), 1189 (s), 1178 (s), 1113 (br), 1019 (m), 923 (s), 817 (m), 775 (m), 664 (s), 555 (s).

**CI-MS**  $m/z$  598 ([M + H]<sup>+</sup>, 100.00), 545 (1.50), 501 (2.59), 437 (41.41), 375 (9.63), 331 (29.64), 287 (27.68), 241 (37.48), 199 (59.77), 133 (18.88), 89 (39.46).

**1-Azido- $\omega$ -(undec-(10)-enyl)-hexaethylenglycol (8)**,  $\text{N}_3\text{EG}_6\text{C}_9\text{CH}=\text{CH}_2$ 

Es wurden 4.39 g (7.46 mmol) des Tosylats **7** zusammen mit 2.427 g (37.28 mmol) Natriumazid und 1.537 g (4.20 mmol) Tetrabutylammoniumiodid unter Argonatmosphäre in 50 ml abs. DMF gelöst, auf 70 °C erwärmt und 2 h bei dieser Temperatur gerührt. Danach wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt durch eine kurze Kieselgelsäule (EE/CH 2:1) filtriert. Man erhielt ein farbloses Öl.  
Ausbeute: 3.328 g (7.241 mmol,  $M = 459.62$  g/mol) 97 %.

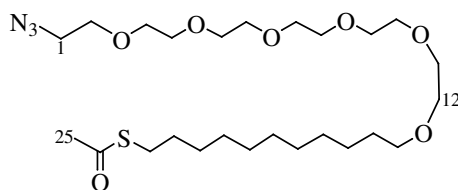
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta = 5.80$  (ddt,  $J = 6.75$  Hz,  $J = 10.28$  Hz,  $J = 17.14$  Hz, 1H, H-22), 4.98 (ddt,  $J = 1.65$  Hz,  $J = 2.20$  Hz,  $J = 17.06$  Hz, 1H, H-23), 4.94 (ddt,  $J = 1.19$  Hz,  $J = 2.02$  Hz,  $J = 10.18$  Hz, 1H, H-23'), 3.68-3.62 (m, 20H, 2 (H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12)), 3.58-3.56 (m, 2H, 2 H-2), 3.43 (t,  $J = 6.79$  Hz, 2H, 2 H-13), 3.38 (t,  $J = 5.14$  Hz, 2H, 2 H-1), 2.05-2.00 (m, 2H, 2 H-12), 1.56 (q,  $J = 14.67$  Hz, 2H, 2 H-14), 1.36 (t,  $J = 7.25$  Hz, 2H, 2 H-15), 1.32-1.28 (m, 10H, 2 (H-16, H-17, H-18, H-19, H-20)).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta = 139.23$  (C-22), 114.09 (C-23), 71.53 (C-13), 70.63 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12), 70, 03 (C-2), 50.65 (C-1), 33.80 (C-21), 29.61-28.90 (C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20), 26.00.

**IR**  $\tilde{\nu} = 3590$  (w), 3074 (w), 2924 (s), 2854 (s), 2103 (s), 1737 (w), 1340 (m), 1455 (s), 1348 (s), 1300 (s), 1249 (m), 1118 (s), 1039 (m), 994 (m), 910 (s), 853 (m), 722 (w), 644 (w), 556 (w).

**CI-MS**  $m/z$  460 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 9.61), 432 (100.00), 388 (1.22), 292 (2.09), 241 (2.53), 177 (1.40), 147 (2.14), 133 (2.09), 97 (3.01).

**ESI-MS**  $m/z$  482.3270  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $M = 482.3201$  berechnet für  $\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{O}_6\text{N}_3 + \text{Na}$ );  $m/z$  498.3022  $[\text{M} + \text{K}]^+$  ( $M = 408.2940$  berechnet für  $\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{O}_6\text{N}_3 + \text{K}$ ).

**1-Azido- $\omega$ -(11-acetylthio-undecyl)-hexaethylenglycol, (9), AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>N<sub>3</sub>**

Gemäß der AAV 3 werden 2.90 g (6.310 mmol) des Azids **8** in 40 ml abs. THF gelöst und nach Zugabe von 1.122 ml (15.774 mmol) Thioessigsäure und 829.0 mg (5.048 mmol) AIBN bei RT der UV-Bestrahlung für 3.5 h ausgesetzt. Aus dem gelblichen Reaktionsgemisch wurden die Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt und das gelbliche Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (EE/CH 2:1 → 4:1). Man erhielt ein farbloses Öl.

Ausbeute: 2.972 g (5.547 mmol,  $M = 535.74$  g/mol) 88%.

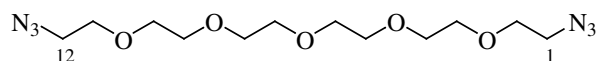
Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[150]</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta = 3.68$ -3.62 (m, 20H, 2 x (H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11)), 3.57-3.55 (m, 2H, 2 x H-2), 3.43 (t,  $J = 6.79$  Hz, 2H, 2 H-13), 3.38 (t,  $J = 5.07$  Hz, 2H, 2 H-1), 2.85 (t,  $J = 7.34$  Hz, 2H, 2 H-13), 2.31 (s, 3H, 3 x H-25), 1.57-1.52 (m, 4H, 2 H-14, 2 H-22), 1.25 (br, 14H, 2 x (H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta = 195.99$  (C-24), 71.51 (C-13), 70.68-70.03 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-10, C-11, C-12), 70.01 (C-2), 50.66 (C-1), 30.60 (C-25), 29.60-29.06 (C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21, C-22), 28.89 (C-23), 28.78 (C-18), 26.05 (C-17).

**IR**  $\tilde{\nu} = 3446$  (w), 2925 (s), 2855 (s), 2357 (w), 2105 (s), 1692 (s), 1462 (m), 1351 (m), 1300 (m), 1114 (s), 951 (m), 627 (m).

**CI-MS**  $m/z$  536 ([M +H]<sup>+</sup>, 21.46), 508 (100.00), 460 (6.78), 432 (51.39), 361 (1.20), 308 (1.67), 229 (2.42), 187 (3.07), 103 (2.16), 87 (7.32).

**1,  $\omega$ -Diazido-hexaethylenglycol, (11), N<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>N<sub>3</sub>**

1 g (3.544 mmol) Hexaethylenglycol und 100 mg ausgeheiztes 4 Å Molsieb wurden in 3 ml EE aufgeschlämmt und mit 1.192 mg (10.625 mmol) DABCO versehen. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C gekühlt und unter rühren wurden 1.688 g (8.855 mmol)



Tosylchlorid in kleinen Portionen zugegeben. Der Ansatz wurde eine Stunde bei dieser Temperatur gerührt, dann auf RT erwärmt und eine weitere Stunde gerührt, bevor mit 10 ml EE verdünnt wurde. Die farblose Suspension wurde über Celite filtriert und der Rückstand mit MTBE gewaschen. Das Filtrat wurde mit 15 ml 2 M HCl<sub>(aq)</sub> gewaschen, bevor die Phasen getrennt wurden und die organische Phase nacheinander mit jeweils 10 ml NaHCO<sub>3(aq)</sub>, H<sub>2</sub>O, NaCl<sub>(aq)</sub> extrahiert und über NaSO<sub>4</sub> getrocknet wurde. Die Lösungsmittel wurden *in vacuo* entfernt und das so erhaltene Ditosylat wurde ohne weitere Aufreinigung in 25 ml DMF gelöst. Es wurden 1.05 g (2.830 mmol) TBAI und 2.306 g (35.40 mmol) NaN<sub>3</sub> zugegeben und der Ansatz wurde 15 h bei 70 °C gerührt. Aus der farblosen Suspension wurden die Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt. Zum Quenchen wurden 10 ml *aqua dem* zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase je dreimal mit 10 ml DCM und MTBE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaCl<sub>(aq)</sub> gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das orange-farbene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (EE/CH 2:1 → 3:1) gereinigt und ergab ein farbloses Öl.

Ausbeute: 0.649 g (1.953 mmol, M = 332.359 g/mol) 55 % über zwei Stufen.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[46]</sup>

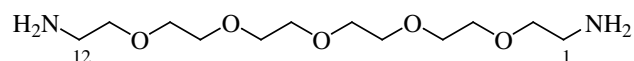
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ = 3.69-3.66 (m, 20H, 2 (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11)), 3.39 (t, J = 5.14 Hz, 4H, 2 (H-1, H-12)).

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ = 70.50 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10), 69.94 (C-2, C-11), 50.61 (C-1, C-12).

IR  $\tilde{\nu}$  = 3519 (w), 3346 (w), 2866 (s), 2525 (w), 2108 (s), 1629 (w), 1444 (s), 1347 (m), 1300 (s), 1122 (s), 1037 (w), 942 (m), 852 (s), 733 (w), 646 (m), 556 (m).

CI-MS *m/z* 333 ([M + H]<sup>+</sup>, 11.48), 305 (69.47), 277 (3.06), 248 (3.20), 218 (3.69), 202 (4.74), 174 (5.17), 158 (9.53), 112 (10.63), 86 (100.00). (M = 333.18 berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> + H).

### 1,ω-Diamino-hexaethylenglycol, (12), H<sub>2</sub>NEG<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>



300 mg (0.903 mmol) des Hexaethylenglycoldiazids **11** wurden in 2 ml abs. MeOH gelöst und mit 30 mg Pd/C versehen. Die gerührte Reaktionsmischung wurde unter

Wasserstoffatmosphäre mit schwach erhöhtem Umgebungsdruck (Ballon) gesetzt und 10 h bei RT gerührt. Anschließend wurde filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, um ein farbloses Öl zu ergeben, was ohne weitere Reinigung eingesetzt werden konnte.

Ausbeute: 250.0 mg (0.900 mmol, M = 280.362 g/mol) 99 %.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[240]</sup>

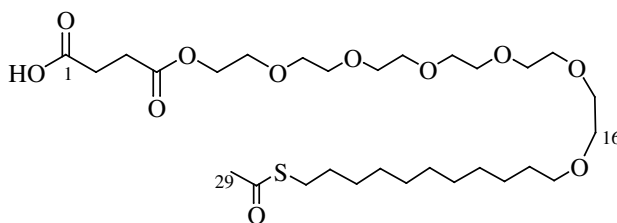
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 3.60-3.58 (m, 16H, 2 (H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10)), 3.45 (dd,  $J$  = 5.67 Hz,  $J$  = 5.40 Hz, 4H, 2 H-2, 2 H-11), 2.80 (dd,  $J$  = 5.68 Hz,  $J$  = 5.42 Hz, 4H, 2 H-1, 2 H-12), 1.50 (br, 4H, 2 NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 73.35 (C-2, C-11), 70.45 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10), 41.67 (C-1, C-12).

**IR**  $\tilde{\nu}$  = 3370 (m), 2866 (s), 1967 (w), 1734 (w), 1597 (s), 1456 (s), 1349 (s), 1299 (m), 1248 (m), 1108 (s), 951 (m), 864 (m), 523 (w).

**CI-MS**  $m/z$  281 ([M + H]<sup>+</sup>, 3.72), 251 (6.42), 238 (28.76), 220 (14.91), 192 (10.01), 176 (58.63), 163 (100.00), 148 (7.52), 133 (52.36). (M = 281.22 berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + H).

**Bernsteinsäuremono-( $\omega$ -(11-acetylthio-undecyl)-hexaethylenglycol)-ester (15),**  
AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>Osuc



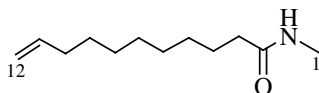
20.5  $\mu$ l (15.18 mg, 0.117 mmol) DIPEA wurden unter Rühren bei RT zu einer Lösung aus 100 mg (0.196 mmol) des Alkohols **5** und 25.5 mg (0.255 mmol) Bernsteinsäureanhydrid in 1.3 ml abs. Dichlormethan gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 4 h refluxiert und anschließend das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene rötliche Öl wurde in Diethylether aufgenommen, mit 1M HCl angesäuert und dreimal mit Et<sub>2</sub>O extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und ohne weitere Reinigung weiter eingesetzt.

Ausbeute: 115 mg (0.188 mmol, M = 610.799 g/mol) 97 %.

---

<b><math>^1\text{H-NMR}</math></b>	(500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , TMS): $\delta = 4.27$ (m, 2H, 2 H-5). 3.66 ( $m_c$ , 20H, 2 (H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16)), 3.58-3.57 (m, 2H, 2 H-6), 3.45 (t, $J = 6.85$ Hz, 2H, 2 H-17), 2.86 (t, $J = 7.30$ Hz, 2H, 2 H-27), 2.65 (m), 4H, 2 (H-2, H-3)), 2.32 (s, 3H, 3 H-29), 1.56 ( $m_c$ , 4H, 2 (H-18, H-26)), 1.26 (m (br), 14H, 2 (H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25)).
<b><math>^{13}\text{C-NMR}</math></b>	(125 MHz, $\text{CDCl}_3$ , TMS): $\delta = 196.21$ (C-28), 175.00 (C-1), 172.05 (C-4), 71.55 (C-17), 70.67-70.00 (C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16), 68.94 (C-6), 63.85 (C-5), 33.75 (C-2), 30.59 (C-29), 29.64 (C-3), 29.56-28.80 (C-18, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26, C-27), 26.05 (C-19).
<b>IR</b>	$\tilde{\nu} = 2929$ (s), 2854 (s), 1784 (m), 1736 (s), 1691 (s), 1454 (m), 1350 (m), 1249 (m), 1134 (s), 1100 (s), 1046 (m), 953 (m), 907 (w), 860 (w), 731 (w), 627 (m).
<b>CI-MS</b>	$m/z$ 611 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 1.16), 551 (1.33), 511 (10.88), 435 (1.33), 365 (1.22), 187 (3.81).
<b>ESI-MS</b>	$m/z$ 633.29 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (M = 633.32 berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{54}\text{O}_{11}\text{S} + \text{Na}$ ); $m/z$ 649.26 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (M = 649.30 berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{54}\text{O}_{11}\text{S} + \text{K}$ ).

---

**Undec-10-ensäuremethyamid (17)**,  $\text{MeNHC(O)C}_8\text{CH}=\text{CH}_2$ 

Gemäß der AAV 1 wurden 0.912 g (10.85 mmol) 10-Undecensäure in 15 ml abs. DMF gelöst und nach Zugabe von 4.13 ml (21.70 mmol) Tripropylamin und 1.48 ml (11.40 mmol) IBCF bei 0 °C 30 min gerührt. Zu dieser gelblichen Lösung wurden dann langsam 5.43 ml (10.85 mmol) einer 2 M Methylaminlösung in THF sowie weitere 2 ml (10.85 mmol)  $\text{NPr}_3$  zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und über Nacht gerührt, bevor die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurden. Das farblose Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (EE/CH 1:1  $\rightarrow$  2:1) und ergab einen farblosen, amorphen Feststoff.

Ausbeute: 2.113 g (10.708 mmol, M = 197.32 g/mol) 99 %.

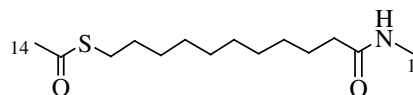
Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[241]</sup>

---

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS): 5.81 (ddt, $J = 6.66$ Hz, $J = 10.16$ Hz, $J = 16.88$ Hz, 1H, H-11), 4.96 (m, 2H, 2 H-12), 2.80 (d, $J = 4.84$ Hz, 3H, 3 H-1), (m → t, $J = 4.84$ Hz, 2H, 2 H-3), 2.02 (m, 2H, 2 H-10), 1.62 (m, 2H, H-4), 1.28 (m, 10H, 2 (H-5, H-6, H-7, H-8, H-9)).
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(125 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS): 173.87 (C-2), 139.14 (C-11), 114.10 (C-12), 36.67 (C-5), 33.74 (C-10), 33.27-28.84 (C-5, C-6, C-7, C-8, C-9), 26.22 (C-1), 25.75 (C-4).
<b>IR</b>	$\tilde{\nu} = 3299$ (s), 3078 (m), 2925 (s), 2850 (s), 1636 (s), 1560 (s), 1470 (m), 1438 (m), 1418 (m), 1234 (m), 1162 (m), 991 (m), 913 (s), 877 (w), 749 (m), 728 (m), 691 (m), 643 (m), 596 (m), 496 (w), 434 (w).
<b>ESI-MS</b>	$m/z$ 220.1390 [M + Na] <sup>+</sup> (M = 220.1672 berechnet für C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> NO + Na).

---

### 11-Acetylthio-undecansäuremethyamid, (18), AcSC<sub>10</sub>C(O)NHMe

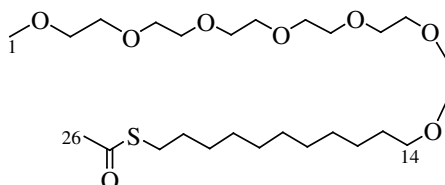


Entsprechend AAV 3 wurden 1.0 g (5.068 mmol) des Alkens **17** in 30 ml abs. THF gelöst und nach Zugabe von 0.901 ml (12.67 mmol) Thioessigsäure und 832.2 mg (0.507 mmol) AIBN wurde die UV-Beleuchtung gestartet. Es wurde unter Rühren bei RT für 2 h bestrahlt, bevor die Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt wurden. Das gelbliche Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (EE/CH 2:1 → 4:1) gereinigt und ergab einen farblosen, amorphen Feststoff.

Ausbeute: 1.193 g (4.363 mmol, M = 273.44 g/mol) 86 %.

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS): 5.82 (br, 1H, NH), 2.86 (m ≈ t, $J = 7.26$ Hz, 2H, 2 H-12), 2.81 (d, $J = 4.85$ Hz, 3H, 3 H-1), 2.33 (s, 3H, 3 H-14), 2.16 (m ≈ t, $J = 7.33$ Hz, 2H, 2 H-3), 1.58 (m <sub>c</sub> , 4H, 2 H-4, 2 H-11), 1.27 (m, 12H, 2 (H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10)).
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(125 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS): 196.18 (C-13), 173.81 (C-2), 36.71 (C-3), 30.64 (C-14), 29.45 (C-12), 29.32 - 28.74 (C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11), 26.25 (C-1), 25.75 (C-4).
<b>IR</b>	$\tilde{\nu} = 3308$ (s), 3088 (w), 2920 (s), 2849 (s), 1690 (s), 1643 (s), 1560 (s), 1459 (w), 1411 (m), 1237 (w), 1142 (m), 707 (w), 631 (m).
<b>ESI-MS</b>	$m/z$ 296.1302 [M + Na] <sup>+</sup> (M = 296.1655 berechnet für C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>2</sub> S + Na).

---

**1-Methyl- $\omega$ -(11-acetylthio-undecyl)-hexaethylenglycol, (19), AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>OMe**

2.918 g (6.50 mmol) des Alkens **20** wurden in 30 ml abs. THF gelöst und mit 1.16 ml (16.27 mmol) Thioessigsäure sowie 840 mg (5.207 mmol) AIBN versehen. Der Ansatz wurde bei RT gerührt und mit einer UV-Lampe für 3.5 h bestrahlt. Anschließend wurde das Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt und das gelbliche Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM 1:20  $\rightarrow$  1:18) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 3.245g (6.18 mmol, M = 524.75 g/mol) 95 %.

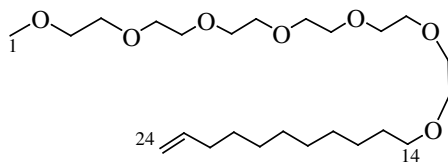
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 3.73-3.68 und 3.66-3.54 (m, 22H, 2 (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13)), 3.44 (t,  $J$  = 6.81 Hz, 2 H-14), 3.38 (s, 3H, 3 H-1), 2.85 (t,  $J$  = 7.36 Hz, 2 H-24), 2.31 (2, 3H, 3 H-26), 1.59-1.49 (m, 4H, 2 H-15, 2 H-23), 1.30-1.24 (m, 14H, 2 (H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 196.12 (C-25), 71.92-70.39 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13), 59.05 (C-1), 30.66 (C-26), 29.62-28.81 (C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21, C-22), 26.08 (C-24).

**IR**  $\tilde{\nu}$  = 2925 (s), 2855 (s), 1692 (s), 1461 (m), 1352 (m), 1299 (w), 1249 (w), 1116 (s), 952 (m), 884 (w), 627 (m).

**CI-MS**  $m/z$  511 ([M + H]<sup>+</sup>, 100.00), 496 (13.50), 435 (1.29), 361 (1.40), 325 (2.45), 317 (1.68), 283 (2.79), 229 (2.03), 187 (2.61), 177 (2.82) 133 (3.91).

**ESI-MS**  $m/z$  547.3267 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 547.3275 berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>52</sub>O<sub>8</sub>S + Na)

**1-O-Methyl- $\omega$ -(undec-10-enyl)-hexaethylenglycol (20)**, MeOEG<sub>6</sub>C<sub>9</sub>CH=CH<sub>2</sub>


2.087 g (7.042 mmol) Hexaethylenglycolmonomethylether wurden unter Schutzgas in 25 ml abs. DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt, bevor 295.8 mg (7.40 mmol) Natriumhydrid (60 %ige Dispersion in Mineralöl) zugegeben wurden. Es wurde 30 min gerührt und danach langsam eine Lösung aus 1.53 ml (6.56 mmol) 1-Bromundec-10-en in 3 ml abs. DMF zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und über Nacht gerührt. Zur Aufarbeitung wurden 10 ml *aqua dem.* zugegeben, die Phasen getrennt und die wäßrige Phase je dreimal mit 10 ml DCM und EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaCl<sub>(aq)</sub> gewaschen und über NaSO<sub>4</sub> getrocknet, um nach Entfernung der Lösungsmittel *in vacuo* ein farbloses, viskoses Öl zu ergeben. Das Rohprodukt konnte ohne weitere Reinigung weiter eingesetzt werden.

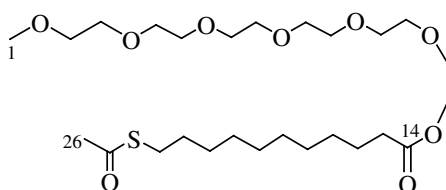
Ausbeute: 2.918 g (6.50 mmol, M = 448.63 g/mol) 92 %.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[185]</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 5.81 (ddt,  $J$  = 6.67 Hz,  $J$  = 10.16 Hz,  $J$  = 16.91 Hz, 1H, H-23), 4.91 (m, 2H, 2 H-24), 3.56 (m<sub>c</sub>, 24H, 2 (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13)), 3.44 (t,  $J$  = 6.81 Hz, 2H, 2 H-14), 3.82 (s, 3H, 3 H-1), 2.04 (m  $\approx$  q,  $J$  = 7.56 Hz, 2H, 2 H-22), 1.57 (m, 2H, 2 H-15), 1.28 (m, 12H, 2 (H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21)).

**IR**  $\tilde{\nu}$  = 3484 (br), 2924 (s), 2856 (s), 1679 (w), 1640 (w), 1461 (m), 1350 (m), 1298 (w), 1249 (w), 1199 (w), 1111 (s), 994 (w), 950 (w), 911 (w), 852 (w).

**ESI-MS**  $m/z$  471.3394 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 471.3292 berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>O<sub>7</sub> + Na).

**1-O-Methyl- $\omega$ -(11-acetylthio-undecansäure)-hexaethylenglycolester (21),**  
AcSC<sub>10</sub>C(O)OEG<sub>6</sub>OMe

430 mg (1.651 mmol) der Carbonsäure **2** sowie 538.3 (1.820 mmol) Hexaethylenglycolmonomethylether wurden in 3 ml abs. DCM gelöst und auf -20 °C gekühlt. In die gerührte Reaktionsmischung wurde dann eine Lösung aus 357.8 (1.734 mmol) DCC sowie 20.2 mg (0.165 mmol) DMAP in 3 ml DCM gegeben. Es wurde über Nacht gerührt, wobei der Ansatz langsam auf RT aufwärmte. Die Lösungsmittel wurden *in vacuo* entfernt und das viskose Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (MeOH/DCM 1:20) gereinigt. Es wurde ein gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 667.2 mg (1.238 mmol, M = 538.74 g/mol) 75 %.

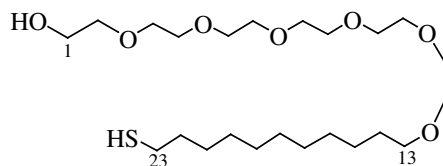
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 4.20 (m, 2H, 2 H-13), 3.69 (m, 2H, 2 H-12), 3.63 (m, 18H, 2 (H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11)), 3.53 (m, 2H, 2 H-2), 3.35 (s, 3H, 3 H-1), 2.86 (t,  $J$  = 7.30 Hz, 2H, 2 H-24), 2.33 (t,  $J$  = 7.41 Hz, 2H, H-15), 2.30 (s, 3H, 3 H-26), 1.61 (m, 2H, 2 H-16), 1.55 (m, 2H, H-23), 1.3 (m, 12H, 2 (H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 197.50 (C-25), 175.35 (C-14), 72.96 (C-15), 71.59-71.35 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12), 70.14 (C-2), 64.55 (C-13), 59.10 (C-1), 34.96 (C-16), 32.41-29.76 (C-17, C-18, C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24), 30.54 (C-26), 26.00.

**IR**  $\tilde{\nu}$  = 2924 (s), 2855 (s), 1735 (s), 1691 (s), 1456 (m), 1352 (m), 1298 (w), 1246 (m), 1111 (s), 1045 (w), 954 (m), 852 (m), 628 (m).

**MALDI**  $m/z$  561.5 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 561.7 berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>50</sub>O<sub>9</sub>S + Na).

**ESI-MS**  $m/z$  561.3085 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 561.3068 berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>50</sub>O<sub>9</sub>S + Na);  $m/z$  577.2813 [M + K]<sup>+</sup> (M = 577.2807 berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>50</sub>O<sub>9</sub>S + K).

**11-Mercaptoundecyl-hexaethylenglycol (22), HSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>OH**


460 mg (0.901 mmol) des Thioacetats **5** wurden in 5 ml abs. MeOH gelöst und die klare Lösung wurde mehrfach im schwachen Vakuum entgast und mit Stickstoff gespült. Anschließend wurden in die gerührte Reaktionsmischung 25 mg (0.463 mmol) Natriummethanolat gegeben. Nach einer Stunde wurde auf 0 °C gekühlt und 1.2 g Zinkpulver sowie 8 ml Eisessig wurden in den Kolben gegeben. Es wurde auf RT erwärmt und 30 min gerührt, bevor filtriert wurde. Es wurde mit Wasser und EE gespült und die Phasen des Filtrats getrennt. Die wäßrige Phase wurde je dreimal mit 5 ml EE und DCM extrahiert und anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen mit NaCl<sub>(aq)</sub> gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das farblose, ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (MeOH/EE 1:20 → 1:16) an Kieselgel gereinigt.

Ausbeute: 265 mg (5.65 mmol, M = 468.69 g/mol) 66 %.

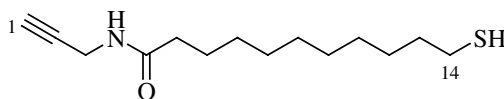
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 3.72 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-1), 3.67-3.58 (m, 20H, 2 (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12)), 3.44 (t,  $J$  = 6.82 Hz, 2H, 2 H-13), 2.88 (br, 1H, OH), 2.52 (m, 2H, 2 H-23), 2.10 (br, 1H, SH), 1.59 (m, 4H, 2 H-14, 2 H-22), 1.27 (m<sub>c</sub>, 14H, 2 (H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 72.60 (C-2), 71.53 (C-13), 70.61-70.03 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12), 61.72 (C-1), 34.03 (C-23), 29.62-28.63 (C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21, C-22), 26.07.

**IR**  $\tilde{\nu}$  = 3426 (br), 2925 (s), 2855 (s), 1641 (w), 1461 (w), 1350 (m), 1266 (m), 1103 (s), 950 (m), 735 (s).

**ESI-MS**  $m/z$  491.3025 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 491.3013 berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>48</sub>O<sub>7</sub>S + H).



**11-Mercaptoundecansäureprop-2-inylamid (24)**,  $\text{HSC}_{10}\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ 

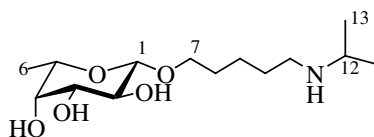
40 mg (0.134 mmol) des Thioacetat **54** wurden in 1.5 ml abs. MeOH gelöst und mit 18 mg (0.202 mmol) Natriummethanolat versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1.5 h bei RT gerührt, bevor 0.8 ml Eisessig sowie 120 mg Zinkpulver zugegeben wurden. Nach einer Stunde wurde filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Es wurde ein farbloser, amorpher Feststoff erhalten, der ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden konnte.

Ausbeute: 34.0 mg (0.130 mmol,  $M = 255.42$  g/mol) 99%. Die NMR-Daten zeigen bei RT zwei Amidrotamere in einem 1:0.3-Verhältnis. Es sind beide Signale angegeben.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta = 5.79$  (br, 1H,  $\text{NH}$ ), 4.06 (dd,  $J = 2.56$  Hz,  $J = 5.22$  Hz, 2H, 2 H-3), 2.68 und 2.52 (m, 2H, 2 H-5), 2.20 ( $m_c$ , 3H, 1 H-1, 2 H-5), 1.61 ( $m_c$ , 4H, 2 H-6, 2 H-13), 1.28 (m, 12H, 2 (H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12)).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta = 172.91$  (C-4), 79.56 (C-2), 71.51 (C-1), 36.42 (C-5), 29.68-28.34 (C-3, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13), 20.75 (C-14).

**CI-MS**  $m/z$  256 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 100.00), 222 (5.04), 194 (1.00), 166 (1.30).

**5-(N-Isopropylamino)-pentyl- $\beta$ -L-fucopyranosid (30)**,  $\text{FucC}_5\text{NH}^{iso}\text{Pr}$ 

143 mg (0.57 mmol) des Fucosid **28** wurden in 10 ml Methanol gelöst und nach Zugabe einer katalytischen Menge Natriummethanolat wurde der Ansatz bei RT für 3 h gerührt. Zur Neutralisierung wurde wenig Amberlite IR 120 zugegeben, kurz gerührt und dies anschließend abfiltriert und mehrfach mit Methanol gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* erhielt man ein öliges Rohprodukt, was in 10 ml Methanol aufgenommen wurde. Es wurden wenige Tropfen Aceton sowie eine Spatelspitze Pd/Aktivkohle zugefügt und unter Wasserstoffatmosphäre bei schwachem Überdruck (Ballon) und bei RT 3 h gerührt. Danach wurde die Suspension über Celite filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Man erhielt das Produkt als farblosen

Schaum.

Ausbeute: 152 mg (0.52 mmol,  $M = 291.38$  g/mol) 91 %.

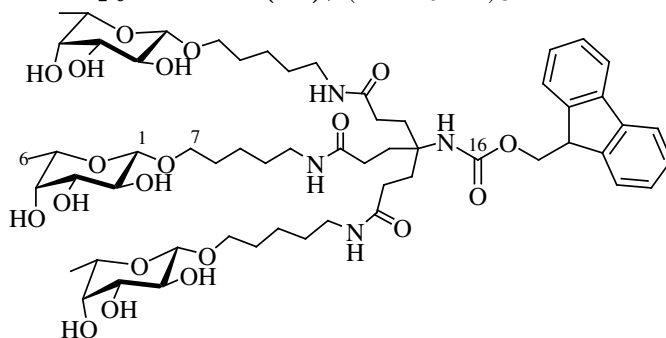
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta = 4.21$  (m, 1H, H-1), 3.89 (dt,  $J = 6.60$  Hz,  $J = 9.54$  Hz, 1H, H-7), 3.67-3.63 (m, 2H, H-3, H-5), 3.57 (dt,  $J = 6.61$  Hz,  $J = 9.53$  Hz, 1H, H-7'), 3.50-3.49 (m, 2H, H-2, H-4), 2.88 (sep,  $J = 6.23$  Hz, 1H, H-12), 2.64 (m, 2H, 2 H-11), 1.69 (q,  $J = 6.79$  Hz, 2H, 2 H-8), 1.61-1.55 (m, 2H, 2 H-10), 1.50-1.44 (m, 2H, 2 H-9), 1.30 (d,  $J = 6.60$  Hz, 3H, 3 H-6), 1.13 (d,  $J = 6.42$  Hz, 6H, 6 H-13).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta = 104.81$  (C-1), 75.17 (C-2), 73.01 (C-4), 72.31 (C-3), 71.82 (C-5), 70.51 (C-7), 49.89 (C-12), 47.89 (C-11), 30.58 (C-10), 30.11 (C-8), 24.90 (C-9), 22.18 (2 C-13), 16.77 (C-6).

**CI-MS**  $m/z$  292 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 100.00), 248 (1.50), 174 (4.46), 146 (24.72), ( $M = 291.20$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NO}_5$ ).

**ESI-MS**  $m/z$  292.1809  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ( $M = 292.2118$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NO}_5 + \text{H}$ );  $m/z$  314.1635  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $M = 314.1938$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NO}_5 + \text{Na}$ ).

**3-Cascade:9-fluorenyl-methoxycarbonyl-aminomethan[3-1,1,1]:ethyliden-5-amidopentyl- $\beta$ -L-fucopyranosid (38),  $(\text{FucC}_5\text{NH})_3\text{NHFmoc}$**



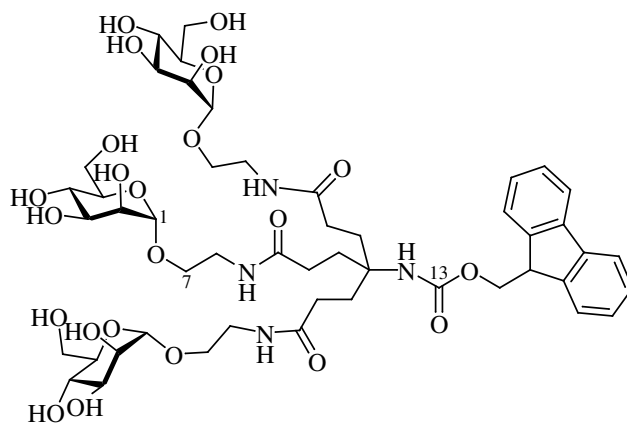
Die Synthese wurde in Zusammenarbeit mit N. Röckendorf durchgeführt.<sup>[176,198]</sup>

105 mg (0.42 mmol) des Fucosids **29** wurden mit 66 mg (0.14 mmol) des Trisäure **37** und 171 mg (0.45 mmol) HATU in 2 ml abs. DMF gelöst. Die Lösung wurde auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt, bevor 92  $\mu\text{l}$  (0.54 mmol) DIPEA langsam zugegeben wurden. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und 6 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand mit Methanol aufgenommen und durch GPC (Sephadex LH-20) mit Methanol als Eluens gereinigt. Es wurde ein farbloser Schaum erhalten.

Ausbeute: (55  $\mu\text{mol}$ ,  $M = 1163.35$  g/mol) 39 %.

- <sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 7.82 (d (br),  $J$  = 7.52 Hz, Ar-H), 7.69 (m, 2H, Ar-H), 7.39 (m, 2H, Ar-H), 7.31 (m, 2H, Ar-H), 4.32 (m, 2H, 2 H-17), 4.20 (m, 1H, H-18), 4.16 (m, 3H, 3 H-1), 3.84 (m, 3H, 3 H-7), 3.58 (m, 6H, 3 H-4, 3 H-5), 3.51 (m<sub>c</sub>, 3H, 3 H-7'), 3.45 (m, 6H, 3 H-2, 3 H-3), 3.15 (m, 6H, 6 H-11), 2.16 (m, 6H, 6 H-13), 1.92 (m, 6H, 6 H-14), 1.62 (m, 6H, 6 H-8), 1.51 (m, 6H, 6 H-9), 1.41 (m, 6H, 6 H-10), 1.25 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 9H, 9 H-6).
- <sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 175.69, 175.58 (C-12), 145.44, 142.61, 128.78, 128.19, 126.31, 120.95 (Ar-C), 104.79 (C-1), 75.16 (C-2), 73.04 (C-4), 72.33, (C-3), 71.84 (C-5), 70.64 (C-7), 67.11 (C-17), 57.89 (C-15), 40.42 (C-11), 30.39, 30.08 (C-13, C-14), 30.71 (C-8), (C-9), 24.44 (C-10), 16.81 (C-6).
- MALDI**  $m/z$  1186 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 1185.60 berechnet für C<sub>58</sub>H<sub>90</sub>N<sub>4</sub>O<sub>20</sub> + Na).
- ESI-MS**  $m/z$  1185.5470 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 1185.6041 berechnet für C<sub>58</sub>H<sub>90</sub>N<sub>4</sub>O<sub>20</sub> + Na).

**3-Cascade:9-fluorenyl-methoxycarbonyl-aminomethan[3-1,1,1]:ethyliden-2-amidoethyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (39), (ManC<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHFmoc**



Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt: 100 mg (0.45 mmol) Mannosid **34** in 1.5 ml abs. DMF, 0 °C, Zugabe von 58.1  $\mu$ l (0.448 mmol) Chlorameisensäureisobutylester und 48.7  $\mu$ l (0.256 mmol) Tripropylamin und anschließend 30 min rühren bei 0 °C. Danach wurden 60.05 mg (0.128 mmol) der freien Säure **37**, in 1 ml trockenem DMF gelöst, langsam dem Reaktionsgemisch zugespritzt. Der Ansatz wurde auf RT erwärmt und 4 h gerührt bevor die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurden. Der Rückstand wurde in 15 % Acetonitril/Wasser aufgenommen und durch präparative HPLC gereinigt (A = Wasser, B = Acetonitril, 20 % B  $\rightarrow$  50 % B, 70 min, 10 ml/min,

$R_t = 32$  min). Man erhielt einen farblosen Schaum.

Ausbeute: 90 mg (82  $\mu$ mol,  $M = 1085,11$  g/mol) 54 %.

Die Reinheit wurde durch analytische HPLC belegt:  $R_t = 18.91$  min [250/4 LiChrosorp 7 $\mu$ m C8, A = Wasser, B = Acetonitril, 0 % B  $\rightarrow$  0 % B 10 min, 0 % B  $\rightarrow$  75 % B, 50 min, 1 ml/min].

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 7.79$  (m, 2H, Ar-H), 7.68 (m, 2H, Ar-H), 7.37 (m, 2H, Ar-H), 7.31 (m, 2H, Ar-H), 4.76 (d,  $J = 1.4$  Hz, 3H, 3 H-1), 4.34 (d (br), 2H, 2 H-14), 4.19 (t (br), 1H, H-15), 3.84 (dd,  $J = 2.2$ ,  $J = 11.7$  Hz, 3H, 3 H-6), 3.84 (dd,  $J = 1.8$ ,  $J = 3.5$  Hz, 3H, 3 H-2), 3.76 (m, 3H, 3 H-7), 3.69 ( $m_c$ , 6H, 3 H-3, 3 H-6'), 3.58 ( $m \approx t$ , 3H, 3 H-4), 3.55 ( $m_c$ , 6H, 3 H-5, 3 H-7'), 3.37 ( $m_c$ , 6H, 6 H-8), 2.15 ( $m_c$ , 6H, 6 H-10), 1.95 ( $m_c$ , 6H, 6 H-11).

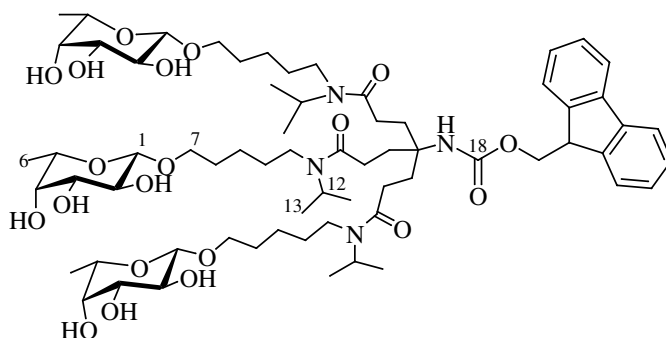
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125.47 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 175.99$  (C-9), 156.66 (C-13), 145.43, 142.61, 128.76, 128.19, 126.31, 120.92 (Ar-C), 101.64 (C-1), 74.83 (C-5), 72.51 (C-3), 72.05 (C-2), 68.67 (C-4), 67.22 (C-7), 67.08 (C-14), 62.98 (C-6), 57.88 (C-12), 40.39 (C-8), 31.95 (C-10), 31.26 (C-11).

**MALDI**  $m/z$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $M = 1084.46$  berechnet für  $\text{C}_{49}\text{H}_{72}\text{N}_4\text{O}_{23}$ ).

**ESI-MS**  $m/z$  1107.3908  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $M = 1107.4480$  berechnet für  $\text{C}_{49}\text{H}_{72}\text{N}_4\text{O}_{23} + \text{Na}$ ).

**Drehwert**  $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +54.5^\circ$  ( $c = 1.33$ , MeOH)

### 3-Cascade:9-fluorenylmethoxycarbonyl-aminomethan[3-1,1,1]:ethyliden-5-N-isopropyl-amidopentyl- $\beta$ -L-fucopyranosid (**40**), $(\text{FucC}_5\text{N}^{iso}\text{Pr})_3\text{NHFMoc}$



123 mg (0.42 mmol) Fucosid **30** wurden mit 66 mg (0.14 mmol) der Trisäure **37** und 171 mg (0.45 mmol) HATU gemischt und in 2 ml abs. DMF gelöst. Die Reaktionsmischung wurde auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt und 92  $\mu$ l (0.54 mmol) DIPEA wurden zugegeben. Anschließend wurde die klare Lösung langsam auf RT erwärmt und 6 h gerührt, bevor das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Der Rückstand wurde in Methanol

aufgenommen und durch GPC (Sephadex LH-20) mit Methanol als Eluens gereinigt. Es wurde ein farbloser Schaum erhalten.

Ausbeute: 120 mg (93  $\mu$ mol,  $M = 1289.59$  g/mol) 66 %.

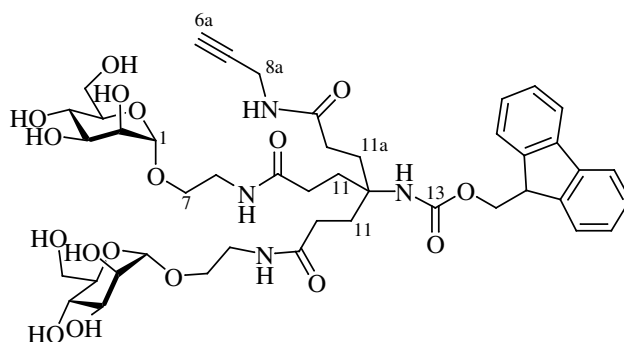
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 7.81$  (m, 2H, Ar-H), 7.69 (m, 2H, Ar-H), 7.39 (m, 2H, Ar-H), 7.32 (m, 2H, Ar-H), 4.52 ( $m_c$ , 1H, H-12), 4.31 ( $m_c$ , 2H, 2 H-19), 4.21 ( $m_c$ , 3H, 2 H-12, H-20), 4.15 (m, 3H, 3 H-1), 3.79 ( $m_c$ , 3H, 3 H-7), 3.58 (m, 6H, 3 H-4, 3 H-5), 3.51 ( $m_c$ , 3H, 3 H-7), 3.44 ( $m_c$ , 6H, 3 H-2, 3 H-3), 3.16 ( $m_c$ , 6H, 6 H-11), 2.36 (m, 6H, 6 H-15), 1.97 (m, 6H, 6 H-16), 1.63 (m, 6H, 6 H-8), 1.56 (m, 6H, 6 H-9), 1.36 (m, 6H, 6 H-10), 1.25 (m, 9H, 9 H-6), 1.15 (m, 18H, 18 H-13).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125.47 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 174.79$ , 174.21 (C-14), 156.96 (C-18), 145.33, 142.64, 128.88, 128.26, 126.26, 121.06 (Ar-C), 104.84, 104.81 (C-1), 75.19 (C-2), 73.06, 73.02 (C-4), 72.33, (C-3), 71.84 (C-5), 70.55, 70.35 (C-7), 67.32 (C-20), 58.11 (C-17), 50.01, 49.85 (C-12), 47.83, 45.04, 42.32 (C-11), 32.14, 31.48, 30.51 (C-15, C-16), 30.39, 30.29, 24.84, 24.62 ( $\text{CH}_2$ ), 21.53, 20.65, 16.82, 16.79 ( $\text{CH}_3$ ).

**MALDI**  $m/z$  1313  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $M = 1288.76$  berechnet für  $\text{C}_{67}\text{H}_{108}\text{N}_4\text{O}_{20}$ ).

**ESI-MS**  $m/z$  1311.6818  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $M = 1311.7449$  berechnet für  $\text{C}_{67}\text{H}_{108}\text{N}_4\text{O}_{20} + \text{Na}$ ).

### 3-Cascade:9-fluorenyl-methoxycarbonyl-aminomethan[2-1,1]:ethyliden-2-amidoethyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid[1-1]:ethyliden-amidoprop-2-in (41)



50 mg (0.07 mmol) der Trissäure **37**, 133.7 mg (0.352 mmol) HATU und 47.6 mg (0.213 mmol) Aminoethylmannosid **34** wurden in 3 ml abs. DMF gelöst und auf  $-20^\circ\text{C}$  gekühlt. Zu der klaren, farblosen Lösung wurden unter Rühren 48  $\mu\text{l}$  (0.277 mmol) DIPEA langsam zugegeben, worauf sich diese sofort intensiv gelb färbte. Die Reaktionsmischung wurde über 30 min auf RT erwärmt und noch 2.5 h gerührt. Danach

wurde auf 0 °C gekühlt, eine Lösung von 7.3  $\mu\text{l}$  (0.107 mmol) Propargylamin und 24  $\mu\text{l}$  (0.139 mmol) DIPEA in 1 ml abs. DMF zugetropft und der Ansatz wieder auf RT erwärmt und für 5.5 h gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt und der Rückstand einer Reinigungssequenz aus GPC (Sephadex LH-20, Methanol) und anschließender präparativer HPLC (A = Wasser, B = Acetonitril, 15 % B  $\rightarrow$  70 % B, 60 min, 10 ml/min,  $R_t = 51.07$  min) unterzogen. Es wurde nach Lyophilisation ein farbloser Schaum erhalten.

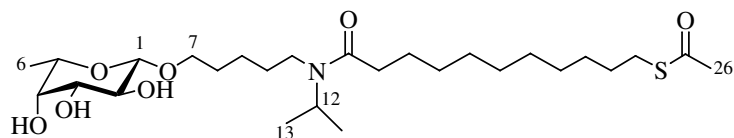
Ausbeute: 34.2 mg (0.037 mmol,  $M = 916.96$  g/mol) 35 %.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 7.83$  (d,  $J = 7.52$  Hz, 2H, Ar-H), 7.72 (m  $\approx$  d,  $J = 7.04$  Hz, 2H, Ar-H), 7.43 (t,  $J = 7.40$  Hz, 2H, Ar-H), 7.36 (t,  $J = 7.46$  Hz, 2H, Ar-H); 4.81 (m  $\approx$  d,  $J = 2.98$  Hz, 2H, 2 H-1), 4.40 (m, 2H, 2 H-14), 2.25 (m, 1H, H-15), 3.98 (d,  $J = 2.55$  Hz, 2H, 2 H-8a), 3.89 (dd,  $J = 2.17$  Hz,  $J = 11.69$  Hz, 2H, 2 H-6), 3.86 (m, 2H, 2 H-2), 3.79 (m, 2H, 2 H-7), 3.74 (m, 4H, 2 H-3, 2 H-6'), 3.64 (t,  $J = 9.45$ , 2H, 2 H-4), 3.58 (m, 4H, 2 H-5, 2 H-7'), 3.45 (m, 2H, 2 H-8), 3.40 (m, 2H, 2 H-8'), 2.63 (m, 1H, H-6a), 2.21 (br, 6H, 4 H-10, 2 H-10a), 1.98 (br, 6H, 4 H-11, 2 H-11a).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 175.97$  (C-9), 175.40 (C-9a) 156.65 (C-13), 145.43, 142.60, 128.74, 128.17, 126.31, 120.89 (Ar-C), 101.66 (C-1), 80.66 (C-7a), 74.82 (C-5), 72.52 (C-3), 72.06 (C-2), 71.55 (C-6a), 68.69 (C-4), 67.25 (C-7), 67.00 (C-14), 62.98 (C-6), 57.88 (C-12), 40.39 (C-8), 31.88 (C-10), 31.60, 31.22 (C-11), 29.52 (C-8a).

**ESI-MS**  $m/z$  916.3617 [M] ( $M = 916.3948$  berechnet für  $\text{C}_{44}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_{17}$ );  $m/z$  939.3798 [M + Na] $^+$  ( $M = 939.3846$  berechnet für  $\text{C}_{44}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_{17} + \text{Na}$ ).

#### 5-*N*-(Isopropyl)-pentylcarbamoyl-(11-acetylthio-undecyl)- $\beta$ -L-fucopyranosid (44), $\text{FucC}_5\text{N}^{\text{iso}}\text{PrC}_{11}\text{SAc}$



Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt mit: 51.8 mg (0.200 mmol) Carbonsäure **2**, 32.8 mg (0.240 mmol) IBCF und 76.1  $\mu\text{l}$  (0.400 mmol) Tripropylamin in 1.5 ml abs. DMF. Nach 20 min bei 0 °C wurde eine Lösung 59.8 mg (0.240 mmol) des Isopropylamins **30**, und 38.01  $\mu\text{l}$  (0.200 mmol)  $\text{NPr}_3$  in 0.5 ml abs. DMF langsam zugegeben, die Reaktionsmischung wurde über 30 min auf RT erwärmt und für weitere

6 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das erhaltende farblose Rohprodukt mittels Kieselgelchromatographie (MeOH/DCM 1:20) gereinigt.

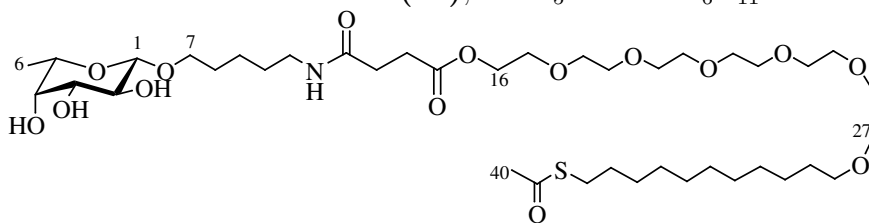
Ausbeute: 59 mg (0.120 mmol, M = 491.68 g/mol) 60 %.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 4.21 (m<sub>c</sub>, 1H, H-1), 4.04 (m, 1H, H-12), 3.90 (m<sub>c</sub>, 1H, H-7), 3.71 (br, 1H, H-4), 3.64-3.53 (m, 3H, H-2, H-3, H-5), 3.51 (m<sub>c</sub>, 1H, H-7'), 3.12 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-11), 2.86 (t,  $J$  = 7.33 Hz, 2H, 2 H-25), 2.32 (m, 4H, 3 H-27, H-15), 2.26 (m<sub>c</sub>, 1H, H-15'), 1.64 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-8), 1.60-1.52 (m<sub>c</sub>, 6H, 2 (H-10, H-16, H-24)), 1.375 (m, 2H, 2 H-9), 1.33 (d,  $J$  = 6.41 Hz, 3 H-6), 1.27 (m<sub>c</sub>, 14H, 2 (H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23)), 1.18 (d,  $J$  = 6.60 Hz, 4H, 4 H-13), 1.12 (d,  $J$  = 6.62 Hz, 4 H, 4 H-13).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 196.02 (C-26), 172.91 (C-14), 172.56 (C-14'), 103.01 (C-1), 74.00 (C-3), 71.49 (C-4), 71.39 (C-2), 70.45 (C-5), 69.64 (C-7), 48.25 (C-12), 40.92 (C-11), 33.82 (C-15), 31.27 (C-16), 30.58 (C-26), 29.44 (C-10), 29.40-29.10 (C-17, C-18, C-19, C-20, C-21, C-22, C-23), 28.91 (C-8), 28.73, 25.52, 23.92, 21.32 (C-13, C-13'), 16.32 (C-6).

**MALDI**  $m/z$  556 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 556.3 berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>7</sub>S + Na);  $m/z$  572 [M + K]<sup>+</sup> (M = 572.1 berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>7</sub>S + K).

**$\omega$ -(11-Acetylthio-undecyl-hexaethylenglycolyl)-N-(5- $\beta$ -L-fucopyranosyloxy-pentyl)-bernsteinsäureimidoester (45), FucC<sub>5</sub>NHsucEG<sub>6</sub>C<sub>11</sub>SAc**



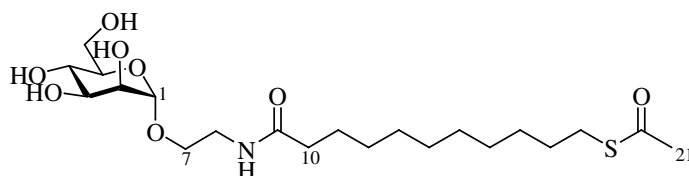
Durchführung gemäß AAV 1: 370 mg (0.605 mmol) Carbonsäure **15**, 3 ml abs. DMF, 94.3 mg (0.727 mmol) Chlorameisensäureisobutylester und 230.5  $\mu$ l (1.21 mmol) Tripropylamin. Nach 15 min rühren wurde eine Lösung aus 181.2 mg (0.727 mmol) des Fucosids **29** und 115  $\mu$ l (0.606 mmol) Tripropylamin in 0.5 ml abs. DMF langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf RT erwärmt und anschließend 6 h bei RT gerührt, bevor das Lösungsmittel im Unterdruck entfernt wurde. Das hellgelbe, hochviskose Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt: (MeOH/DCM 1:20 – 1:10).

Ausbeute: 280 mg (0.333 mmol, M = 841.49 g/mol) 55 %.

- <sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 4.23 (m, 2H, 2 H-16), 4.18 (m<sub>c</sub>, 1H, H-1), 3.86 (dt,  $J$  = 6.05,  $J$  = 9.54 Hz, 1H, H-7), 3.71 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-17), 3.65 (m<sub>c</sub>, 20H, H-3, H-5, 2 (H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26)), 3.60-3.57 (m, 4H, H-2, H-4, 2 H-27), 3.53 (dt,  $J$  = 6.40,  $J$  = 9.54 Hz, 1H, H-7'), 3.44 (m, 2H, 2 H-28), 3.18 (m, 2H, 2 H-11), 2.89 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-38), 2.64 (t,  $J$  = 6.97 Hz, 2H, 2 H-13), 2.49 (t,  $J$  = 6.96 Hz, 2H, 2 H-14), 2.32 (s, 3H, 3 H-40), 1.65 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-8), 1.59-1.50 (m, 6H, 2 (H-10, H-29, H-37)), 1.46-1.42 (m, 2H, 2H-9), 1.35-1.31 (m<sub>c</sub>, 14H, 2 (H-30, H-31, H-32, H-33, H-34, H-35, H-36)), 1.27 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, 3 H-6).
- <sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 197.61 (C-39), 174.24 (C-12), 174.11 (C-15), 104.82 (C-1), 75.19 (C-2), 73.05 (C-3), 72.37 (C-4), 72.35 (C-28), 71.86 (C-5), 71.57 (C-18, C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26), 71.17 (C-27), 70.49 (C-7), 70.08 (C-17), 64.85 (C-16), 40.37 (C-11), 31.49 (C-14), 30.75 (C-40), 30.56-30.40 (C-13, C-30, C-31, C-32, C-33, C-34, C-35, C-36, C-37, C-38), 30.12 (C-29), 29.78 (C-10), 27.23 (C-8), 24.42 (C-9), 16.78 (C-6).
- MALDI**  $m/z$  864 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 864.5 berechnet für C<sub>40</sub>H<sub>75</sub>NO<sub>15</sub>S + Na).
- ESI-MS**  $m/z$  864.4247 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 664.4750 berechnet für C<sub>40</sub>H<sub>75</sub>NO<sub>15</sub>S + Na).

## 2-Ethylcarbamoyl-(11-Acetylthio-undecyl)- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**46**),

ManC<sub>2</sub>NHC<sub>11</sub>SAc



Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt mit: 77 mg (0.296 mmol) der Carbonsäure **2**, 1.5 ml abs. DMF, 46  $\mu$ l (0.355 mmol) Chlorameisensäureisobutylester und 112  $\mu$ l (0.6 mmol) Tripropylamin. Nach 30 minütigem rühren wurden 79.2 mg (0.355 mmol) des Amin **34** in 0.5 ml DMF und 56  $\mu$ l (0.3 mmol) Tripropylamine zu der klaren Reaktionsmischung gegeben, welche anschließend auf RT erwärmt und über Nacht gerührt wurde. Danach wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in 15 % MeCN/Wasser aufgenommen und durch preparative HPLC-Chromatographie (A = Wasser, B = Acetonitril, 30 % B  $\rightarrow$  70 % B, 60 min, 10 ml/min, Rt = 35 min)



gereinigt. Nach Lyophilisation wurde ein farbloser Schaum erhalten.

Ausbeute: 89.4 mg (192 mmol,  $M = 465.60$  g/mol) 65 %.

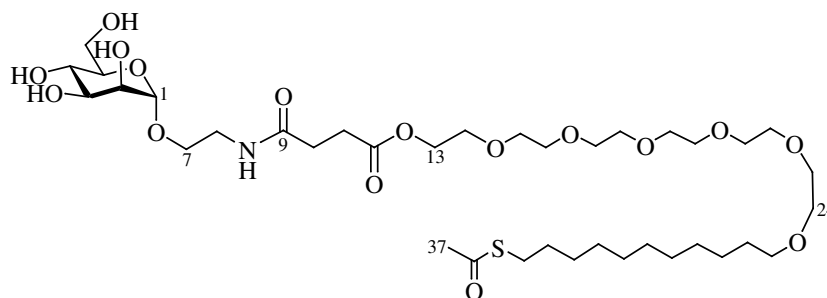
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta = 4.75$  (d (br), 1H, H-1), 3.82 (dd,  $J = 2.2$ ,  $J = 9.53$  Hz, 1H, H-6), 3.80 (dd,  $J = 1.65$  Hz,  $J = 3.48$  Hz, 1H, H-2), 3.74 ( $m_c$ , 1H, H-7), 3.67 ( $m_c$ , 2H, H-3, H-6'), 3.59 ( $m \approx t$ ,  $J = 9.54$  Hz, 1H, H-4), 3.52 ( $m_c$ , 2H, H-5, H-7'), 3.41-3.34 (m, 2H, 2 H-8), 2.85 (t,  $J = 7.16$  Hz, 2H, 2 H-19), 2.30 (s, 3H, 3 H-21), 2.19 (t,  $J = 2.52$  Hz, 2H, 2 H-10), 1.59 ( $m_c$ , 2H, 2 H-18), 1.53 ( $m_c$ , 2H, 2 H-11), 1.30 (br, 12H, 2 (H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17)).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta = 197.67$  (C-20), 176.58 (C-9), 101.72 (C-1), 74.80 (C-5), 72.56 (C-3), 72.11 (C-2), 68.80 (C-4), 67.30 (C-7), 62.93 (C-6), 40.27 (C-8), 37.10 (C-10), 30.80 (C-21), 30.54-29.83 (C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-18), 27.07 (C-19).

**MALDI**  $m/z$  488  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $M = 488.2$  berechnet für  $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{NO}_8\text{S} + \text{Na}$ ).

**ESI-MS**  $m/z$  488.1959  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $M = 488.2284$  berechnet für  $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{NO}_8\text{S} + \text{Na}$ ).

$\omega$ -(11-Acetylthio-undecyl)-hexaethylenglycolyl-*N*-(2- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-oxyethyl)-bernsteinsäureimidoester (**47**),  $\text{ManC}_2\text{NHsucEG}_6\text{C}_{11}\text{SAC}$



Durchführung gemäß AAV 1 mit: 226 mg (0.370 mmol) der Carbonsäure **15**, 1.5 ml DMF, 57.6  $\mu\text{l}$  (0.444 mmol) Chlorameisensäureisobutylester und 140  $\mu\text{l}$  (0.740 mmol) Tripropylamin. Nach 30 min wurde eine Lösung von 99.1 mg (0.444 mmol) des Mannosids **34** und 70  $\mu\text{l}$  (0.370 mmol) Tripropylamin in 1 ml abs. DMF langsam zugegeben. Nach 3 h wurde der Ansatz beendet, indem das Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt wurde. Das gelbe, hochviskose Rohprodukt durch Säulenchromatographie (MeOH/DCM 1:20 – 1:10) gereinigt.

Ausbeute: 304 mg (0.373 mmol,  $M = 815.43$  g/mol) 94 %.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 4.77 (br, 1H, H-1), 4.22 (m, 2H, 2 H-13), 3.8 (dd,  $J$  = 2.40,  $J$  = 11.74 Hz, 1H, H-6), 3.81 (m<sub>c</sub>, 1H, H-2), 3.75 (m, 1H, H-7), 3.71-3.69 (m, 4H, H-3, H-6', 2 H-14), 3.64 (br, 20H, 2 (H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24)), 3.58 (m<sub>c</sub>, 2H, H-4, H-5), 3.53 (m<sub>c</sub>, 1H, H-7'), 3.45 (m  $\approx$  t,  $J$  = 7.78 Hz, 2H, 2 H-25), 3.42 (m<sub>c</sub>, 1H, H-8), 3.37 (m<sub>c</sub>, 1H, H-8'), 2.86 (t,  $J$  = 7.34 Hz, 2H, 2 H-35), 2.64 (m, 2H, 2 H-10), 2.53 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-11), 2.30 (s, 3H, 3 H-37), 1.59-1.53 (m, 4H, 2 (H-26, H-34)), 1.26 (br, 14H, 2 (H-27, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32, H-33)).

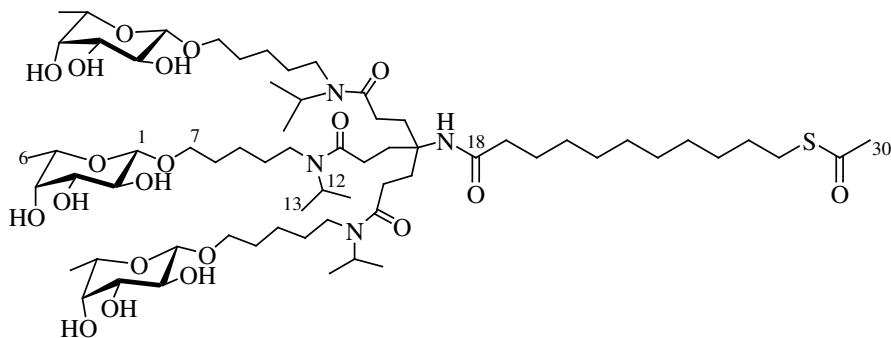
**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 197.43 (C-36), 174.40 (C-9), 174.18 (C-12), 101.61 (C-1), 74.68 (C-5), 73.61, 72.49 (C-3), 72.30 (C-25), 71.99 (C-2), 71.51-70.10 (C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24), 68.60 (C-4), 67.20 (C-7), 64.82 (C-13), 62.89 (C-6), 62.17, 40.30 (C-8), 31.29 (C-10), 30.68 (C-11), 30.63-29.81 (C-26, C-27, C-28, C-29, C-30, C-31, C-32, C-33, C-34), 29.73 (C-35), 27.15.

**MALDI**  $m/z$  838 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 838.4 berechnet für C<sub>37</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>16</sub>S + Na).

**ESI-MS**  $m/z$  838.3797 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 838.4229 berechnet für C<sub>37</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>16</sub>S + Na).

**Drehwert**  $[\alpha]_D^{23} = +8.8^\circ$  ( $c = 1.4$ , MeOH)

**3-Cascade:*N*-(1-oxo-11-acetylthio-undecyl)-aminomethan[3-1,1,1]:ethyliden-5-*N*-isopropyl-amidopentyl- $\beta$ -L-fucopyranosid (48), (FucC<sub>5</sub>N<sup>iso</sup>Pr)<sub>3</sub>C<sub>11</sub>Sac**



Zur Entschützung wurden 120 mg (93  $\mu$ mol) Fmoc-geschütztes Fucosid **40** in 4 ml trockenem DMF gelöst, mit 1 ml Morpholin versetzt und 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Unterdruck entfernt und der Rückstand wurde mit 30 mg (0.12 mmol) der Undecansäure **2** und 46 mg (0.12 mmol) HATU gemischt. Die ungelösten Feststoffe wurden 1 h *in vacuo* getrocknet und anschließend unter Argonatmosphäre in 5 ml abs. DMF gelöst. 25  $\mu$ l (0.15 mmol) DIPEA wurden bei RT zugegeben

und die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt. Nach beendiger Reaktion wurde das Lösungsmittel im Unterdruck verdampft und der farblose Rückstand in MeOH aufgenommen und durch GPC (Sephadex LH-20) mit Methanol als Eluens gereinigt. Man erhielt nach Entfernen des Lösungsmittels einen farblosen Schaum.

Ausbeute: 76 mg (58  $\mu$ mol,  $M = 1309.73$  g/mol) 62 %.

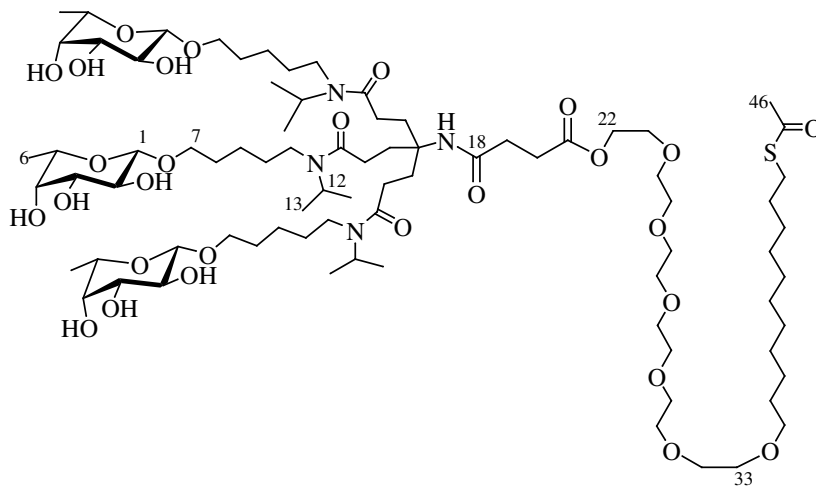
Die Reinheit wurde durch analytische HPLC belegt:  $R_t = 24.75$  min [250/4 LiChrosorp 7 $\mu$ m C8, A = Wasser, B = Acetonitril, 20 % B  $\rightarrow$  90 % B, 60 min, 1 ml/min]. Die NMR-Daten zeigten eindeutig zwei vorhandene Rotamere in einem 1:0.9-Verhältnis, das eindeutig durch die Integration der doppelten Signalsätze der beiden Isopropylgruppen sowie der benachbarten Methylengruppen zugeordnet werden konnte. Hier sind die chemischen Verschiebungen beider Isomere aufgeführt, da auch durch Messungen bei erhöhter Temperatur in diesem Lösungsmittel kein Koaleszenzpunkt gefunden werden konnte.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, 300 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 4.53$  (sept (br), 3H, 3 H-12), 4.19 ( $m_c$ , 3H, 3 H-1), 4.06 (sept (br), 2H, 3 H-12), 3.91 ( $m_c$ , 3H, 3 H-7), 3.72 ( $m_c$ , 3H, 3 H-4), 3.59 ( $m_c$ , 9H, 3 (H-2,H-3, H-5)), 3.49 ( $m_c$ , 3H, 3 H-7'), 3.13 (m (br), H-11), 2.83 (t (br), 2H, H-28), 2.35 ( $m_c$ , 6 H,  $\text{CH}_2$ ), 2.31 (s (br), 3H, 3 H-30), 2.15 ( $m_c$ , 8H,  $\text{CH}_2$ ), 1.60 ( $m_c$ , 16H,  $\text{CH}_2$ , H-27), 1.28 ( $m_c$ , 13H,  $\text{CH}_2$ , 9 H-6), 1.18 (d,  $J = 6.42$  Hz, 9H, 9 H-13), 1.12 (d,  $J = 6.79$  Hz, 9H, 9 H-13).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125.47 MHz, 300 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 196.21$  (C-29), 173.61 (C-14), 173.44 (C-14), 172.97 (C-18), 103.34 (C-1), 103.17 (C-1), 74.43, 74.11, 71.77, 71.71, 71.45, 70.62 (C-2, C-3, C-4, C-5), 69.03 (C-7), 57.62 (C-17), 48.66, 46.18 (C-12), 43.88, 41.15, 37.72, 31.10, 30.78 (C-30), 29.63-28.95, 26.18, 26.03, 24.16, 23.52 ( $\text{CH}_2$ ), 21.50, 20.65 (C-13), 16.56 (C-6).

**MALDI**  $m/z$  1332  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $M = 1331.82$  berechnet für  $\text{C}_{65}\text{H}_{120}\text{N}_4\text{O}_{20}\text{S} + \text{Na}$ ).

**3-Cascade:** *N*-(1,4-dioxobutyl-hexaethylglycol-11-acetylthio-undecyl)-aminomethan[3-1,1,1]:ethyliden-5-*N*-isopropyl-amidopentyl- $\beta$ -L-fucopyranosid (**49**), (FucC<sub>5</sub>N<sup>iso</sup>Pr)<sub>3</sub>sucEG<sub>6</sub>C<sub>11</sub>SAc



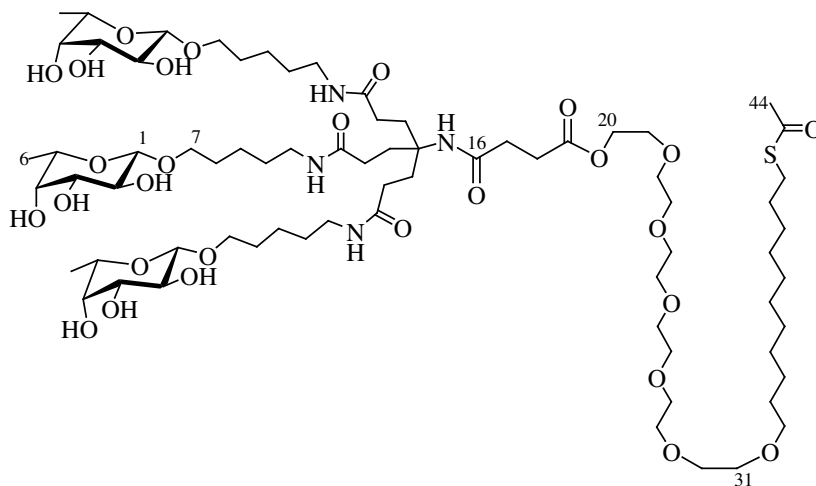
Zunächst wurden zur Entschützung 60 mg (0.046 mmol) des Cluster **40** in 1.5 ml abs. DMF unter Argonatmosphäre gelöst, 0.3 ml Morpholin wurden zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurden die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und 50 mg des erhaltenen farblosen Feststoffs als Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung zur folgenden Kupplung eingesetzt. Diese wurde gemäß AAV 1 durchgeführt: 25.8 mg (0.042 mmol) Carbonsäure **15** in 0.5 ml abs. DMF, Zugabe von 6  $\mu$ l (0.046 mmol) IBCF und 16  $\mu$ l (0.082 mmol) Tripropylamin und anschließend 30 min rühren bei 0 °C. Danach wurden 50 mg (0.046 mmol) des freien Amins, in 1 ml trockenem DMF gelöst, langsam dem Reaktionsgemisch zugespritzt. Der Ansatz wurde über Nacht gerührt bevor die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurden. Das gelbe, viskose Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt ( $R_t$  = 48.20 min; A = Wasser, B = Acetonitril, 0% B  $\rightarrow$  70% B, 5 min, 70% B  $\rightarrow$  30% B, 60 min, 10 ml/min) und man erhielt ein farbloses Öl.

Ausbeute: 48 mg (0.029 mmol,  $M = 1659.02$  g/mol) 63%.

Die NMR-Daten zeigten eindeutig zwei vorhandene Rotamere in einem 1:0.8-Verhältnis, das eindeutig durch die Integration der doppelten Signalsätze der beiden Isopropylgruppen sowie der benachbarten Methylengruppen zugeordnet werden konnte. Hier sind die chemischen Verschiebungen beider Isomere angegeben.

- <sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 4.54 (m<sub>c</sub>, 1H, H-12), 4.25-4.20 (m, 7H, 3 H-1, 2 H-12, 2 H-22), 3.89 (m<sub>c</sub>, 3H, 3 H-7), 3.73 (m<sub>c</sub>, 3H, 3 H-23), 3.68 (m<sub>c</sub>, 21H, 3 H-5, 2 (H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32)), 3.64 (m<sub>c</sub>, 3H, 3 H-4), 3.62 (m, 2H, 2 H-33), 3.57 (m<sub>c</sub>, 3H, 3 H-7'), 3.51 (m<sub>c</sub>, 8H, 3 H-2, 3 H-3, 2 H-34), 3.28 (m, 3H, 3 H-11), 3.20 (m, 3H, 3 H-11'), 2.90 (t,  $J$  = 7.15 Hz, 2 H, 2 H-44), 2.68 (m<sub>c</sub>, 2 H, 2 H-19), 2.53 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-20), 2.45 (m<sub>c</sub>, 3H, 3 H-15), 2.39 (m<sub>c</sub>, 3H, 3 H-15'), 2.35 (s, 3H, 3 H-46), 2.05 (m<sub>c</sub>, 6H, 6 H-16), 1.68 (m, 9H, 6 H-8, 3 H-10), 1.60 (m, 7H, 3 H-10', 2 H-35, 2 H-43), 1.49-1.34 (m, 20H, 6 H-9, 2 (H-36, H-37, H-38, H-38, H-40, H-41, H-42)), 1.30 (d,  $J$  = 6.42 Hz, 9H, 9 H-6), 1.26 (d,  $J$  = 6.61 Hz, 10H, 10 H-13), 1.20 (d,  $J$  = 6.78 Hz, 8 H, 8 H-13').
- <sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, MeOH, TMS): 197.56 (C-45), 174.78 (C-14), 174.30 (C-18), 143.60 (C-21), 104.80 (C-1), 75.19 (C-33), 75.16 (C-3), 73.02 (C-4), 72.33 (C-2), 72.31 (C-34), 72.30 (C-5), 71.81-71.13 (C-7, C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28, C-29, C-30, C-31, C-32), 64.82 (C-22), 59.01 (C-17), 49.96 (C-12), 47.79 (C-12'), 45.0 (C-11), 42.27 (C-11'), 32.10 (C-20), 32.09 (C-8), 31.90 (C-16), 30.71-30.51 (C-10, C-35, C-36, C-37, C-38, C-39, C-40, C-41, C-42, C-43, C-46), 30.15 (C-19), 29.84 (C-44), 29.78 (C-15), 27.10 (C-9), 21.67 (C-13), 20.67 (C-13'), 16.80 (C-6).
- MALDI**  $m/z$  1683.62 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 1682.00 berechnet für C<sub>81</sub>H<sub>150</sub>N<sub>4</sub>O<sub>28</sub>S + Na);  $m/z$  1698.64 [M + K]<sup>+</sup> (M = 1698.12 berechnet für C<sub>81</sub>H<sub>150</sub>N<sub>4</sub>O<sub>28</sub>S + K).
- ESI-MS**  $m/z$  1682.0738 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 1682.0050 berechnet für C<sub>81</sub>H<sub>150</sub>N<sub>4</sub>O<sub>28</sub>S + Na).

**3-Cascade:** *N*-(1,4-dioxobutyl-hexaethylenglycol-11-acetylthio-undecyl)-aminomethan[3-1,1,1]:ethyliden-5-amidopentyl- $\beta$ -L-fucopyranosid (**50**), (FucC<sub>5</sub>NH)<sub>3</sub>sucEG<sub>6</sub>C<sub>11</sub>SAc



Die Synthese wurde in Zusammenarbeit mit N. Röckendorf durchgeführt.<sup>[176,198]</sup> Zunächst wurde der Cluster **38** entschützt, indem 60 mg (37  $\mu$ mol) des Fmoc-geschützten Derivats in 4 ml abs. DMF gelöst und mit 1 ml Morpholin versetzt wurden. Der Ansatz wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend wurden die Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt. Das freie Amin wurde dann mit 271 mg (0.44 mmol) AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>Osuc **15** und 171 mg (0.45 mmol) HATU zusammen 1 h *in vacuo* getrocknet. Diese Substanzmischung wurde anschließend unter Stickstoffatmosphäre in 5 ml abs. DMF gelöst, mit 85  $\mu$ l (0.5 mmol) DIPEA versetzt und für 48 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der erhaltene Rückstand in Methanol aufgenommen und mittel GPC (Sephadex LH-20) mit MeOH als Eluens gereinigt. Hiernach war für hohe Reinheit dennoch ein zweiter Reinigungsschritt durch preparative HPLC nötig: RP-8 (A = Wasser, B = Acetonitril, 5 % B  $\rightarrow$  80 % B, 10 ml/min, 60 min,  $R_t = 52$  min) ergab nach Gefriertrocknung einen farblosen Schaum.

Ausbeute: 24 mg (15  $\mu$ mol,  $M = 1533.89$  g/mol) 5%.

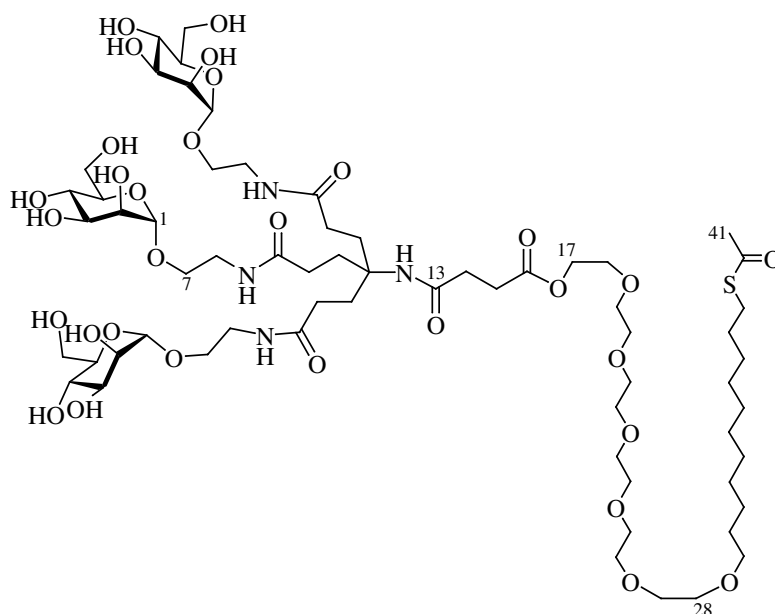
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 4.22 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-20), 4.17 (m<sub>c</sub>, 3H, 3 H-1), 3.85 (m<sub>c</sub>, 3H, 3 H-7), 3.70 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-21), 3.64 (m<sub>c</sub>, 23H, 3 H-5, 2 (H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31)), 3.59 (m<sub>c</sub>, 5H, 3 H-4, 2 H-32), 3.53 (m<sub>c</sub>, 3H, 3 H-7'), 3.46 (m<sub>c</sub>, 6H, 3 H-2, 3 H-3), 3.17 (m<sub>c</sub>, 6H, 6 H-11), 2.86 (t,  $J$  = 7.20 Hz, 2H, 2 H-42), 2.65 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-17), 2.50 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-18), 2.30 (s, 3H, 3 H-44), 2.18 (m<sub>c</sub>, 6H, 6 H-13), 1.96 (m<sub>c</sub>, 6H, 6 H-14), 1.64 (quint,  $J$  = 6.97 Hz, 6H, 6 H-8), 1.54 (m<sub>c</sub>, 10H, 6 H-10, 3 H-33, 3 H-41), 1.41 (m<sub>c</sub>, 6H, 6 H-9), 1.31 (m<sub>c</sub>, 14H, H-34, H-35, H-36, H-37, H-38, H-39, H-40), 1.26 (d,  $J$  = 6.45 Hz, 12 H, 12 H-6).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125.47 MHz, MeOH):  $\delta$  = 175.77 (C-19), 174.89 (C-16), 104.83 (C-1), 75.21 (C-2), 73.06 (C-4), 72.37 (C-3), 71.86 (C-5), 71.58, 71.17, 70.46 (C-7), 70.08 (C-18), 64.99 (C-17), 59.04 (C-15), 40.42 (C-11), 31.75, 31.31, 30.74 (C-13, C-14), 30.74, 30.69, 30.57, 30.42, 30.19, 30.13, 29.86, 29.79 (C-30), 24.77 (C-42), 16.81 (C-6).

**MALDI**  $m/z$  1557 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 1555.8 berechnet für C<sub>72</sub>H<sub>132</sub>N<sub>4</sub>O<sub>28</sub>S + Na).

**ESI-MS**  $m/z$  789.3784 [2 M + Na]<sup>+</sup> (M = 789.4267 berechnet für das Dimer: 2 C<sub>72</sub>H<sub>132</sub>N<sub>4</sub>O<sub>28</sub>S + Na);  $m/z$  1555.7947 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 1555.8641 berechnet für C<sub>72</sub>H<sub>132</sub>N<sub>4</sub>O<sub>28</sub>S + Na).

**3-Cascade:** *N*-(1,4-dioxobutyl-hexaethylenglycol-11-acetylthio-undecyl)-aminomethan[3-1,1,1]:ethyliden-2-amidoethyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (51), (ManC<sub>2</sub>)<sub>3</sub>sucEG<sub>6</sub>C<sub>11</sub>SAc



Die Reaktion wurde entsprechend AAV 1 durchgeführt, allerdings wurde DIPEA statt Tripropylamin verwendet: 45.5 mg (0.0745 mmol) Carbonsäure **15** in 1.5 ml DMF, 11.6  $\mu$ l (0.0894 mmol) IBCF und 28.4  $\mu$ l (0.149 mmol) DIPEA. Nach 30 min rühren wurden 77 mg (0.0894 mmol) des Amin **39** und 14.2  $\mu$ l DIPEA zugegeben und die Mischung 2 h gerührt, bevor das Lösungsmittel im Unterdruck entfernt wurde. Das Rohprodukt wurde durch Gel-Permeations-Chromatographie mit Sephadex LH-20 gereinigt und man erhielt ein farbloses Öl.

Ausbeute: 20.4 mg (0.014 mmol,  $M = 1455.65$  g/mol) 19%.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 4.77$  (m, 3H, 3 H-1), 4.24 ( $m_c$ , 2H, 2 H-17), 3.85 (dd, 3H,  $J = 2.1, 11.5$  Hz, 3 H-6), 3.82 (dd, 3H,  $J = 1.6, 3.3$  Hz, 3 H-2), 3.77 ( $m_c$ , 3H, 3 H-7), 3.70 ( $m_c$ , 8H, 3 H-3, 3 H-6', 2 H-18), 3.64 ( $m_c$ , 18H, 2 (H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27), 3.64 ( $m_c$ , 3H, 3 H-4), 3.59 ( $m_c$ , 3H, 3 H-5), 3.55 ( $m_c$ , 5H, 3 H-7', 2 H-28), 3.46 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H, 2 H-29), 3.40 ( $m_c$ , 6H, 6 H-8), 2.86 (t,  $J = 7.34$  Hz, 2H, 2 H-39), 2.67 ( $m_c$ , 2H, 2 H-15), 2.50 ( $m_c$ , 2H, 2 H-14), 2.30 (s, 3H, 3 H-41), 2.21 ( $m_c$ , 6H, 6 H-10), 1.97 ( $m_c$ , 6H, 6 H-11), 1.55 ( $m_c$ , 4H, 2 H-30, 2 H-38), 1.30 ( $m_c$ , 14H, 2 (H-31, H-32, H-33, H-34, H-35, H-36, H-37)).

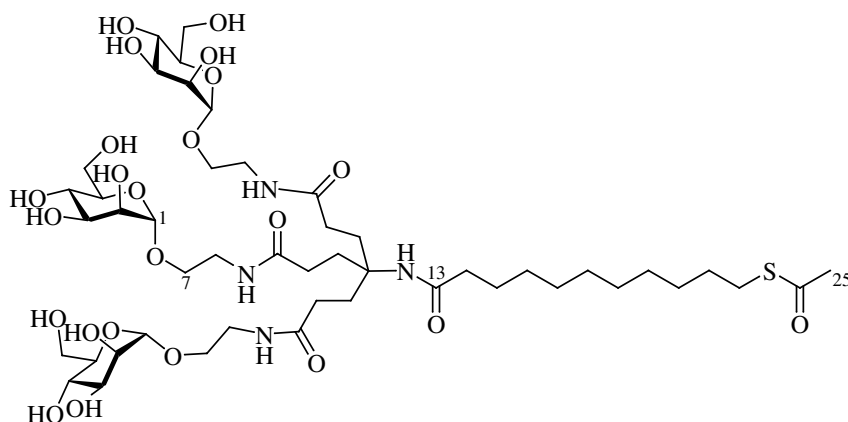
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125.47 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 197.64$  (C-40), 176.06 (C-9), 175.04 (C-13), 173.78 (C-16), 101.69 (C-1), 74.82 (C-5), 72.54 (C-3), 72.37 (C-18), 72.06 (C-2), 71.52, 71.12, 70.04, 68.72 (C-4), 67.26 (C-7), 65.07 (C-17), 62.98 (C-6), 59.09 (C-12), 40.39 (C-8), 31.81 (C-11), 31.62 (C-15), 31.33 (C-10), 30.74, 30.71 (C-38, C-30), 30.68, 30.59, 30.56, 30.18 (C-41), 29.85 (C-14), 29.77 (C-39), 27.19.

**ESI-MS**  $m/z$  1477.7021  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $M = 1477.7080$  berechnet für  $\text{C}_{63}\text{H}_{114}\text{N}_4\text{O}_{31}\text{S} + \text{Na}$ ).

**Drehwert**  $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +27.1^\circ$  ( $c = 0.84$ , MeOH)



**3-Cascade: *N*-(1-oxo-11-acetylthio-undecyl)-aminomethan[3-1,1,1]:ethyliden-2-amidoethyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (52), (ManC<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C<sub>11</sub>SAc**



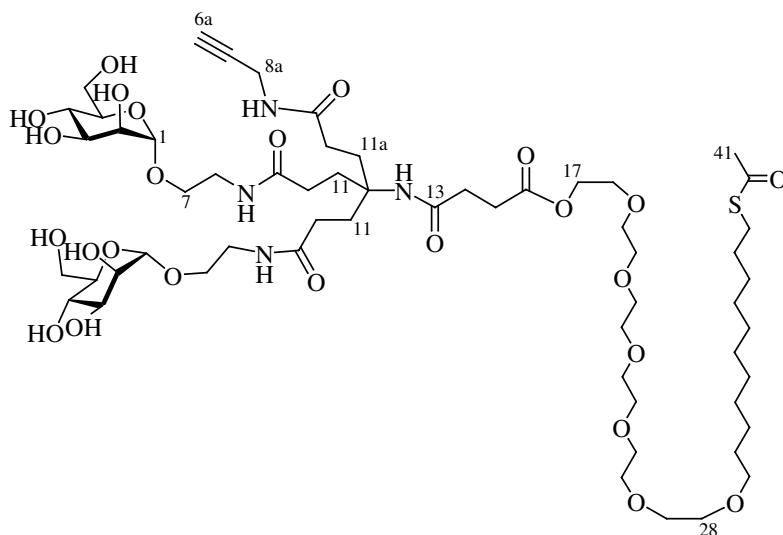
80 mg (0.093 mmol) des geschützten Cluster **39** wurden in 1.5 ml DMF bei RT unter Stickstoffatmosphäre gelöst, 0.3 ml Morpholin wurden zugesetzt und die Reaktionsmischung wurde 2 h gerührt. Nachdem die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt worden waren, erhielt man einen farblosen Feststoff, der ohne weitere Reinigung eingesetzt wurde. Die Amidkupplung wurde durch Anwendung der AAV 1 durchgeführt: 22 mg (0.0843 mmol) der Säure **2** in 0.5 ml DMF, 32  $\mu$ l (0.169 mmol) Tripropylamin und 11  $\mu$ l (0.0927 mmol) IBCF bei 0 °C. Nach 30 min wurde das zuvor entschützte Amin, in 1 ml DMF gelöst, zusammen mit 16  $\mu$ l NPr<sub>3</sub> zugetropft, die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und für 90 h gerührt. Durch Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde die Reaktion beendet und der erhaltene Rückstand in 15 % MeCN/Wasser aufgenommen und durch präparative HPLC gereinigt (A = Wasser, B = Acetonitril, 15 % B  $\rightarrow$  70 % B, 60 min, 10 ml/min, R<sub>t</sub> = 22.73 min). Man erhielt nach Gefriertrocknung einen farblosen Schaum.

Ausbeute: 30 mg (0.027 mmol, M = 1104.52) 32 %.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 4.76 (d,  $J$  = 1.65 Hz, 3H, 3 H-1), 3.85 (dd,  $J$  = 2.2,  $J$  = 11.74 Hz, 3H, 3 H-6), 3.82 (dd, 3H,  $J$  = 1.65, 3.3 Hz, 3 H-2), 3.76 (m<sub>c</sub>, 3H, 3 H-7), 3.70 (m<sub>c</sub>, 6H, 3 H-3, 3 H-6'), 3.59 (dd,  $J$  = 9.35,  $J$  = 9.72 Hz, 3 H-4), 3.55 (m<sub>c</sub>, 6H, 3 H-5, 3 H-7'), 3.43 (m<sub>c</sub>, 6H, 3 H-8), 3.37 (m<sub>c</sub>, 6H, 3 H-8'), 2.85 (t,  $J$  = 7.20 Hz, 2H, 2 H-23), 2.30 (s, 3H, 3 H-25), 2.18 (m<sub>c</sub>, 8H, 6 H-10, 2 H-14), 1.98 (m<sub>c</sub>, 6H, 6 H-11), 1.60 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-15), 1.55 (m, 2 H, 2 H-22), 1.30 (br, 12H, 2 (H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21)).

<b><math>^{13}\text{C-NMR}</math></b>	(125.47 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ): $\delta = 197.77$ (C-24), 176.06 (C-9), 176.00 (C-13), 101.63 (C-1), 74.81 (C-5), 72.50 (C-3), 72.05 (C-2), 68.66 (C-4), 67.21 (C-7), 63.00 (C-6), 58.89 (C-12), 40.38 (C-8), 37.86 (C-14), 31.79 (C-11), 31.30 (C-10), 30.74 (C-22), 30.49 (C-25), 30.42-29.84 (C-16, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21), 29.78 (C-23), 27.15 (C-15).
<b>MALDI</b>	$m/z$ 1127.83 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ( $\text{M} = 1127.5$ berechnet für $\text{C}_{47}\text{H}_{84}\text{N}_4\text{O}_{23}\text{S} + \text{Na}$ ).
<b>ESI-MS</b>	$m/z$ 1127.4591 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ( $\text{M} = 1127.5139$ berechnet für $\text{C}_{47}\text{H}_{84}\text{N}_4\text{O}_{23}\text{S} + \text{Na}$ ).

**3-Cascade: *N*-(1,4-dioxobutyl-hexaethylenglycol-11-acetylthio-undecyl)-aminomethan[2-1,1]:ethyliden-2-amidoethyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid[1-1]:ethyliden-amidoprop-2-in (53)**



18 mg (0.0196 mmol) des NFmoc-geschützten Clusters **41** wurden in 0.5 ml abs. DMF gelöst und nach Zugabe von 80  $\mu\text{l}$  Morpholin 1.5 h unter Stickstoffatmosphäre bei RT gerührt. Nach erfolgter Entschützung wurde das Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in 0.3 ml abs. DMF gelöst. Die Amidknüpfung wurde in einem kleinen Probengläschen gemäß der AAV 1 durchgeführt. Hierzu wurden 12.1 mg (0.0196 mmol) Carbonsäure **15** in 0.3 ml DMF gelöst, auf 0 °C abgekühlt und mit 5.62 mg (0.021 mmol) Chlorameisensäureisobutylester und 7.5  $\mu\text{l}$  (0.039 mmol)  $\text{NPr}_3$  versehen. Zu dieser klaren Lösung wurde bei 0 °C das gelöste, freie Amin langsam zutropft und der Ansatz anschließend 2 h gerührt. Danach wurden die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und durch eine Reinigungssequenz aus GPC (Sephadex LH-20, Methanol) und anschließender präparativer HPLC (A = Wasser, B = Acetonitril,

15 % B  $\rightarrow$  70 % B, 60 min, 10 ml/min,  $R_t = 63.50$  min) unterzogen. Es wurde nach Lyophilisation ein farbloser Schaum erhalten.

Ausbeute: 6.5 mg (0.005 mmol,  $M = 1287.51$  g/mol) 26 %.

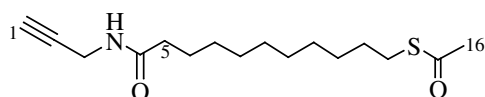
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 4.80$  (m  $\approx$  d,  $J = 1.57$  Hz, 2H, 2 H-1), 4.28 (m, 2H, 2 H-17), 4.00 (m  $\approx$  d,  $J = 2.53$  Hz, 2H, 2 H-8a), 3.89 (dd,  $J = 2.08$  Hz,  $J = 11.69$  Hz, 2H, 2 H-6), 3.86 (dd,  $J = 1.70$  Hz,  $J = 3.34$  Hz, 2H, 2 H-2), 3.81 (m, 2H, 2 H-7), 3.75 (m, 6H, 2 H-3, 2 H-6', 2 H-18), 3.68 (m, 18H, 2 (H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27)), 3.62 (m, 4H, 2 H-4, 2 H-5), 3.58 (m, 4H, 2 H-7', 2 H-29), 3.51 (t,  $J = 6.64$  Hz, 2H, 2 H-28), 3.46 (m, 2H, 2 H-8), 3.42 (m, 2H, 2 H-8'), 2.91 (t,  $J = 7.30$  Hz, 2H, 2 H-39), 2.70 (m, 2H, 2 H-15), 2.66 (m (t,  $J = 2.55$  Hz, 1H, H-6a), 2.54 (t,  $J = 6.66$  Hz, 2H, 2 H-14), 2.35 (s, 3H, 3 H-41), 2.24 (m, 6H, 6 H-10), 2.00 (m, 6H, 6 H-11), 1.59 (m, 4H, 2 H-30, 2 H-38), 1.35 (m, 14H, 2 (H-31, H-32, H-33, H-34, H-35, H-36, H-37)).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 197.82$  (C-40), 176.06 (C-9), 175.40 (C-9a), 175.02 (C-13), 173.87 (C-16), 101.69 (C-1), 80.66 (C-7a), 74.83 (C-5), 72.51 (C-3), 72.39 (C-18), 72.06 (C-2), 71.55 (C-6a), 71.16, 70.04, 68.68 (C-4), 67.25 (C-7), 65.08 (C-17), 62.97 (C-6), 59.11 (C-12), 40.39 (C-8), 31.72 (C-11), 31.28 (C-15), 30.98, 30.78 (C-10), 30.73, 30.72 (C-38), 30.63 (C-30), 30.59, 30.53, 30.22 (C-41), 30.11, 29.84 (C-14), 29.80 (C-39), 29.53 (C-8a), 27.22.

**MALDI**  $m/z$  1309.8  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $M = 1309.6$  berechnet für  $\text{C}_{58}\text{H}_{102}\text{N}_4\text{O}_{25}\text{S} + \text{Na}$ ).

**ESI-MS**  $m/z$  1309.6657  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $M = 1309.6446$  berechnet für  $\text{C}_{58}\text{H}_{102}\text{N}_4\text{O}_{25}\text{S} + \text{Na}$ );  $m/z$  666.3187  $[2 \text{M} + \text{Na}]^+$  ( $M = 666.3169$  berechnet für das Dimer:  $2 (\text{C}_{58}\text{H}_{102}\text{N}_4\text{O}_{25}\text{S}) + \text{Na}$ ).

### 11-Acetylthio-undecansäure-2-propinylamid (54), $\text{AcSC}_{10}\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$



Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt mit: 1.60 g (6.14 mmol) der Carbonsäure **2**, 956.4  $\mu\text{l}$  (7.370 mmol) IBCF und 2.34 ml (12.29 mmol) Tripropylamin in 25 ml abs. DMF. Nach Abkühlen auf  $0^\circ\text{C}$  wurde 50 min gerührt, bevor 505.8  $\mu\text{l}$  (7.370 mmol) Propargylamin, gelöst in 5 ml abs. DMF, sowie 1.17 ml (6.15 mmol)

$\text{NPr}_3$  langsam zugetropft wurden. Die klare Lösung wurde langsam auf RT erwärmt und für 2 h gerührt, bevor das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Das Rohprodukt wurde durch Kieselgelchromatographie (EE/CH 1:1.5) gereinigt und ergab einen farblosen, amorphen Feststoff.

Ausbeute: 1.430 g (4.807 mmol,  $M = 297.46$  g/mol) 78 %.

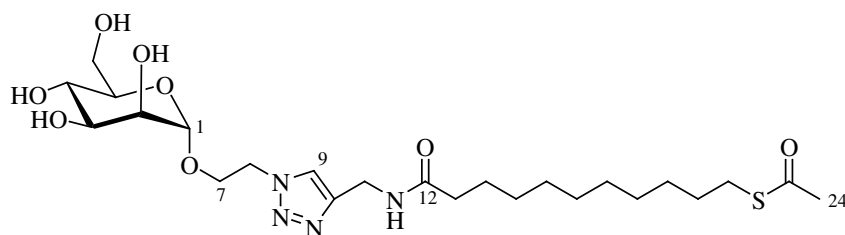
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta = 4.05$  (dd,  $J = 2.56$  Hz,  $J = 5.24$  Hz, 2H, 2 H-3), 2.86 (t,  $J = 7.37$  Hz, 2H, 2 H-14), 2.32 (s, 3H, 3 H-16), 2.23 (t,  $J = 2.55$  Hz, 1H, H-1), 2.20 (m  $\approx$  t,  $J = 7.50$  Hz, 2H, 2 H-5), 1.63 (m  $\approx$  quint,  $J = 7.44$  Hz, 2H, 2 H-13), 1.56 (m  $\approx$  quint,  $J = 7.56$  Hz, 2H, 2 H-6), 1.27 ( $m_c$ , 12H, 2 (H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12)).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta = 196.10$  (C-15), 172.78 (C-4), 79.69 (C-2), 71.38 (C-1), 36.37 (C-5), 30.59 (C-16), 29.48 – 28.70 (C-3, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13), 25.48 (C-4).

**IR**  $\tilde{\nu} = 3311$  (s), 3287 (s), 2919 (s), 2849 (s), 1691 (s), 1634 (s), 1534 (s), 1534 (s), 1471 (m), 1454 (w), 1418 (m), 1357 (w), 1284 (w), 1232 (m), 1209 (w), 1141 (m), 959 (w), 643 (m), 579 (w), 549 (w).

**ESI-MS**  $m/z$  298.1828  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ( $M = 298.1835$  berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_2\text{S} + \text{H}$ );  $m/z$  320.1643  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $M = 320.1655$  berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_2\text{S} + \text{Na}$ ).

***N*-{2-( $\alpha$ -D-Mannopyranosyloxy)-ethyl-1*H*[1,2,3]triazol-4-yl}-methyl-11-acetylthio-undecansäureamid (58),  $\text{ManC}_2\text{-Triazol-CH}_2\text{NHC(O)C}_{10}\text{SAc}$**



30 mg (0.120 mmol) des Mannosylazids **34** und 35.8 mg (0.120 mmol) des Azids **54** wurden in 1 ml Methanol gelöst und 114.6 mg (0.602 mmol)  $\text{CuI}$  sowie 105  $\mu\text{l}$  (0.602 mmol) DIPEA wurden in das entgaste Reaktionsgemisch gegeben. Der Ansatz wurde bei RT über Nacht gerührt, bevor die grünliche Suspension durch einen HPLC-Filter filtriert wurde und die Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt wurden. Das viskose Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt ( $R_t = 47.60$  min; A = Wasser, B = Acetonitril, 0 % B  $\rightarrow$  85 % B, 5 min, 85 % B  $\rightarrow$  30 % B, 60 min,

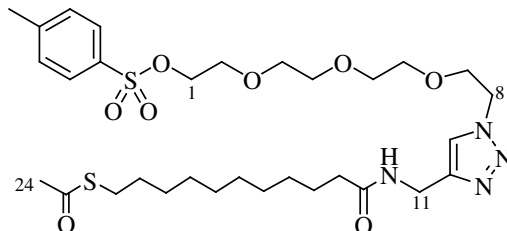
10 ml/min) und ergab ein farbloses Öl.

Ausbeute: 22.4 mg (0.041 mmol, M = 546.27 g/mol) 34 %.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 7.91 (s, 1H, H-9), 4.75 (s, 1H, H-1), 4.58 (s (br), 2H, 2 H-8), 4.38 (s (br), 2H, 2 H-11), 4.04 (m, 1H, H-7), 3.86 (m, 1H, H-7'), 3.84 (m  $\approx$  s, 1H, H-2), 3.79 (dd,  $J$  = 2.10 Hz,  $J$  = 12.15 Hz, 1H, H-6), 3.65 (m  $\approx$  t, 1H, H-6), 3.62 (m, 1H, H-3), 3.59 (t,  $J$  = 9.49 Hz, 1H, H-4), 3.02 (m, 1H, H-5), 2.81 (t,  $J$  = 7.26 Hz, 2H, 2 H-22), 2.28 (s, 3H, 3 H-24), 2.22 (t,  $J$  = 7.23 Hz, 2H, 2 H-13), 1.52 (m, 4H, 2 H-14, 2 H-21), 1.23 (m<sub>c</sub>, 12H, 2 (H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 198.93 (C-23), 177.69 (C-12), 147.25 (C-10), 126.61 (C-9), 101.95 (C-1), 75.24 (C-5), 72.94 (C-3), 72.37 (C-2), 68.82 (C-4), 67.80 (C-7), 63.12 (C-6), 52.39 (C-8), 38.21 (C-13), 36.70 (C-11), 32.66-31.18 (C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21), 28.04.

***N*-(1-*O*-Toluolsulfonyl-tetraethylenglycolyl- $\omega$ -1*H*[1,2,3]triazol-4-yl)-methyl-11-acetylthio-undecansäureamid (59), AcSC<sub>10</sub>C(O)NHCH<sub>2</sub>-Triazol-EG<sub>4</sub>OTos**

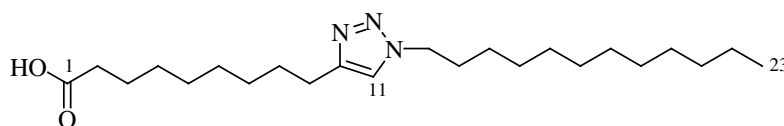


30 mg (0.101 mmol) Alkin **54** und 34.3 mg (0.101 mmol) des Tosylats **55** wurden in 1 ml Methanol gelöst und 96.0 mg (0.504 mmol) CuI sowie 87.8  $\mu$ l (0.504 mmol) DIPEA wurden in das entgaste Reaktionsgemisch gegeben. Der Ansatz wurde bei RT über Nacht gerührt und anschließend durch einen HPLC-Filter filtriert. Nach Entfernen der Lösungsmittel *in vacuo* wurde ein farbloser amorpher Feststoff erhalten, der ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden konnte. Die Reinheit wurde durch analytische HPLC belegt:  $R_t$  = 26.49 min [250/4 LiChrosorp 7 $\mu$ m C8, A = Wasser, B = Acetonitril, 0% B  $\rightarrow$  90% B, 60 min, 1 ml/min].

Ausbeute: 43.3 mg (0.065 mmol, M = 670.31 g/mol) 62 %.

- <sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 7.78 (d,  $J$  = 8.34 Hz, 2H, 2 Ar-H), 7.73 (s, 1H, H-9), 7.35 (d,  $J$  = 8.10 Hz, 2H, 2 Ar-H), 6.42 (s (br), 1H, NH), 4.51 (m, 4H, 2 H-8, 2 H-11), 4.15 (m, 2H, 2 H-1), 3.87 (dd,  $J$  = 4.63 Hz,  $J$  = 9.83 Hz, 2H, 2 H-7), 3.69 (m, 2H, 2 H-2) 3.60 (m, 8H, 2 (H-3, H-4, H-5, H-6)), 2.86 (dd,  $J$  = 7.20 Hz,  $J$  = 14.56 Hz, 2H, 2 H-22), 2.45 (s, 3H, 3 Ar-CH<sub>3</sub>), 2.32 (s, 3H, 3 H-24), 2.19 (m, 2H, 2 H-13), 1.56 (m, 4H, 2 H-14, 2 H-21), 1.49 (m, 12H, 2 (H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20)).
- <sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 196.00 (C-23), 173.13 (C-12), 144.83 (Ar-C), 144.45 (C-10), 132.82 (Ar-C), 129.89 (Ar-C), 127.86 (Ar-C), 123.20 (C-9), 70.66-68.60 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7), 54.35 (Ar-CH<sub>3</sub>), 50.21 (C-8), 42.67 (C-11), 36.47 (C-13), 30.57 (C-24), 29.39-28.69 (C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21), 25.54 (C-22).
- ESI-MS**  $m/z$  693.3025 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 693.2962 berechnet für C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> + Na).

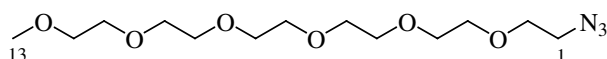
### 9-(1-Undecanyl-1*H*[1,2,3]triazol-4-yl)-nonansäure (61)



60.9 mg (0.288 mmol) 1-Azidododecan **57** und 50.0 mg (0.274 mmol) Undecinsäure wurden in 1.5 ml Acetonitril gelöst. Die Reaktionsmischung wurde entgast, auf 0 °C gekühlt und mit 104.5 mg (0.548 mmol) CuI und 63.7  $\mu$ l (0.548 mmol) 2,6-Lutidin versehen. Die farblose, klare Suspension auf RT erwärmt und über Nacht bei RT gerührt. In dieser Zeit hatte sich ein trüber, gelb-grüner Niederschlag gebildet. Zur Aufarbeitung wurden 0.5 ml 2 M HCl zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase anschließend dreimal mit wenig DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaCl<sub>(aq)</sub> gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung der Lösungsmittel bei reduziertem Druck wurde ein hellbrauner amorpher Feststoff erhalten, der säulenchromatographisch (EE:CH 2:1  $\rightarrow$  4:1) an Kieselgel gereinigt wurde. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.  
Ausbeute: 29.6 mg (0.751 mmol, M = 393.61 g/mol) 50 %.

- <sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 7.25 (s, 1H, H-11), 4.30 (t,  $J$  = 7.29 Hz, 2H, 2 H-12), 2.70 (m  $\approx$  t, 2H, 2 H-9), 2.34 (t,  $J$  = 7.50 Hz, 2H, 2 H-2), 1.88 (m, 2H, 2 H-13), 1.64 (m, 4H, 2 H-3, 2 H-8), 1.38 und 1.25 (m, 18H, 2 (H-4, H-5, H-6, H-7, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22)), 0.88 (t,  $J$  = 6.98 Hz, 3H, 3 H-23).
- <sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 178.872 (C-1), 148.30 (C-10), 120.43 (C-11), 50.26 (C-12), 34.08 (C-2), 31.91 (C-21), 30.34-25.56 (C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20), 24.71 (C-3), 22.69 (C-22), 14.12 (C-23).
- MALDI**  $m/z$  394.3 [M + H]<sup>+</sup> (M = 394.61 berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> + H);  
 $m/z$  416.3 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 416.60 berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> + Na).

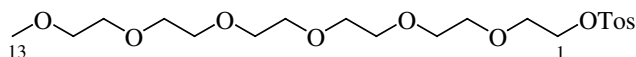
### 1-Azido- $\omega$ -methyl-hexaethylenglycol (**64**), MeOEG<sub>6</sub>N<sub>3</sub>



2.50 g (5.00 mmol) Tosylat **66** wurden in 50 ml DMF gelöst und bei RT wurden 2.032 g (31.21 mmol) Natriumazid sowie 50 mg TBABr zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 3.5 h bei 90 °C gerührt, bevor die Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt wurden. Das Rohprodukt wurden säulenchromatographisch (MeOH:DCM 1:20  $\rightarrow$  1:15) gereinigt und ergab ein farbloses Öl.

Ausbeute: 1.156 g (3.597 mmol, M = 321.37 g/mol) 72 %.

- <sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 3.66 (m<sub>c</sub>, 20 H, 2 (H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12)), 3.55 (m, 2H, 2 H-2), 3.39 (m  $\approx$  t,  $J$  = 5.23 Hz, 2H, 2 H-1), 3.38 (s, 3H, 3 H-13).
- <sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 71.87 (C-12), 70.64-70.45 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11), 69.96 (C-2), 58.96 (C-13), 50.62 (C-1).
- IR**  $\tilde{\nu}$  = 3441 (br), 2875 (s), 2107 (s), 1721 (w), 1642 (w), 1454 (m), 1349 (m), 1300 (m), 1250 (m), 1199 (w), 1106 (s), 948 (m), 850 (w).
- ESI-MS**  $m/z$  344.1764 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 344.1792 berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> + Na);  $m/z$  316.1725 [M - N<sub>2</sub> + Na]<sup>+</sup> (M = 316.1731 berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> - N<sub>2</sub> + Na).

**1-O-Toluolsulfonyl- $\omega$ -methyl-hexaethylenglycol (66), MeOEG<sub>6</sub>OTos**


1.850 g (6.242 mmol) Hexaethylenglycolmonomethylether und 1.40 g (12.485 mmol) DABCO wurden in 7 ml EE gelöst 100 mg ausgeheiztes 4 Å Molsieb wurden zugegeben. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt und 1.785 g (9.63 mmol) Tosylchlorid wurden in die gerührte Reaktionsmischung gegeben, bevor auf RT erwärmt wurde. Nach 1.5 h wurde filtriert und das Filtrat zweimal mit 2 M HCl gewaschen. Die Phasen wurden getrennt und die wäßrige Lösung wurde je zweimal mit EE und DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung der Lösungsmittel *in vacuo* wurde das Tosylat **66** als farbloses Öl erhalten, was ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden konnte.

Ausbeute: 2.248 g (4.994 mmol, M = 450.19 g/mol) 80 %.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[242]</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 7.80 (d,  $J$  = 8.31 Hz, 2H, 2 Ar-H, 2H), 7.35 (d,  $J$  = 7.97 Hz, 2H, 2 Ar-H), 4.16 (m  $\approx$  t, 2H, 2 H-1), 3.64-3.58 (m, 22H, 2 (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12)), 3.38 (s, 3H, 3 Ar-CH<sub>3</sub>), 2.45 (s, 3H, 3 H-13).

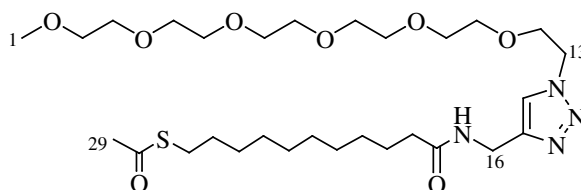
**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 144.72 (Ar-C), 132.83 (Ar-C), 129.74 (Ar-C), 127.88 (Ar-C), 71.83 (C-2), 70.63-68.56 (C-1, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12), 58.95 (C-13), 21.56 (Ar-CH<sub>3</sub>).

**IR**  $\tilde{\nu}$  = 3400 (w), 2874 (s), 1598 (w), 1453 (m), 1356 (s), 1293 (m), 1205 (m), 1177 (s), 1099 (s), 1019 (m), 924 (m), 818 (m), 777 (w), 665 (m), 555 (s).

**ESI-MS**  $m/z$  743.1607 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 473.1816 berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>43</sub>O<sub>9</sub>S + Na).



*N*-( $\omega$ -Methyl-hexaethylenglycolyl-1*H*[1,2,3]triazol-4-yl)-methyl-11-acetylthio-undecansäureamid (**67**), AcSC<sub>10</sub>C(O)NHCH<sub>2</sub>-triazol-EG<sub>6</sub>OMe



100.0 mg (0.353 mmol) Alkin **54** und 103.1 mg (0.321 mmol) MeOEG<sub>6</sub>N<sub>3</sub> **64** wurden bei RT in 2 ml Acetonitril gelöst. Die Reaktionsmischung wurde zweimal entgast und mit Stickstoff gespült. Nach Zugabe von 61.1 mg (0.321 mmol) Kupfer(I)iodid wurden in die gerührte, farblose Lösung 72.6  $\mu$ l DIPEA langsam zugetropft, worauf die Farbe nach gelb umschlug. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT gerührt und verfärbte sich grün. Der Feststoff wurde durch einen Spritzenfilter abgetrennt und nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* erhielt man ein gelbes Öl. Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (EE/CH 4:1  $\rightarrow$  10:1  $\rightarrow$  MeOH/DCM 1:20) und ergab einen gelben, amorphen Feststoff.

Ausbeute: 0.171 g (0.276 mmol, M = 618.83 g/mol) 86 %.

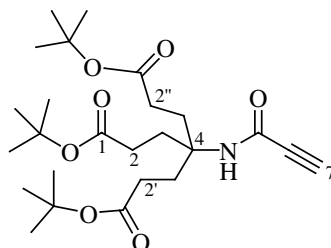
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 7.76 (s, 1H, H-14), 6.63 (m  $\approx$  t,  $J$  = 5.38 Hz, 1H, NH), 4.54 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 2H, H-13), 4.52 (d,  $J$  = 5.39 Hz, 2H, H-16), 3.87 (t,  $J$  = 5.10 Hz, 2H, 2 H-12), 3.63 (m<sub>c</sub>, 18H, 2 (H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10)), 3.54 (m, 2H, 2 H-2), 3.37 (s, 3H, 3 H-1), 2.86 (t,  $J$  = 7.36 Hz, 2H, 2 H-27), 2.32 (s, 3H, 3 H-29), 2.19 (m  $\approx$  t,  $J$  = 7.50 Hz, 2H, 2 H-18), 1.54 (m<sub>c</sub>, 4H, 2 H-19, 2 H-26), 1.25 (m, 12H, 2 (H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 196.04 (C-28), 173.22 (C-17), 144.66 (C-15), 123.53 (C-14), 71.88 (C-2), 70.57–70.44 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12), 69.37 (C-3), 59.00 (C-1), 50.36 (C-13), 36.50 (C-16), 34.71 (C-18), 30.64 (C-29), 29.47–28.76 (C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26, C-27), 25.60 (C-28).

**IR**  $\tilde{\nu}$  = 3292 (w), 2919 (s), 2852 (m), 1694 (s), 1635 (s), 1548 (s), 1471 (s), 1421 (w), 1348 (s), 1287 (w), 1225 (w), 1110 (s), 962 (s), 848 (m), 775 (w), 714 (m), 664 (w), 631 (s), 419 (w).

**MALDI**  $m/z$  641.6 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 641.36 berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S + Na);  
 $m/z$  657.6 [M + K]<sup>+</sup> (M = 657.4 berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S + K).

**ESI-MS**  $m/z$  641.3625 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 641.3555 berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S + Na).

**Propiolsäure-*tris*(2-*tert*-butoxycarbonyl)ethyl)-methyramid (69)**


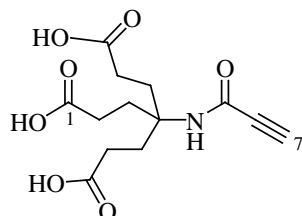
100.0 mg (1.418 mmol) Propargylsäure wurde in 1 ml abs. DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. 593.3 mg (1.560 mmol) HATU wurden zugegeben und in die gerührte, klare Reaktionsmischung wurde eine Lösung von 589.5 mg (1.418 mmol) des Amins **36** in 1.5 ml DMF langsam zugetropft. In die klare, farblose Lösung wurden dann 370.6  $\mu$ l (2.128 mmol) DIPEA langsam zugegeben, worauf die Farbe nach gelb umschlug. Es wurde zunächst 3 h bei dieser Temperatur gerührt, dann auf RT erwärmt und über Nacht gerührt. Zur Aufarbeitung wurden die Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (EE:CH 1:1) an Kieselgel gereinigt.

Ausbeute: 373 mg (0.798 mmol,  $M = 467.60$  g/mol) 56 %.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta = 6.40$  (s, 1H, NH), 2.71 (s, 1H, H-7), 2.56 (m, 6H, 2 (H-2, H-2', H-2'')), 1.99 (6H, 2 (H-3, H-3', H-3'')), 1.44 (m, 27H, 9 CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta = 172.62$  (C-1), 151.16 (C-5), 80.86 (C-CH<sub>3</sub>), 77.80 (C-7), 71.63 (C-6), 58.79 (C-4), 29.82-29.67 (C-2, C-3), 29.09 (CH<sub>3</sub>).

ESI-MS  $m/z$  490.1831 [M + Na]<sup>+</sup> ( $M = 490.2775$  berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>7</sub> + Na).

**Propiolsäure-*tris*(2-carboxyethyl)-methyramid (70)**


55.0 mg (0.118 mmol) des Triesters **69** wurden bei RT in 1.5 ml Dichlorethan gelöst und mit 1.5 ml Trifluoressigsäure versetzt. Der Ansatz wurde 2.5 h gerührt, bevor

die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurden. Das blaß-gelbe Rohprodukt konnte ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden.

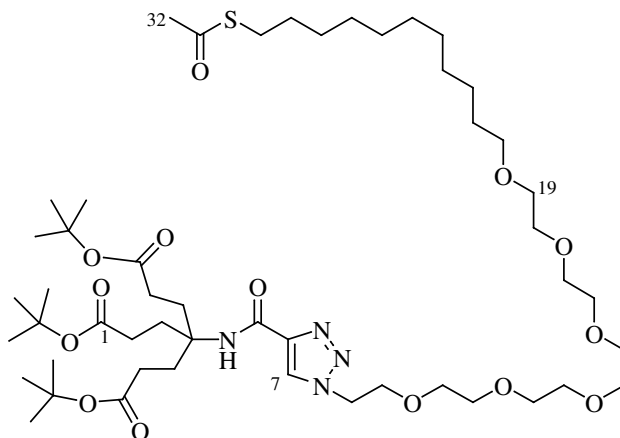
Ausbeute: 34.5 mg (0.115 mmol, M = 299.10 g/mol) 98 %.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 3.51 (s, 1H, H-7), 2.33 (m, 6H, 2 (H-2, H-2', H-2'')), 2.05 (6H, 2 (H-3, H-3', H-3'')).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 176.84 (C-1), 153.94 (C-5), 78.46 (C-7), 74.60 (C-6), 59.87 (C-4), 30.11 (C-2), 29.06 (C-3).

ESI-MS *m/z* 322.0693 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 322.0897 berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>7</sub> + Na).

#### 4-[Tris(2-tert-butoxycarbonyl)ethyl)methylcarbamoyl]-1-[ω-(11-acetylthio-undecyl)-hexaethylenglycol]-1H-[1,2,3]triazol (71)

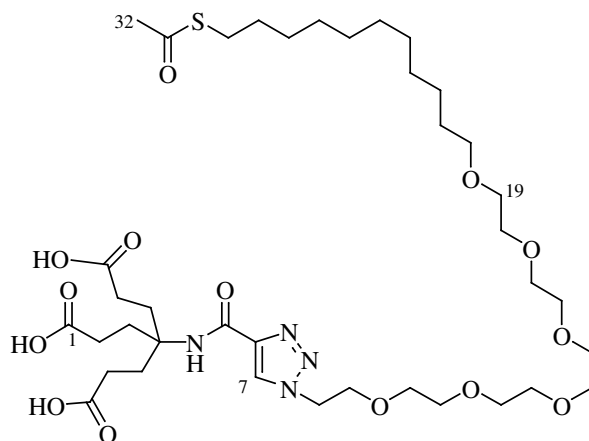


20.0 mg (0.037 mmol) AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>N<sub>3</sub> **9** und 26.2 mg (0.056 mmol) des Alkins **70** wurden unter Stickstoff in 1 ml entgastem Acetonitril gelöst und mit 8.5 mg (0.044 mmol) CuI sowie 8.5 µl DIPEA versehen. Der Ansatz wurde bei RT 20 h gerührt, bevor die Suspension filtriert wurden und die Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt wurden. Das Rohprodukt wurde durch präparative HPLC gereinigt: (A = Wasser, B = Acetonitril, 0 % B, 10 min, 0 % B → 70 % B, 30 min, 70 % B → 100 % B, 30 min, 10 ml/min, R<sub>t</sub> = 65.1 min) unterzogen. Es wurde nach Lyophilisation ein farbloser Schaum erhalten.

Ausbeute: 34.1 mg (0.034 mmol, M = 1003.33 g/mol) 91 %.

- <sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 8.19 (s, 1H, H-7), 6.84 (s, 1H, NH), 4.58 (m  $\approx$  t, 2H, 2 H-8), 3.88 (m  $\approx$  t, 2H, 2 H-9), 3.65-3.63 (m, 18H, 2 (H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18)), 3.57 (m, 2H, 2 H-19), 3.44 (t,  $J$  = 6.82 Hz, 2H, 2 H-20), 2.86 (t,  $J$  = 7.34 Hz, 2H, 2 H-30), 2.32 (s, 3H, 3 H-32), 2.26 (m, 6H, 2 (H-2, H-2', H-2'')), 2.08 (m, 6H, 2 (H-3, H-3', H-3'')), 1.56 (m, 4H, 2 H-21, 2H-29), 1.43 (m, 27H, 9 CH<sub>3</sub>), 1.26 (m, 14H, 2 (H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28)).
- <sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 196.03 (C-31), 172.33 (C-1), 159.33 (C-5), 143.55 (C-6), 126.32 (C-7), 80.51 (CCH<sub>3</sub>), 71.52-70.02 (C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19), 69.21 (C-7), 57.68 (C-4), 57.68 (C-8), 30.62 (C-20), 30.00 (C-2), 29.64 (C-3), 29.61-28.79 (C-21, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28, C-29, C-30), 28.06 (CH<sub>3</sub>).
- MALDI**  $m/z$  1026.1 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 1026.3 berechnet für C<sub>50</sub>H<sub>90</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub>S + Na).

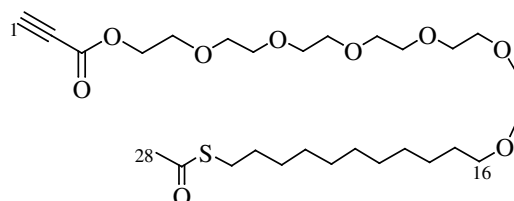
4-[*Tris*(2-carboxyethyl)methylcarbamoyl]-1-[ $\omega$ -(11-acetylthio-undecyl)-hexaethylenglycol]-1*H*-[1,2,3]triazol (**72**)



34.0 mg (0.034 mmol) des geschützten Triesters **71** wurden in 0.7 ml Dichlorethan gelöst und bei RT wurden in die gerührte Lösung 0.7 ml Trifluoressigsäure gegeben. Nach einer Stunde wurden die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und es wurde ein farbloses Öl erhalten, was ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden konnte. Ausbeute: 27.7 mg (0.033 mmol, M = 835.02 g/mol) 98 %.

- <sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS):  $\delta$  = 8.46 (s, 1H, H-7), 4.67 (m, 2H, 2 H-8), 3.95 (m, 2H, 2 H-9), 3.66 (m, 20H, 2 (H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19)), 3.50 (t,  $J$  = 6.61 Hz, 2H, 2 H-20), 2.90 (t,  $J$  = 7.20 Hz, 2H, 2 H-30), 2.39 (m, 6H, 2 (H-2, H-2', H-2'')), 2.34 (s, 3H, 3 H-32), 2.21 (m, 6H, 2 (H-3, H-3', H-3'')), 1.59 (m, 4H, 2 H-21, 2 H-29), 1.34 (m, 14H, 2 (H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28)).
- <sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS):  $\delta$  = 197.64 (C-31), 176.83 (C-1), 162.10 (C-5), 140.14 (C-6), 128.17 (C-7), 72.36-70.13 (C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19)), 59.25 (C-4), 51.66 (C-8), 30.86-29.26 (C-2, C-3, C-21, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28, C-29, C-30).
- IR**  $\tilde{\nu}$  = 3398 (br), 2926 (s), 2856 (s), 1723 (s), 1569 (m), 1511 (w), 1460 (m), 1416 (m), 1352 (m), 1301 (w), 1203 (w), 1180 (m), 1102 (s), 1027 (m), 952 (m), 628 (m).
- ESI-MSI**  $m/z$  857.4116 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 857.4188 berechnet für C<sub>38</sub>H<sub>66</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub>S + Na).

**Propiolsäure- $\omega$ -(11-acetylthio-undecyl)-hexaethylenglycolester (73),**  
 AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>OC(O)C $\equiv$ CH

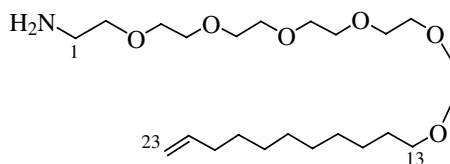


1.290 g (2.528 mmol) AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>OH **5** und 155.6  $\mu$ l (2.528 mmol) Propiolsäure wurden in 10 ml abs. DCM gelöst und auf -26 °C gekühlt, bevor 547.6 mg (2.654 mmol) DCC und 30.9 mg (0.253 mmol) DMAP in die gerührte Reaktionsmischung gegeben wurden, wodurch sich die klare, farblose Lösung spontan gelb verfärbte. Der Ansatz wurde auf RT erwärmt und über Nacht gerührt. Die braune Reaktionsmischung wurde durch einen Spritzenfilter von den entstandenen Feststoffen getrennt und säulenchromatographisch (EE/CH 2:1  $\rightarrow$  4:1) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde ein gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 1.0383 g (1.845 mmol, M = 562.76 g/mol) 73 %.

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS): $\delta = 4.35$ (m, 2H, 2 H-4), 3.74 (m, 2H, 2 H-5), 3.66–3.58 (m, 20H, 2 (H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15)), 3.44 (t, $J = 6.81$ Hz, 2H, 2 H-16), 2.99 (s, 1H, H-1), 2.86 (t, $J = 7.26$ Hz, 2H, 2 H-26), 2.32 (s, 3H, 3 H-28), 1.56 (m <sub>c</sub> , 4H, 2 H-17, 2 H-25), 1.26 (m, 14H, 2 (H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24)).
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(125 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS): $\delta = 196.05$ (C-27), 152.58 (C-3), 75.28 (C-2), 74.45 (C-1), 71.46–69.95 (C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15), 68.47 (C-16), 65.17 (C-4), 30.59 (C-28), 29.54 (C-26), 29.48–28.73 (C-17, C-18, C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24, C-25), 26.00.
<b>IR</b>	$\tilde{\nu} = 3217$ (m), 2925 (s), 2855 (s), 2113 (s), 1716 (s), 1692 (s), 1462 (m), 1352 (m), 1228 (s), 1111 (s), 956 (s), 756 (m), 628 (m).
<b>MALDI</b>	$m/z$ 585.0 [M + Na] <sup>+</sup> (M = 585.3068 berechnet für C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub> S + Na).
<b>ESI-MS</b>	$m/z$ 585.3063 [M + Na] <sup>+</sup> (M = 585.3068 berechnet für C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub> S + Na).

**Amino- $\omega$ -(undec-10-enyl)-hexaethylenglycol (74), H<sub>2</sub>NEG<sub>6</sub>C<sub>9</sub>CH=CH<sub>2</sub>**

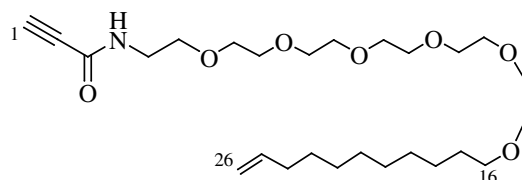
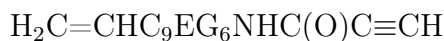


2.20 g (4.790 mmol) des terminalen Azids **8** wurden in einer 24 ml einer 1:1 Mischung aus THF und Wasser gelöst. Es wurden 1.30 g (4.960 mmol) Triphenylphosphin zugegeben bei RT 3 d stark gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die wässrige Phase zweimal mit 200 ml einer 1:1-Mischung aus Diethylether und Cyclohexan und anschließend dreimal mit je 50 ml Essigester, Diethylether und Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaCl<sub>(aq)</sub> gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Lösungsmittel wurden *in vacuo* entfernt und das gelbe, amorphe Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM 1:20 → 1:10) gereinigt.

Ausbeute: 1.30 g (3.00 mmol, M = 433.34 g/mol) 63%.

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS): $\delta$ = 5.81 (ddt, $J$ = 6.66 Hz, $J$ = 10.16 Hz, $J$ = 16.88 Hz, 1H, H-22), 4.97 (m, 2H, H-23), 3.66 (m, 18H, 2 (H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11)), 3.58 (m, 2H, 2 H-12), 3.51 (t, $J$ = 5.12 Hz, 2H, 2 H-13), 3.43 (t, $J$ = 6.81 Hz, 2H, 2 H-2), 2.86 (t, $J$ = 5.23 Hz, 2H, 2 H-1), 2.03 (m $\approx$ dd, $J$ = 6.73 Hz, $J$ = 14.36 Hz, 2H, 2 H-21), 1.52 (m, 4H, 2 H-14, 2 H-20), 1.28 (m, 10H, 2 (H-15, H-16, H-17, H-18, H-19)).
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(125 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS): $\delta$ = 139.00 (C-22), 113.96 (C-23), 71.34 (C-13), 70.45-69.88 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12), 33.62 (C-1), 29.51-28.74 (C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21), 25.91.
<b>IR</b>	$\tilde{\nu}$ = 3372 (br), 2925 (s), 2856 (s), 1640 (w), 1590 (w), 1438 (s), 1350 (w), 1300 (w), 1182 (m), 1119 (s), 1037 (s), 996 (w), 750 (w), 722 (s), 696 (s), 542 (s).
<b>MALDI</b>	$m/z$ 434.5 [M] <sup>+</sup> (M = 433.34 berechnet für C <sub>23</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>6</sub> ); $m/z$ 456.5 [M + Na] <sup>+</sup> (M = 456.32 berechnet für C <sub>23</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>6</sub> + Na).
<b>ESI-MS</b>	$m/z$ 434.3474 [M + H] <sup>+</sup> (M = 434.3476 berechnet für C <sub>23</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>6</sub> + H).

**Propiolsäure- $\omega$ -(undec-10-enyl)-hexaethylenglycolamid (75),**

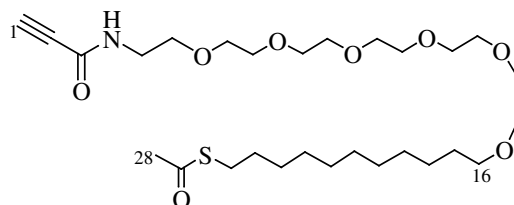


0.18 ml (2.924 mmol) Propiolsäure wurden bei 0 °C unter Argonatmosphäre in eine Lösung aus 740 mg (3.59 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 19.5 ml abs. Dichlormethan gegeben. Nach 10 min Rühren wurden 1.267 g (2.924 mmol) des Amins **74**, gelöst in 7 ml Dichlormethan, zuge tropft. Zunächst wurde der Ansatz für 1 h bei 0 °C gerührt, dann auf RT erwärmt und weitere 2 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie (MeOH/DCM 1:20) gereinigt und ergab einen farblosen, amorphen Feststoff.

Ausbeute: 1.20 g (2.471 mmol, M = 485.65 g/mol) 70 %.

- <sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 6.99 (br, 1H, NH), 5.81(ddt,  $J$  = 6.69 Hz,  $J$  = 10.18 Hz,  $J$  = 16.94 Hz, 1H, H-25), 4.96 (m, 2H, 2 H-26), 3.66 (m, 22H, 2 (H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-13, H-14)), 3.50 (m, 2H, 2 H-15), 3.44 (t,  $J$  = 6.82 Hz, 2H, 2 H-16), 2.85 (s, 1H, H-1), 2.04 (m  $\approx$  q,  $J$  = 6.78 Hz, 2H, 2 H-24), 1.57 (m, 2H, 2 H-17), 1.37 (m, 2H, 2 H-23), 1.28 (m, 10H, 2 (H-18, H-19, H-20, H-21, H-22)).
- <sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 152.23 (C-3), 139.19 (C-25), 114.07 (C-26), 73.21 (C-2), 71.51 (C-1), 70.58-69.24 (C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16), 39.58 (C-4), 33.76 (C-24), 29.58-28.88 (C-17, C-18, C-19, C-20, C-21, C-22, C-23), 26.04.
- IR**  $\tilde{\nu}$  = 3324 (m), 2926 (s), 2850 (s), 2108 (m), 1226 (s), 1573 (w), 1467 (w), 1436 (w), 1346 (w), 1242 (m), 1116 (s), 962 (w), 893 (w), 843 (w), 640 (m), 542 (m), 417 (w).
- CI-MS**  $m/z$  485 (0.5), 391 (7.43), 280 (2.49).
- ESI-MS**  $m/z$  508.3319 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 508.3245 berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>7</sub> + Na).

**Propiolsäure- $\omega$ -(11-acetylthio-undecanyl)-hexaethylenglycolamid (76),**  
 AcSC<sub>11</sub>EG<sub>6</sub>NHC(O)C $\equiv$ CH



200 mg (0.421 mmol) des Alkins **75** wurden gemäß AAV 3 in 3 ml abs. THF gelöst und unter Schutzgas mit 60  $\mu$ l Thioessigsäure versehen. Unmittelbar vor dem Start einer dreistündigen UV-Beleuchtung wurden 66.4 mg (0.421 mmol) AIBN zu der gerührten Reaktionsmischung gegeben. Zum Quenchen wurden 2 ml Dichlorethan zugegeben und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das bräunliche Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (MeOH/DCM 1:20) aufgereinigt und ergab ein gelbes Öl. Ausbeute: 0.192 g (0.342 mmol, M = 561.77 g/mol) 83%.

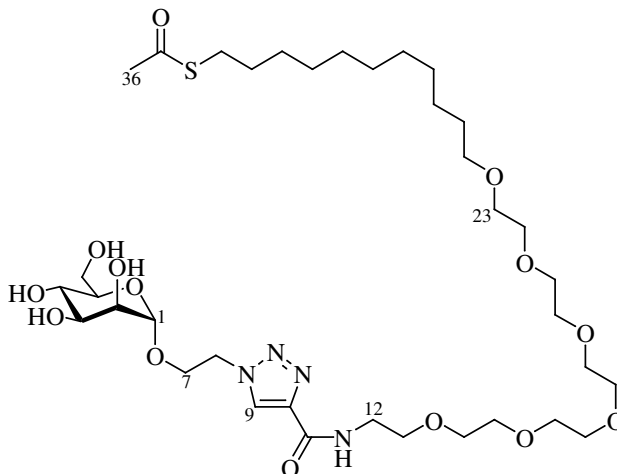




- <sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 8.44 (s, 1H, H-9), 5.84 (ddt,  $J$  = 6.80 Hz,  $J$  = 10.18 Hz,  $J$  = 16.98 Hz, 1H, H-33), 4.97 (m, 2H, 2 H-34), 4.78 (m  $\approx$  s, 1H, H-1), 4.73 (m, 2H, 2 H-8), 4.19 (m, 1H, H-7), 3.95 (m<sub>c</sub>, 2H, H-6, H-7'), 3.88 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-12), 3.82 (dd,  $J$  = 2.30 Hz,  $J$  = 11.77 Hz, 1H, H-2), 3.78 (m<sub>c</sub>, 2H, H-3, H-6'), 3.68 (m<sub>c</sub>, 20H, 2 (H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23)), 3.63 (m, 2H, H-4, H-5), 3.51 (t,  $J$  = 6.70 Hz, 2H, 2 H-13), 3.46 (t,  $J$  = 4.95 Hz, 2H, 2 H-24), 2.01 (m  $\approx$  q, 2H, 2 H-32), 1.61 (m, 2H, 2 H-25), 1.35 (m, 12H, 2 (H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31)).
- <sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 162.67 (C-11), 143.87 (C-10), 140.12 (C-33), 127.78 (C-9), 114.70 (C-34), [101.78 + 101.70]\* (C-1), [75.00 + 74.84]\* (C-5), [72.44 + 72.41]\* (C-3), 72.37 (C-24), [72.02 + 71.84]\* (C-2), 71.37-71.26 (-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-), [68.51 + 68.34]\* (C-4), [62.84 + 62.77]\* (C-6), [51.74 + 51.45]\* (C-8), 40.03, 34.86, 30.66-30.09 (CH<sub>2</sub>), 27.16. \*Wegen der Amidisomerie wurde in Messung bei RT der doppelte Signalsatz erhalten. Die exakte Differenzierung der EG<sub>6</sub> sowie der C<sub>11</sub>-Signale ist nicht möglich.
- MALDI**  $m/z$  733.5 [M<sup>+</sup>] (M = 734.9 berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub>);  $m/z$  757.4 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 757.4 berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub> + Na).
- ESI-MS**  $m/z$  735.4383 [M + H]<sup>+</sup> (M = 735.4386 berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub> + H);  $m/z$  757.4234 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 757.4206 berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub> + Na).

**4-[2-( $\alpha$ -D-Mannopyranosyloxy)-ethyl]-1-[O- $\{\omega$ -(11-acetylthioundecyl)-hexaethylenglycol}]carbamoyl]-1H[1,2,3]triazol (78),**

ManC<sub>2</sub>-triazol-C(O)NHEG<sub>6</sub>C<sub>11</sub>SAc



70.0 mg (0.095 mmol) des Alkens **77** wurden in 1 ml THF gelöst und 34  $\mu$ l (0.478 mmol) Thioessigsäure sowie 20 mg (0.124 mmol) AIBN wurden zugegeben. Die gerührte Reaktionsmischung wurde bei RT 5 h mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurden die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH:DCM 1:18) an Kieselgel gereinigt.

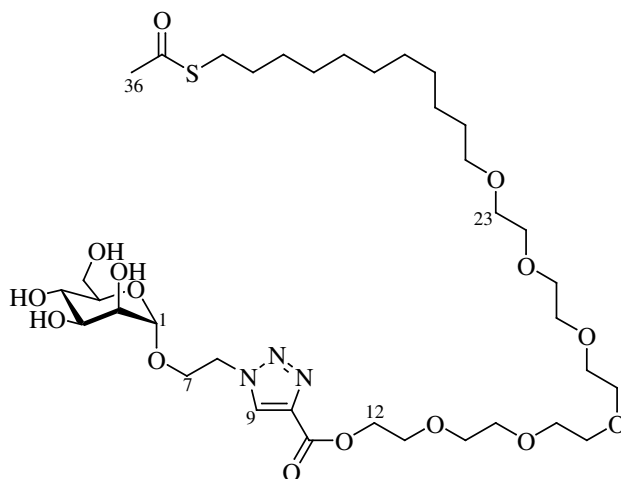
Ausbeute: 22.0 mg (0.027 mmol, M = 810.99 g/mol) 40 %.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 8.29 (s, 1H, H-9), 4.64 (m  $\approx$  s, 1H, H-1), 4.59 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-8), 4.05 (m<sub>c</sub>, 1H, H-7), 3.81 (m<sub>c</sub>, 2H, H-6, H-7'), 3.74 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-12), 3.69 (dd,  $J$  = 2.43 Hz,  $J$  = 11.79 Hz, 1H, H-2), 3.64 (m<sub>c</sub>, 2H, H-3, H-6'), 3.54 (m<sub>c</sub>, 20H, 2 (H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23)), 3.53 (m, 2H, H-4, H-5), 3.36 (t,  $J$  = 6.65 Hz, 2H, 2 H-13), 3.32 (t,  $J$  = 4.95 Hz, 2H, 2 H-24), 2.75 (t,  $J$  = 7.29 Hz, 2H, 2 H-34), 2.21 (s, 3H, 2 H-36), 1.45 (m, 4H, 2 H-25, 2 H-33), 1.20 (m, 12H, 2 (H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 197.61 (C-35), 162.65 (C-11), 143.85 (C-10), 127.80 (C-9), [101.78 + 101.69]\* (C-1), [75.03 + 74.88]\* (C-5), [72.39 + 72.36]\* (C-3), 71.84 (C-24), [71.44 + 71.30]\* (C-2), 71.06-70.60 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ), 68.31 (C-4), 62.78 (C-6), [51.71 + 51.42]\* (C-8), 40.05, 30.76-29.79 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 27.19. \*Wegen der Amidisomerie wurde in Messung bei RT der doppelte Signalsatz erhalten. Die exakte Differenzierung der EG<sub>6</sub> sowie der C<sub>11</sub>-Signale ist nicht möglich.

**ESI-MS**  $m/z$  735.4383 [M + H]<sup>+</sup> (M = 735.4386 calculated for C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub> + H);  $m/z$  757.4234 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 757.4206 calculated for C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub> + Na).

4-[2-( $\alpha$ -D-Mannopyranosyloxy)-ethyl]-1-[O- $\{\omega$ -(11-acetylthio-undecyl)-hexaethylenglycolyl}carbonyl]-1H[1,2,3]triazol (**80**), ManC<sub>2</sub>-triazol-C(O)OEG<sub>6</sub>C<sub>11</sub>SAc



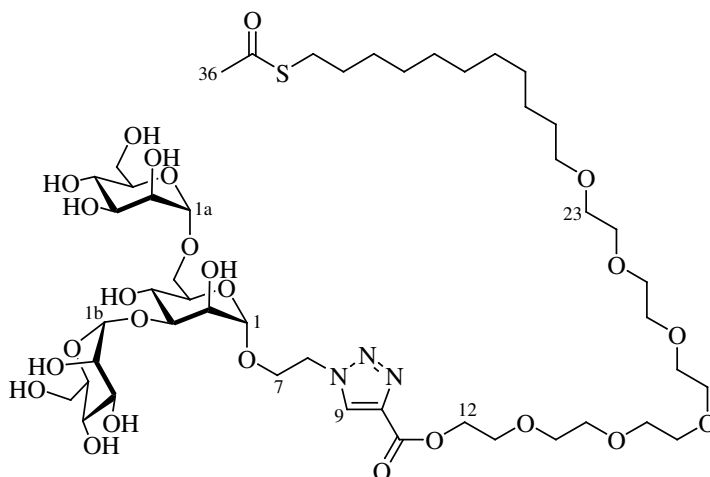
186 mg (0.331 mmol) des Alkins **73** und 74.9 mg (0.300 mmol) Azidoethylmannosid **33** wurden in 2 ml einer 1:1-Mischung aus Acetonitril und Methanol gelöst. Die Lösung wurde entgast und mit Stickstoff gespült bevor 57.2 mg (0.300 mmol) Kupfer(I)iodid und 68  $\mu$ l DIPEA zugegeben wurden und der Ansatz bei RT für 1.5 h gerührt wurde. Die bräunliche Suspension wurde durch einen Spritzenfilter gegeben und das grünliche Filtrat bei reduziertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde mit 3 ml Essigester und 1.5 ml 1 M wässriger ammoniakalischer Lösung aufgenommen und je dreimal mit EE und DCM extrahiert, bevor die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurden. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (MeOH/DCM 1:20  $\rightarrow$  1:1) gereinigt und ergab ein farbloses Öl.

Ausbeute: 108.5 mg (0.134 mmol, M = 811.98 g/mol) 45 %.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 4.78 (m  $\approx$  d,  $J$  = 1.58 Hz, 1H, H-1), 4.75 (m, 2H, 2 H-8), 4.51 (m, 2H, 2 H-12), 4.20 (m, 1H, H-7), 3.96 (m, 1H, 2 H-7'), 3.88 (m, 2H, 2 H-13), 3.82 (dd,  $J$  = 2.36,  $J$  = 14.11, 2H, 2 H-6), 3.77 (m, 1H, H-2), 3.74 (m, 2H, H-3, H-6'), 3.67 (m<sub>c</sub>, 20H, 2 (H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23)), 3.61 (m<sub>c</sub>, 2H, H-4, H-5), 3.51 (t,  $J$  = 6.45 Hz, 2H, 2 H-24), 2.90 (t,  $J$  = 7.30 Hz, 2H, 2 H-34), 2.34 (s, 3H, 3 H-36), 3.60 (m, 4H, 2 H-25, 2 H-33), 1.34 (m<sub>c</sub>, 14H, 2 (H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32)).

- <sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 197.64 (C-35), 161.87 (C-11), 140.52 (C-19), 130.45 (C-9), 101.71 (C-1), 75.02 (C-5), 72.46 (C-3), 72.37 (C-24), 71.84 (C-2), 71.53-70.01 (C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21, C-22, C-23), 71.05 (C-3), 68.32 (C-4), 66.51 (C-7), 65.28 (C-12), 62.79 (C-6), 51.57 (C-8), 30.74-29.85 (C-25, C-26, C-27, C-28, C-29, C-30, C-31, C-32, C-33), 30.55 (C-36), 29.77 (C-34), 27.15.
- ESI-MS**  $m/z$  834.4094 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 834.5 berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>65</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub>S + Na).

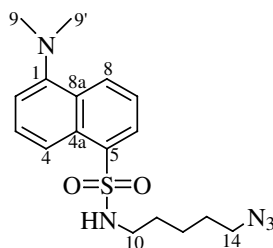
**2-(3,6-di-*O*- $\alpha$ -D-Mannopyranosyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy)-ethyl]-1-[*O*-{ $\omega$ -(11-acetylthio-undecyl)-hexaethylglycolyl}carbonyl]-1*H*[1,2,3]triazol (81)**



80 mg (0.140 mmol) des Azids **79** und 78.5 mg (0.140 mmol) des Alkins **73** wurden in 0.75 ml abs. MeOH gelöst. Anschließend wurden 0.75 ml abs. DMF zugegeben und die klare Lösung entgast, bevor 5.3 mg (0.028 mmol) CuI zugegeben wurden. Der Ansatz wurde über Nacht bei 45 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung filtriert und die Lösungsmittel wurden bei reduziertem Druck abrotiert. Das gelbliche Rohprodukt wurde per GPC an Sephadex LH-20 mit Methanol als Eluens gereinigt und ergab nach Entfernung des Lösungsmittels einen farblosen, amorphen Feststoff. Ausbeute: 110.0 mg (0.097 mmol, M = 1135.26 g/mol) 70 %.

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, TMS): $\delta = 5.09$ (m $\approx$ d, 1H, H-1*), 4.83 (m $\approx$ d, 1H, H-1*), 4.75 (m $\approx$ d, 1H, H-1*), 4.35 (m, 2H, 2 H-8), 4.16 (m, 1H, H-2*), 4.01 (m, 2H, 2 H-2*), 3.91 (m <sub>c</sub> , 7H, 3 H-6, 3 H-6', H-7), 3.77-3.62 (m, 34H, 3 (H-3, H-4, H-5), 2 (H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23)), 3.50 (t, $J = 6.60$ Hz, 2H, 2 H-24), 2.90 (t, $J = 7.24$ Hz, 2H, 2 H-34), 2.34 (s, 3H, 3 H-36), 1.59 (m, 4H, 2 H-25, 2 H-33), 1.34 (m <sub>c</sub> , 14H, 2 (H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32)).
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(75 MHz, CD <sub>3</sub> OD, TMS): $\delta = 197.60$ (C-35), 161.93 (C-11), 140.50 (C-10); 130.63 (C-9), 103.82 (C-1*), 101.76 (C-1*), 101.37 (C-1*), 80.27 (1°), 74.88 (C-5*), 74.32 (C-5*), 73.79 (C-5*), 72.58 (C-3*), 72.45 (C-3*), 72.34 (2°), 72.05 (1°), 71.54-71.14 (-CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> -), 70.00 (2°), 68.76 (C-4*), 68.54 (C-4*), 67.10 (2°), 66.69 (2°), 65.31 (2°), 62.91 (1°), 51.59 (2°), 30.75-29.89 (CH <sub>2</sub> ), 30.52 (C-36), 27.20. *Die Signale konnten nicht eindeutig den jeweiligen Ringprotonen zugeordnet werden.
<b>MALDI</b>	$m/z$ 1135.6 [M] <sup>+</sup> (M = 1135.5 berechnet für C <sub>48</sub> H <sub>85</sub> N <sub>3</sub> O <sub>25</sub> S); $m/z$ 1158.3 [M + Na] <sup>+</sup> (M = 1158.5 berechnet für C <sub>48</sub> H <sub>85</sub> N <sub>3</sub> O <sub>25</sub> S + Na); $m/z$ 1174.6 [M + K] <sup>+</sup> (M = 1174.6 berechnet für C <sub>48</sub> H <sub>85</sub> N <sub>3</sub> O <sub>25</sub> S + K).
<b>ESI-MS</b>	$m/z$ 1158.5091 [M + Na] <sup>+</sup> (M = 1158.5085 berechnet für C <sub>48</sub> H <sub>85</sub> N <sub>3</sub> O <sub>25</sub> S + Na).
<b>Drehwert</b>	$[\alpha]_D^{23} = +41.2^\circ$ (c = 1.0, MeOH)

### Dansylcadaverinazid (87)



Zunächst wurde das Triflylazid hergestellt: 0.18 mg (2.70 mmol) Natriumazid wurden bei 0 °C in 0.45 ml *aqua dem.* gelöst und 0.75 ml DCM wurden zugegeben. 93  $\mu$ l (0.550 mmol) Triflylanhydrid wurden zugegeben und der Ansatz wurde 2 h gerührt, bevor die Phasen getrennt wurden. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 0.5 ml DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden dann mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3(aq)</sub> gewaschen.

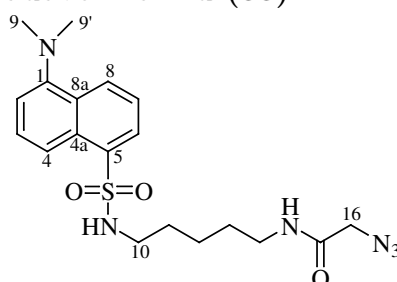
100.0 mg (0.30 mmol) Dansylcadaverin, 58.0 mg (0.42 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 70.0 mg (0.280 mmol) CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O wurden in 0.9 ml *aqua dem.* und 1.8 ml Methanol gelöst. Die Triflylazid-Lösung wurde zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über

Nacht bei 45 C gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die organische Phase abgetrennt und mit 2 M HCl angesäuert. Die wässrige Phase wurde mit 10 ml H<sub>2</sub>O verdünnt, ebenfalls mit verdünnter HCl angesäuert und danach sechs mal mit 5 ml EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Es wurde ein farbloses, fluoreszentes Öl erhalten, was ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden konnte.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 8.55 (d  $\approx$  t,  $J$  = 8.52 Hz, 1H, H-6), 8.30 (d  $\approx$  t,  $J$  = 8.67 Hz, 1H, H-8), 8.25 (d,  $J$  = 7.31 Hz, 1H, H-7), 7.55 (m<sub>c</sub>, 2H, H-3, H-4), 7.20 (d,  $J$  = 7.61 Hz, 1H, H-2), 6.00 (s, 1H, NH), 3.10 (t,  $J$  = 6.87 Hz, 2H, 2 H-10), 2.94 (m, 8H, 3 H-9, 3 H-9', 2 H-14), 1.4 (m<sub>c</sub>, 4H, 2 H-11, 2 H-13), 1.2 (m, 2H, 2 H-12).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 151.83 (C-1), 134.47 (C-5), 130.46 (C-8), 129.76 (C-4a), 129.69 (C-3), 129.51 (C-8a), 128.43 (C-7), 123.25 (C-6), 118.66 (C-4), 115.24 (C-2), 51.02 (C-14), 45.41 (C-9, C-9'), 42.94 (C-10), 28.98 (C-11), 28.12 (C-13), 23.47 (C-12).

### Azidoessigsäure-dansylcadaverinamid (88)

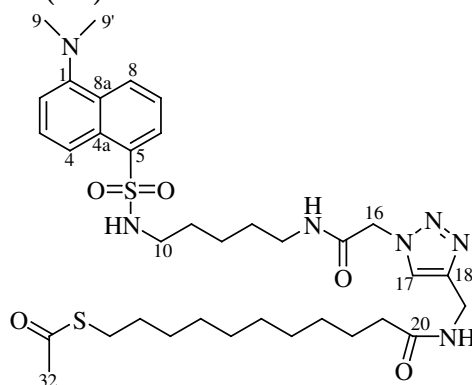


137 mg (1.355 mmol) Azidoessigsäure **68**, 280 mg (1.355 mmol) DCC und 183.1 mg (1.355 mmol) HOBT wurden in 6 ml abs. DCM gelöst und auf 0°C gekühlt. Zu der gerührten Lösung wurden langsam 500 mg (1.490 mmol) Dansylcadaverin in 4 ml abs. DCM gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über 10 min auf RT erwärmt und über Nacht gerührt. Zum Quenchen des Ansatzes wurde 10 ml *aqua dem.* zugegeben und 10 min gerührt, bevor die wässrige Phase viermal mit Dichlormethan extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Kochsalzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und ergaben nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* einen gelben, fluoreszierenden Feststoff. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (EE/CH 1:1 → 2:1) und ergab ein fluoreszentes, hochviskoses Öl. Die Detektion der Fraktionen erfolgte ausschließlich durch UV-Bestrahlung.

Ausbeute: 523.0 mg (1.250 mmol, M = 418.51 g/mol) 92%.

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS): $\delta$ = 8.55 (d, $J$ = 8.52 Hz, 1H, H-8), 8.29 (d, $J$ = 8.63 Hz, 1H, H-6), 8.24 (dd, $J$ = 1.15 Hz, $J$ = 7.27 Hz, 1H, H-7), 7.55 (m, 2H, H-3, H-4), 7.20 (d, $J$ = 7.50 Hz, 1H, H-2), 6.27 (br, 1H, SO <sub>2</sub> NH), 7.45 (m $\approx$ t, $J$ = 6.14 Hz, 1H, CONH), 3.97 (s, 2H, 2H-16), 3.15 (q, $J$ = 6.79 Hz, 2H, 2 H-14), 2.90 (m, 8H, 3 H-9, 3 H-9', 2 H-10), 1.39 (m <sub>c</sub> , 4H, 2 H-11, H-13), 1.25 (m <sub>c</sub> , 2H, 2H-12).
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(125 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS): $\delta$ = 166.65 (C-15), 152.10 (C-1), 134.74 (C-5), 130.45 (C-8), 129.93 (C-4a), 129.68 (C-8a), 129.65 (C-6), 128.43 (C-3), 123.25 (C-7), 118.70 (C-4), 115.23 (C-2), 52.74 (C-16), 45.44 (C-9), 42.93 (C-10), 38.95 (C-14), 28.92 (C-11), 28.71 (C-13), 23.34 (C-12).
<b>IR</b>	$\tilde{\nu}$ = 3310 (br), 2938 (s), 2863 (m), 2789 (w), 2106 (s), 1661 (s), 1575 (m), 1538 (m), 1455 (m), 1355 (w), 1314 (s), 1201 (w), 1160 (s), 1144 (s), 1074 (m), 912 (w), 792 (s), 732 (s), 683 (w), 626 (s), 571 (s).
<b>EI-MS</b>	$m/z$ 418.2 ([M + H] <sup>+</sup> , 58.56), 390.2 (10.75), 361.2 (5.61), 171.1 (100.00).
<b>ESI-MS</b>	$m/z$ 441.1439 [M + H] <sup>+</sup> (M = 441.1683 berechnet für C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S + H).
<b>HR-MS</b>	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S = M <sup>+</sup> berechnet: $m/z$ 418.17855 gefunden: 418.17871.

***N*-(Dansylcadaverin-ethylcarbamoyl-1*H*-[1,2,3]triazol-4-yl)-methyl-11-acetylthio-undecansäureamid (89)**



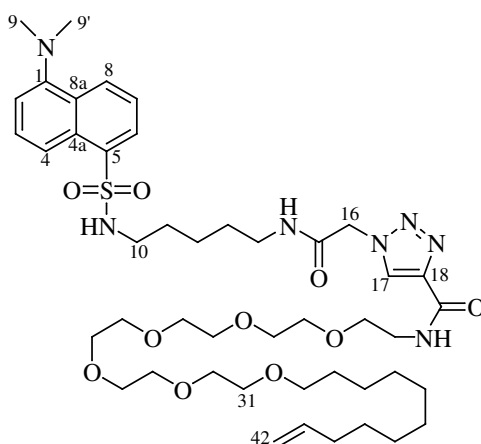
60.0 mg (0.187 mmol) des Alkins **54** wurden gemäß AAV 2 mit 100 mg (0.239 mmol) des Azids **88** in 1 ml Acetonitril gekoppelt. Es wurden 18 mg (0.095 mmol) Kupfer(I)-iodid nach Entgasen der Reaktionsmischung zugegeben und in die gerührte Suspension bei RT langsam 21  $\mu$ l (0.121 mmol) DIPEA gespritzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 45 °C gerührt, bevor das Lösemittel bei reduziertem Druck entfernt wurde und das Rohprodukt säulenchromatographisch (EE/CH 4:1  $\rightarrow$  MeOH/DCM 1:20) gereinigt wurde.

Ausbeute: 112.8 mg (0.158 mmol, M = 715.34 g/mol) 84 %.



- <sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 8.51 (d,  $J$  = 8.47 Hz, 1H, H-8), 8.30 (d,  $J$  = 8.63 Hz, 1H, H-4), 8.18 (d,  $J$  = 7.26 Hz, 1H, H-6), 7.90 (s, 1H, H-17), 7.49 (m<sub>c</sub>, 2H, H-3, H-7), 7.15 (d,  $J$  = 7.53 Hz, 1H, H-2), 7.11 (br, 1H, C-15NH), 6.99 (br, 1H, C-20NH), 6.12 (m ≈ t,  $J$  = 5.64 Hz, 1H, SO<sub>2</sub>NH), 5.15 (s, 2H, 2 H-16), 4.54 (m ≈ t,  $J$  = 5.43 Hz, 2H, 2 H-19), 3.13 (m, 2H, 2 H-14), 2.87 (s, 6H, 3 H-9, 3 H-9'), 2.84 (m ≈ t,  $J$  = 7.40 Hz, 4H, 2 H-10, 2 H-30), 2.31 (s, 3H, 3 H-32), 2.13 (m ≈ t,  $J$  = 7.50 Hz, 2H, 2 H-21), 1.51 (m<sub>c</sub>, 6H, 2 H-11, 2 H-13, 2 H-22), 1.36 (m<sub>c</sub>, 4 H, 2 H-12, 2 H-23), 1.18 (m<sub>c</sub>, 12H, 2 (H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29)).
- <sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 196.13 (C-31), 173.95 (C-20), 165.47 (C-15), 151.87 (C-1), 145.46 (C-18), 134.81 (C-5), 130.28 (C-6), 129.83 (C-4a), 129.56 (C-8a), 129.27 (C-8), 128.33 (C-3), 124.80 (C-17), 123.16 (C-7), 118.92 (C-4), 115.25 (C-2), 53.05 (C-16), 45.39 (C-9, C-9'), 42.73 (C-10), 39.23 (C-14), 36.41 (C-21), 34.73 (C-19), 30.63 (C-32), 29.67-29.12 (C-13, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28), 29.05 (C-30), 28.76 (C-23), 28.60 (C-29), 28.19 (C-13), 25.57 (C-22), 23.23s (C-12).
- IR**  $\tilde{\nu}$  = 3297 (s), 3081 (w), 2921 (s), 2849 (s), 1692 (s), 1668 (s), 1634 (s), 1549 (s), 1446 (s), 1418 (m), 1354 (w), 1319 (m), 1261 (m), 1232 (m), 1201 (w), 1184 (w), 1143 (s), 1058 (m), 947 (w), 785 (s), 682 (m), 628 (s), 570 (s).
- ESI-MS**  $m/z$  738.3398 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 738.3443 berechnet für C<sub>35</sub>H<sub>53</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub> + Na);  $m/z$  1453.6950 [2 M + Na]<sup>+</sup> (M = 1453.6898 berechnet für das Dimer (C<sub>35</sub>H<sub>53</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>) + Na).

Dansylcadaverin-ethylcarbamoyl-1*H*-[1,2,3]triazol-4-yl-methylcarbamoyl- $\omega$ -(undec-10-en)-hexaethylenglycol (90)



Diese Cycloaddition wurde gemäß AAV 2 durchgeführt mit 75.3 mg (0.155 mmol) des Azids **88** und 56 mg (0.155 mmol) des Alkins **75**. Es wurden 1 ml eines 1:1-Gemisches aus abs. DMF und MeOH als Lösungsmittel und 6 mg (0.030 mmol) Kupfer(I)iodid verwendet. Nachdem die Reaktionsmischung bei 45 °C über Nacht gerührt wurde, wurde die Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (EE/CH 4:1 → MeOH/DCM 1:20). Die Detektion der Fraktionen erfolgte ausschließlich durch UV-Bestrahlung.

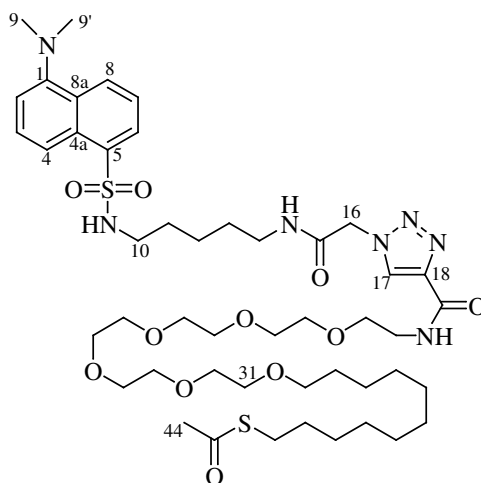
Ausbeute: 73.6 mg (81.4  $\mu$ mol,  $M = 904.168$  g/mol) 61 %.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 8.59$  (d,  $J = 8.52$  Hz, 1H, H-8), 8.42 (s, 1H, H-17), 8.39 (d,  $J = 8.69$  Hz, 1H, H-4), 8.23 (dd,  $J = 1.26$  Hz,  $J = 7.32$  Hz, 1H, H-6), 7.62 (m, 2H, H-3, H-7), 7.30 (d,  $J = 7.56$  Hz, 1H, H-2), 5.84 (ddt,  $J = 6.71$  Hz,  $J = 10.17$  Hz,  $J = 16.95$  Hz, 1H, H-41), 5.20 (s, 2H, 2 H-16), 5.00 (m, 2H, 2 H-42), 3.65 (m<sub>c</sub>, 24H, 2 (H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31)), 3.49 (t,  $J = 6.60$  Hz, 2H, 2 H-32), 3.06 (t,  $J = 6.74$  Hz, 2H, 2 H-14), 2.91 (s, 6H, 6 H-9), 2.88 (t,  $J = 6.77$  Hz, 2H, 2 H-10), 2.07 (m  $\approx$  q,  $J = 6.81$  Hz, 2H, 2 H-40), 1.50 (m<sub>c</sub>, 2H, 2 H-33), 1.34 (m<sub>c</sub>, 18H, 2 (H-11, H-12, H-13, H-34, H-35, H-36, H-37, H-38, H-39)).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 167.26$  (C-15), 162.51 (C-19), 153.19 (C-1), 143.86 (C-18), 140.15 (C-42), 137.18 (C-5), 131.19 (C-8), 131.10 (C-4a), 130.97 (C-8a), 130.17 (C-6), 129.07 (C-3), 128.84 (C-17), 124.33 (C-7), 120.60 (C-4), 116.43 (C-2), 114.73 (C-41), 72.36-70.53 (C-20, C-21, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28, C-29, C-30, C-31, C-32), 53.07 (C-16), 45.83 (C-9), 43.59 (C-10), 40.09 (C-14), 34.91 (C-40), 30.71-30.12 (C-33, C-34, C-35, C-36, C-37, C-38, C-39), 29.55 (C-11), 27.20 (C-13), 24.66 (C-12).

**ESI-MS**  $m/z$  926.5410  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $\text{M} = 926.5032$  berechnet für  $\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{S} + \text{Na}$ );  $m/z$  474.7723  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $\text{M} = 474.7516$  berechnet für das Dimer ( $\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{S} + \text{Na}$ )).

**Dansylcadaverin-ethylcarbamoyl-1*H*-[1,2,3]triazol-4-yl-methylcarbamoyl- $\omega$ -(11-acetylthio-undecyl)-hexaethylenglycol (91)**



Diese Cycloadition wurde gemäß AAV 2 durchgeführt mit 72 mg (0.128 mmol) des Alkins **76** und 53.6 mg (0.128 mmol) des Azids **88**, die bei RT zusammen mit 7.3 mg (0.038 mmol) Kupfer(I)iodid in 1.2 ml einer 1:1-Mischung aus abs. DMF und MeOH aufgeschlämmt wurden. Diese Suspension wurde zweimal entgast und mit Stickstoff gespült, bevor sie über Nacht bei 45 °C gerührt wurden. Danach wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand durch eine kurze säulenchromatographische Trennung (EE/CH 4:1  $\rightarrow$  MeOH/DCM1:20) an Kieselgel gereinigt, um einen amorphen, gelben Feststoff zu ergeben. Die Detektion der Fraktionen erfolgte ausschließlich durch UV-Bestrahlung.

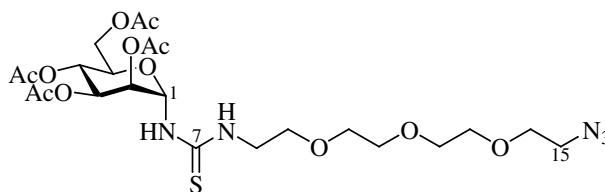
Ausbeute: 72.5 mg (75.5  $\mu\text{mol}$ ,  $\text{M} = 980.287$  g/mol) 59 %.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 8.59 (d,  $J$  = 8.52 Hz, 1H, H-8), 8.42 (s, 1H, H-17), 8.39 (d,  $J$  = 8.68 Hz, 1H, H-4), 8.22 (dd,  $J$  = 1.24 Hz,  $J$  = 7.30 Hz, 1H, H-6), 7.62 (m, 2H, H-3, H-7), 7.30 (d,  $J$  = 7.59 Hz, 1H, H-2), 5.19 (s, 2H, 2 H-16), 3.65 (m<sub>c</sub>, 24H, 2 (H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31)), 3.49 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H, 2 H-32), 3.07 (t,  $J$  = 6.98 Hz, 2H, 2 H-14), 2.93 (s, 6H, 6 H-9), 2.88 (m<sub>c</sub>, 4H, 2 H-10, 2 H-43), 2.33 (s, 3H, 3 H-44), 1.58 (m<sub>c</sub>, 4H, 2 H-33, 2 H-42), 1.33 (m<sub>c</sub>, 22H, 2 (H-11, H-12, H-13, H-34, H-35, H-36, H-37, H-38, H-39, H-40, H-41)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 197.62 (C-43), 167.23 (C-15), 162.49 (C-19), 153.21 (C-1), 143.89 (C-18), 137.21 (C-5), 131.22 (C-8), 131.10 (C-4a), 130.99 (C-8a), 130, 15 (C-6), 129.07 (C-3), 128.82 (C-17), 124.32 (C-7), 120.60 (C-4), 116.44 (C-2), 72.36-70.51 (C-20, C-21, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28, C-29, C-30, C-31, C-32), 53.11 (C-16), 45.83 (C-9), 43.62 (C-10), 40.43 (C-14), 40.12 (C-14), 30.74 (C-44), 30.72-29.77 (C-33, C-34, C-35, C-36, C-37, C-38, C-39, C-40, C-41, C-42, C-43)), 29.55 (C-11), 27.19 (C-13), 24.67 (C-12).

**ESI-MS**  $m/z$  1002.5463 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 1002.5015 berechnet für C<sub>47</sub>H<sub>77</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub> + Na).

### ***N*-(2,3,4,6-Tetraacetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-*N'*-( $\omega$ -azidotriethylenglycolthioharnstoff (92)**

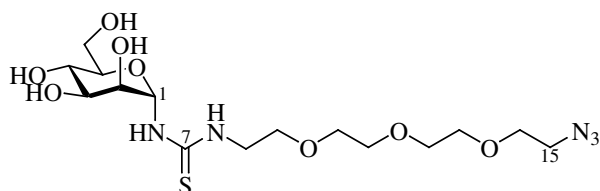


92 mg (0.236 mmol) 2,3,4,6-Tetraacetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosylisothiocyanat wurden in 2 ml abs. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt, bevor eine Lösung aus 44.6  $\mu$ l (0.225 mmol) N<sub>3</sub>EG<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> in 0.3 ml abs. DCM in die gerührte Reaktionsmischung gegeben wurde. Es wurde auf RT erwärmt und über Nacht gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das blaß-gelbe Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (EE/CH 2:1 → 4:1). Es wurde ein farbloser Schaum erhalten.

Ausbeute: 86.0 mg (0.141 mmol, M = 607.63 g/mol) 63 %.

- <sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, 300 K):  $\delta$  = 7.31 (br, 1H, C-7NH), 7.07 (br, 1H, C-1NH), 5.57 (br, 1H, H-1), 5.33 (m, 1H, H-2), 5.29 (m, 1H, H-4), 5.27 (m, 1H, H-4), 4.34 (dd,  $J$  = 5.28 Hz,  $J$  = 12.21 Hz, 1H, H-6), 4.14 (m, 1H, H-6'), 4.07 (br, 1H, 2 H-5), 3.82 (br, 2H, 2 H-8), 3.67 (m<sub>c</sub>, 12H, 2 (H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14)), 3.43 (m  $\approx$  t,  $J$  = 5.15 Hz, 2H, 2 H-15), 2.17 (s, 3H, 3 C(O)CH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, 3 C(O)CH<sub>3</sub>), 2.07 (s, 3H, 3 C(O)CH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, 3 C(O)CH<sub>3</sub>).
- <sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, 300 K):  $\delta$  = 183.82 (C-7), 170.59 (C=O), 169.99 (C=O), 169.85 (C=O), 169.59 (C=O), 80.46 (C-1), 70.60-69.87 (C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14), 69.55 (C-5), 68.85 (C-3), 68.49 (C-2), 66.07 (C-4), 62.03 (C-6), 50.64 (C-15), 45.31 (C-8), 20.99-20.60 (C(O)-CH<sub>3</sub>).
- IR**  $\tilde{\nu}$  = 3450 (w), 3338 (s), 3069 (w), 2872 (s), 2109 (s), 1741 (s), 1545 (s), 1437 (w), 1369 (m), 1230 (br), 1080 (br), 982 (m), 918 (m), 852 (w), 801 (w), 723 (m), 600 (m).
- ESI-MS**  $m/z$  630.2042 [M + Na]<sup>+</sup> (M = 630.2052 berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>S + Na).

***N*-( $\alpha$ -D-Mannopyranosyl)-*N*'-( $\omega$ -azidotriethylenglycol-thioharnstoff (93))**



86 mg (0.141 mmol) des geschützten Mannosids **92** wurden bei RT in 2.5 ml abs. Methanol gelöst, eine Spatelspitze Natriummethanolat wurde zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 30 min gerührt. Zum Quenchen wurden ca. 1 g gewaschenes Amberlite IR 120 (H<sup>+</sup>-Form) in das Reaktionsgemisch gegeben und weitere 30 min langsam gerührt. Anschließend wurde durch einen Spitzenfilter filtriert und das Filtrat *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt. Ausbeute: 58.0 mg (0.132 mmol, M = 439.49 g/mol) 93 %.

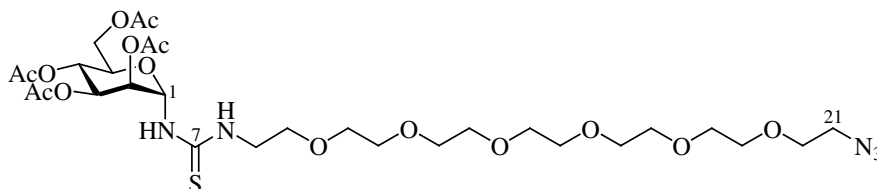
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 5.66 (br, 1H, H-1), 3.92 (m, 1H, H-2), 3.89 (m, 1H, H-6), 3.81 (m, 2H, H-3, H-6), 3.78 (m<sub>c</sub>, 15H, H-4, 2 (H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14)), 3.58 (m<sub>c</sub>, 1H, H-5), 3.42 (m  $\approx$  t, 2H, 2 H-15).

---

<b><math>^{13}\text{C-NMR}</math></b>	(75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ): $\delta = 184.71$ (C-7), 83.61 (C-1), 75.64 (C-5), 71.51 (C-3), 71.46 (C-2), 71.40-71.01 ( $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ ), 68.61 (C-4), 62.55 (C-6), 51.63 (C-15).
<b>IR</b>	$\tilde{\nu} = 3331$ (br), 2921 (s), 2872 (s), 2487 (br), 2205 (w), 2110 (s), 1549 (s), 1440 (m), 1345 (s), 1295 (m), 1110 (s), 1080 (s), 976 (m), 850 (w).
<b>ESI-MS</b>	$m/z$ 462.1674 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (M = 462.1629 berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_8\text{S} + \text{Na}$ ).

---

***N*-(2,3,4,6-Tetraacetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-*N'*-( $\omega$ -azidohexaethylenglycolthioharnstoff (94)**



300 mg (0.770 mmol) 2,3,4,6-Tetraacetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosylisothiocyanat wurden in 5 ml abs. DCM gelöst und auf 0 C gekühlt. Es wurden 257.1 mg (0.734 mmol) des Aminohexaethylenglycols, gelöst in 1 ml abs. DCM, langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde auf RT erwärmt und 3 h gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt und das gelbliche, ölige Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (EE/CH 1:4  $\rightarrow$  MeOH/EE 1:50). Es wurde ein farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 431.0 mg (0.583 mmol, M = 739.79 g/mol) 79 %.

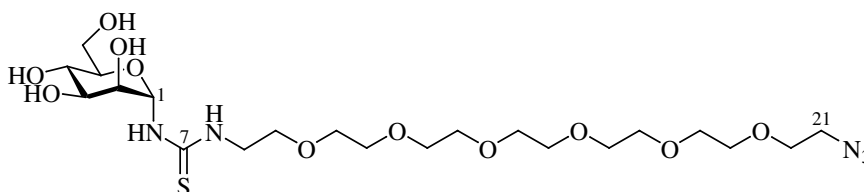
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta = 7.38$  (br, 1H, C-7NH), 7.31 (br, 1H, C-1NH), 5.83 (br, 1H, H-1), 5.28 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4.33 (dd,  $J = 5.20$  Hz,  $J = 12.20$  Hz, 1H, H-6), 4.13 (m, 2H, H-5, H-6'), 4.02 (br, 1H, H-8), 3.82 (br, 2H, H-8', H-9), 3.72 (m, 2H, H-7, H-9'), 3.70-3.65 (m, 23H, H-7', 2 (H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20)), 3.39 (t,  $J = 5.25$  Hz, 2H, 2 H-21), 2.16 (s, 3H, 3 C(O)CH<sub>3</sub>) 2.09 (s, 3H, 3 C(O)CH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 3H, 3 C(O)CH<sub>3</sub>), 2.02 (s, 3H, 3 C(O)CH<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta = 183.82$  (C-7), 171.10 (C=O), 170.66 (C=O), 169.87 (C=O), 169.44 (C=O), 80.27 (C-1), 70.60 (C-20), 70.54-69.94 ( $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ ), 69.40 (C-5), 69.00 (C-3), 68.78 (C-2), 66.38 (C-7), 62.16 (C-6), 50.63 (C-21), 45.21 (C-8), 20.99-20.60 (C(O)-CH<sub>3</sub>).

---

<b>IR</b>	$\tilde{\nu} = 3477$ (w), 3331 (m), 3068 (w), 2873 (s), 2110 (s), 1448 (s), 1544 (m), 1441 (w), 1371 (s), 1228 (br), 1110 (br), 982 (w), 941 (w), 850 (w), 734 (w), 601 (w).
<b>ESI-MS</b>	$m/z$ 762.2819 $[M + Na]^+$ (M = 762.2838 berechnet für $C_{29}H_{49}N_5O_{15}S + Na$ ).

---

***N*-( $\alpha$ -D-Mannopyranosyl)-*N*'-( $\omega$ -azidohexaethylenglycol-thioharnstoff (**95**))**

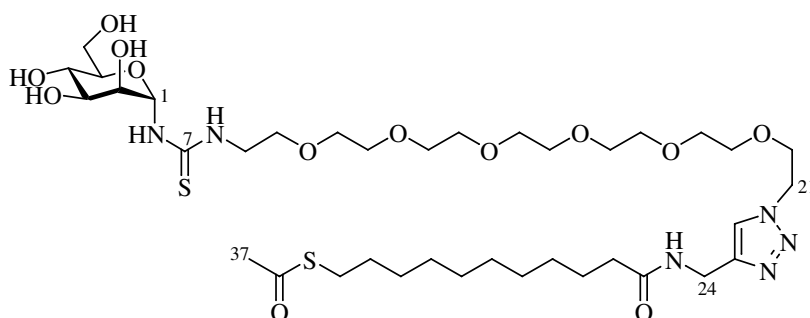
162 mg (0.219 mmol) des geschützten Mannosids **94** wurden bei RT in 2 ml abs. Methanol gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, eine Spatelspitze Natriummethanolat wurde zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 30 min gerührt und dabei auf RT erwärmt. Zum Quenchen wurden ca. 1 g gewaschenes Amberlite IR 120 (H<sup>+</sup>-Form) in das Reaktionsgemisch gegeben und weitere 30 min langsam gerührt. Anschließend wurde durch einen Spitzenfilter filtriert und das Filtrat *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ausbeute: 113.5 mg (0.199 mmol, M = 571.64 g/mol) 91 %.

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS): $\delta = 5.62$ (br, 1H, H-1), 3.92 (m, 1H, H-2), 3.88 (m, 1H, H-6), 3.74 (m, 2H, H-3, H-6), 3.72-3.69 (m <sub>c</sub> , 15H, H-4, 2 (H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20)), 3.58 (m <sub>c</sub> , 1H, H-5), 3.42 (m $\approx$ t, 2H, 2 H-21).
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(75 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta = 185.00$ (C-7), 83.75 (C-1), 75.61 (C-5), 71.56 (C-3), 71.39 (C-2), 71.30-71.13 ( $-\underline{C}H_2O\underline{C}H_2-$ ), 68.30 (C-4), 62.73 (C-6), 51.80 (C-15).
<b>ESI-MS</b>	$m/z$ 594.2490 $[M + Na]^+$ (M = 594.2416 berechnet für $C_{21}H_{41}N_5O_{11}S + Na$ ).

---

***N*-( $\alpha$ -D-Mannopyranosyl)-*N'*-{(hexaethylenglycolyl-1*H*[1,2,3]triazol-4-ylmethyl)-carbamoyl-(11-acetylthio-undecyl)}thioharnstoff (96)**



110 mg (0.192 mmol) des Azids **95** und 57.2 mg (0.192 mmol) des Alkins **54** wurden in 1.5 ml einer entgasten 1:1-Mischung aus Methanol und DMF gelöst und mit 7.3 mg (0.038 mmol) CuI versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 45 °C gerührt und anschließend filtriert. Nachdem die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt worden waren, wurde das hochviskose Öl säulenchromatographisch (MeOH:DCM 1:18  $\rightarrow$  1:5) an Kieselgel gereinigt.

Ausbeute: 130.0 mg (0.150 mmol,  $M = 869.10$  g/mol) 78 %.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS):  $\delta = 7.94$  (s, 1H, H-22), 5.60 (br, 1H, H-1), 4.59 (m  $\approx$  t, 2H, 2 H-21), 4.44 (s, 2H, 2 H-24), 3.90 (m  $\approx$  t, 3H, H-8, 2 H-20), 3.72 (m, 5H, H-2, H-3, H-4, H-6, H-8'), 3.65 (m<sub>c</sub>, 25H, 2 (H-6', H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19)), 3.41 (m  $\approx$  t, 1H, H-5), 2.86 (t,  $J = 7.18$  Hz, 2H, 2 H-35), 2.30 (s, 3H, 3 H-37), 2.22 (t,  $J = 7.29$  Hz, H-26), 1.58 (m<sub>c</sub>, 4H, 2 H-27, 2 H-37), 1.30 (m<sub>c</sub>, 12H, 2 (H-28, H-29, H-30, H-31, H-32, H-33)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS):  $\delta = 197.68$  (C-36), 184.81 (C-7), 176.15 (C-25), 146.14 (C-23), 125.07 (C-22), 83.71 (C-1), 75.90 (C-5), 72.48, 71.29 (C-3), 71.26 (C-2), 71.13-70.15 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ), 68.78 (C-4), 62.58 (C-6), 51.73, 45.51, 36.97, 35.57, 30.72-29.75 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ).

**ESI-MS**  $m/z$  891.4194 [M + Na]<sup>+</sup> ( $M = 891.4178$  berechnet für C<sub>37</sub>H<sub>68</sub>N<sub>6</sub>O<sub>13</sub>S<sub>2</sub> + Na).

**Drehwert**  $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +29.8^\circ$  ( $c = 1.0$ , MeOH)



# Literaturverzeichnis

- [1] G. R. Newkome, G. R. Baker, K. J. Young, J. G. Traynham *J. Polym. Sci. A*, **1993**, *31*, 641-651.
- [2] Th. K. Lindhorst in: *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [3] Th. K. Lindhorst *CiuZ*, **2000**, *43*, 38-52.
- [4] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer *Biochemie*, 5. Aufl., Spektrum, Heidelberg, **2003**.
- [5] A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth (eds.) *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, **1999**.
- [6] R. A. Dwek *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- [7] Th. K. Lindhorst *Antitumor and Antimicrobial Glycoconjugates* in: *Glycoscience, Chemistry and Chemical Biology* (B. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem, eds.) Springer, Berlin **2001**, *III*, 2393-2440.
- [8] A. Varki *Glycobiology*, **1993**, *3*, 97-130.
- [9] T. Feizi *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1992**, *246*, 766-770.
- [10] N. Sharon, H. Lis *FASEB J.*, **1990**, *4*, 3198-3208.
- [11] H. Rüdiger, P. Balding in: *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* (T. C. Bøg-Hansen, ed.) W.de Gruyter, Berlin, **1981**.
- [12] K. Drickamer, M. E. Taylor *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1993**, *9*, 237-264.
- [13] E. E. Simanek, G. J. McGarvey, J. A. Jablonowski, C. Wong *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 833-862.

- [14] A) H. Lis, N. Sharon *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 637-647; B) L. Evers, K. G. Rice *Glycoscience*, **2001**, 2, 1779-1816.
- [15] P. Sears, C.-H. Wong *Angew. Chem.*, **1999**, 111, 2446-2471; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 2300-2324.
- [16] A) H. Stillmark *Inaugural-Dissertation*, Schnackenburgs Buchdruckerei, Dorpat, **1888**. B) H. Stillmark *Arbeiten des pharmakologischen Instituts zu Dorpat* (R. Koch, ed.), Enke Verlag, Stuttgart, **1889**.
- [17] A) N. Sharon, H. Lis *Trends Biochem. Sci.*, **1987**, 12, 483-487; B) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=glyco.table.2263>.
- [18] Die Agglutination von Erythrozyten durch Klapperschlangengift wurde erstmals bereits 1860 beobachtet und der Wirkung von Lektinaktivität zugeschrieben, was noch nicht bewiesen werden konnte. Siehe hierzu: D. C. Kilpatrick *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, 1572, 187.
- [19] J. B. Sumner *J. Biol. Chem.*, **1919**, 37, 137-142.
- [20] H.-J. Gabius *Eur. J. Biochem.*, **1997**, 243, 543-576.
- [21] H. Rüdiger; H.-C. Siebert, D. Solis, J. Jimenez-Barbero, A. Romero, C.-W. von der Lieth, T. Diaz-Maurino, H.-J. Gabius *Curr. Med. Chem.*, **2000**, 7, 389-416.
- [22] T. K. Chowdhury, A. K. Weiss *Concanavalin A*, Plenum Press, New York, **1975**.
- [23] W. C. Boyd, E. Shapleigh *Science*, **1954**, 119, 419.
- [24] A) H.-J. Gabius, H.-C. Siebert, S. André, J. Jiménez-Barbero, H. Rüdiger *ChemBioChem*, **2004**, 5, 740-764; B) H.-J. Gabius *Eukaryotic Glycosylation and Lectins: Hardware of the Sugar Code (Glycocode) in Biological Information Transfer*, **2001**, <http://www.Eurekah.com>; C) <http://www.lectins.de/>.
- [25] C.-W. von der Lieth, M. Frank, Th. K. Lindhorst *Rev. Mol. Biotechnol.*, **2002**, 90, 311-337.
- [26] A) W. I. Weiss, K. Drickamer *Structure*, **1994**, 2, 1227-1240. B) K. Drickamer, W. I. Weiss *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 663-674.
- [27] [Http://ctld.glycob.ox.ac.uk/ctld/lectins.html](http://ctld.glycob.ox.ac.uk/ctld/lectins.html).
- [28] T. A. Yednock, S. D. Rosen *Adv. Immunol.*, **1989**, 4, 313-378.

- [29] L. Osborn *Cell*, **1990**, *62*, 3-6.
- [30] E. Larsen, A. Celi, G. E. Gilbert, B. C. Furie, J. K. Erban, R. Bonfanti, D. D. Wagner, B. Furie *Cell*, **1989**, *59*, 305-312.
- [31] T. A. Springer *Cell*, **1994**, *76*, 301-314.
- [32] T. Bosen, P. Falk, K. A. Roth, G. Larson, S. Nowak *Science*, **1993**, *262*, 1892-1895.
- [33] W. Weis, J. H. Brown, S. Cusack, J. C. Paulsen, J. J. Skehel, D. C. Wiley *Nature*, **1988**, *333*, 426-431.
- [34] M. Ambrosi, N. R. Cameron, B. G. Davis *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 1593-1608.
- [35] T. K. Ritter, C.-H. Wong *Angew. Chem.*, **2001**, *113* (19), 3616-3641; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40* (19), 3508-3533.
- [36] V. Y. Dudkin, M. Orlova, X. Geng, M. Mandal, W. C. Olson, S. J. Danishefsky *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 9560-9562.
- [37] A) M. Mandal, V. Y. Dudkin, X. Geng, S. J. Danishefsky *Angew. Chem.*, **2004**, *116*, 2611-2615; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 2557-2561; B) X. Geng, V. Y. Dudkin, M. Mandal, S. J. Danishefsky *Angew. Chem.*, **2004**, *116*, 2616-2619; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 2562-2565.
- [38] A) R. Roy, M.-G. Baek *Rev. Mol. Biotechnol.*, **2002**, *90*, 291-309. B) S. J. Danishefsky, J. R. Allen *Angew. Chem.*, **2000**, *112*, 882-912; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 836-863. C) S. Hakomori, Y. Zang *Chem. Biol.*, **1997**, *4*, 97-104. C) G. V. Glinko *Cancer Metastasis Rev.*, **1998**, *17*, 177-185.
- [39] M. K. Spassova, W. G. Bornmann, G. Ragupathi, G. Sukenick, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 3383-3395.
- [40] A. Kirschning *Nachr. Chemie*, **2005**, *53*, (03), 258-259.
- [41] Es gibt eine Reihe von Ausnahmen: Zum Beispiel bindet das arabinosebindende Protein Arabinose mit einer Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $0.098 \mu M$ : F. A. Quiocho *Biochem. Soc. Trans.*, **1993**, *21*, 442-448.
- [42] Y. C. Lee, R. T. Lee *Acc. Chem. Res.*, **1995**, *28*, 321-327.

- [43] J. J. Lundquist, E. J. Toone *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 555-578.
- [44] B. J. Houseman, M. Mrksich *Top. Curr. Chem.*, **2002**, *218*, 1-44.
- [45] Exzellente Beispiele und Übersichtsartikel sind: A) E. J. Gordon, W. J. Sanders, L. L. Kiessling *Nature*, **1998**, *392*, 30-31; B) J. Rao, J. Lahiri, L. Isaacs, R. M. Weiss, G. M. Whitesides *Science*, **1998**, *280*, 708-711; C) P. I. Kitov, J. M. Sadawska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle *Nature*, **2000**, *403*, 669-672; D) J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 14922-14933; E) E. K. Woller, E. D. Walter, J. R. Morgan, D. J. Singel, M. J. Cloninger *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 8820-8826.
- [46] M. B. Andrus, T. M. Turner, E. P. Updegraff, Z. E. Sauna, S. V. Ambudkar *Tet. Lett.*, **2001**, *42*, 3819-3822.
- [47] Beispiele finden sich für Dimere der Immunosuppressiva FK506 und Cyclosporin: G. R. Crabtree, S. L. Schreiber *Trends Biochem. Sci.*, **1996**, *21*, (11), 418-422; Vancomycin-Dimere: J. Rao, L. Yan, J. Lahiri, G. M. Whitesides, R. M. Weis, H. S. Warren *Chemistry & Biology*, **1999**, *6*, (6), 353-359; U. N. Sundram, J. H. Griffin *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 13107-13108; Dimere von Polysacchariden: M. Kanai, K. H. Mortell, L. L. Kiessling *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 9931-9932; M. Mammen, K. Helmersen, R. Kishore, S.-K. Choi, W. D. Phillips, G. M. Whitesides *Chemistry & Biology*, **1996**, *3*, (9), 757-763.
- [48] N. F. Burkhalter, S. M. Dimick, E. J. Toone Protein-Carbohydrate Interaction: Fundamental Considerations in: *Carbohydrates in Chemistry and Biology* (B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay, eds.), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, Part I, Vol. 2.
- [49] *Affinität* ist ein qualitativer Begriff, dessen quantitativer Bezug die *Affinitätskonstante* ist, die, streng betrachtet, die Assoziationskonstante K darstellt. Als *Avidität* wird die Assoziationskonstante einer polyvalenten Wechselwirkung bezeichnet.
- [50] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides *Angew. Chem.*, **1998**, *110*, 2908-2953; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2754-2794.
- [51] P. I. Kitov, D. R. Bundle *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 16271-16284.
- [52] J. Whelan *TIBS*, **1996**, *21*, (3), 65-69.

- [53] L. L. Kiessling, L. E. Strong, J. E. Gestwicki *Annu. Rep. Med. Chem.*, **2000**, *35*, 321-330.
- [54] R. Jelinek, S. Kolusheva *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 5987-6015.
- [55] S. A. W. Gruner, E. Locardi, E. Lohof, H. Kessler *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 491-514.
- [56] Th. K. Lindhorst *Top. Curr. Chem.*, **2002**, *218*, 201-235.
- [57] M. Köhn, J. M. Benito, C. O. Mellet, Th. K. Lindhorst, J. M. García Fernández *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 771-777.
- [58] M. Mrksich *Chem. Soc. Rev.*, **2000**, *29*, 267-273.
- [59] R. R. Seigel, P. Harder, R. Dahint, M. Grunze, F. Josse, M. Mrksich, G. M. Whitesides *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 3321-3328.
- [60] Eine andere vielfach untersuchte Anwendung sind Langmuir-Blodgett-Filme. Siehe hierzu: A. Ulman *An Introduction to Ultrathin Organic Films*, Academic Press, San Diego **1991**.
- [61] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 1103-1169.
- [62] K. Motesharei, D. C. Myles *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 7328-7336 und darin enthaltene Referenzen.
- [63] A) A. Ulman *Ultrathin Organic Films from Langmuir Blodgett to Self-Assembly*, Academic Press, New York, **1991**.
- [64] A) A. Ulman *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 1533-1554. Hierin finden sich folgende Verweise auf erfolgreich immobilisierte Monoschichten auf Siliziumdioxid: B) J. Sagiv *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 92-98; C) P. Silberzan, L. Léger, D. Ausserré, J. J. Benattar *Langmuir*, **1991**, *7*, 1647-1651; D) S. R. Wasserman, Y.-T. Tao, G. M. Whitesides *Langmuir*, **1989**, *5*, 1074-1087; E) J. D. Le Grange, J. L. Markham, C. R. Kurjian *Langmuir*, **1993**, *9*, 1749-1753; F) R. Maoz, J. Sagiv *J. Colloid Interface Sci.*, **1984**, *100*, 465-470; G) J. Gun, J. Sagiv *J. Colloid Interface Sci.*, **1986**, *112*, 457-472; Aluminiumoxid: H) J. Gun R. Iscovici, J. Sagiv *J. Colloid Interface Sci.*, **1984**, *101*, 201-213; I) N. Tillman, A. Ulman, J. S. Schildkraut, T. L. Penner *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 6136-6144; Quartz: J) S. Brandriss, S. Margel *Langmuir*, **1993**, *9*, 1232-1240; K) K. Mathauser,

- C. W. Frank *Langmuir*, **1993**, *9*, 3002-3008; L) K. Mathauser, C. W. Frank *Langmuir*, **1993**, *9*, 3446-3451; Glas: F); Glimmer: M) G. Carson, S. Granick *J. Appl. Polym. Sci.*, **1989**, *37*, 2767-2770; 7, 532-538; O) D. K. Schwartz, S. Steinberg, J. Israelachvili, Z. A. N. Zasadzinski *Phys. Rev. Lett.*, **1992**, *69*, 3354-3357; Zinkselenid: siehe F) und H); Germaniumoxid: siehe F).
- [65] S. Svedhem, C.-Å. Hollander, J. Shi, P. Konradsson, B. Liedberg, S. C. T. Svensson *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 4494-4503.
- [66] L. Li, S. Chen, S. Jiang *Langmuir*, **2003**, *19*, 2974-2982.
- [67] K. Feldman, G. Hähner, N. D. Spencer, P. Harder, M. Grunze *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 10134-10141.
- [68] D. J. Vanderah, C. W. Meuse, V. Silin, A. L. Plant *Langmuir*, **1998**, *1*, 6916-6923.
- [69] J. Su, M. Mrksich *Angew. Chem.*, **2002**, *114*, 4909-4912; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 4715-4718.
- [70] A) J. Su, M. Mrksich *Langmuir*, **2003**, *19*, 4867-4870. B) D.-H. Min, W.-S. Yeo, M. Mrksich *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 3923-3929.
- [71] Die erste Anwendung der Ellipsometrie ist bereits am Ende des 19. Jahrhunderts in Oberflächenuntersuchungen beschrieben: P. Drude *Ann. Phys. Chem.*, **1889**, *36*, 865-897.
- [72] Nähere Informationen können u. a. gefunden werden bei: A) H. R. Christen, F. Vögtle in *Organische Chemie – Von den Grundlagen zur Forschung* Band II, Salle, Frankfurt a. M., **1990**, S. 318 ff; B) Institut für Werkstoff- und Oberflächentechnologie, FH Kiel, <http://www.wpr.fh-kiel.de/service/ellipsometer/ellipso.htm>; C) H. Motschmann, R. Teppner *Novel methods to Study Interfacial Layers* (R. Miller, D. Moebius, eds.), Elsevier, **2001**.
- [73] T. Winkler *Dissertation in Vorbereitung*, Uni Hamburg.
- [74] B. Zeysing *Dissertation*, Uni Hamburg, **2004**. Elektronisch verfügbar unter: <http://www.chemie.uni-hamburg.de/bibliothek/diss2004.html>.
- [75] Z. Salamon, M. F. Brown, G. Tollin *Trends Biochem. Sci.*, **1999**, *24* (6), 213-219.
- [76] T. Weimar *Angew. Chem.*, **2000**, *112*, (7), 1271-1274; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, (7), 1219-1221.

- [77] J. D. Jackson *Klassische Elektrodynamik*, de Gruyter, Berlin **1983**.
- [78] M. Malmqvist *Nature*, **1993**, *361*, 186-187.
- [79] M. Mrksich, G. B. Sigal, G. M. Whitesides *Langmuir*, **1995**, *11*, 4383-4385.
- [80] [Http://w210.ub.uni-tuebingen.de/dbt/volltexte/2001/312/](http://w210.ub.uni-tuebingen.de/dbt/volltexte/2001/312/).
- [81] Das Meßsignal wird typischerweise in resonance units (1 RU = 1 pg/mm<sup>2</sup>) angegeben.
- [82] A. C. Malmborg in: *Real-time analysis of biomolecular interactions - applications of BIACORE* (K. Nagata, H. Handa, eds.) Springer-Verlag, Tokyo, **2000**.
- [83] P. B. Q. Garland *Rev. Biophys.*, **1996**, *29*, 91-117.
- [84] E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling, R. M. Corn *J. Am. Chem. Soc.*, **2003** *125*, 6140-6148.
- [85] R. Salzer, G. Steiner *Nachr. Chemie*, **2004**, *52*, (7/8), 809-811.
- [86] R. R. Seigel, P. Harder, R. Dahint, M. Grunze, F. Josse, M. Mrksich, G. M. Whitesides *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 3321-3328.
- [87] W. Norde *J. Colloids Surf.*, **1989**, *38*, 1-13.
- [88] K. L. Prime, G. M. Whitesides *Science*, **1991**, *252*, 1164-1167.
- [89] K. L. Prime, G. M. Whitesides *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 10714-10721.
- [90] J. Benesch, S. Svedhem, S. C. T. Svensson, R. Valiokas, B. Liedberg, P. Tengvall *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **2001**, *12*, 581-597.
- [91] S. Zalipsky *Bioconjugate Chem.*, **1995**, *6*, 150-165.
- [92] K. Lim, J. N. Herron, in: *Poly(Ethylen Glycol) Chemistry* (J. M. Harris, ed.) S. 29 ff, Plenum Press, New York, **1992**.
- [93] G. R. Newkome, K. K. Kotta, A. Mishra, C. N. Moorefield *Macromol.*, **2004**, *37*, 8262-8268.
- [94] F. E. Bailey, J. V. Koleske in: *Poly(ethylene oxide)*, Academic Press, New York, **1976**.

- [95] K. Bergström, K. Holmberg, A. Safranji, A. S. Hoffmann, M. J. Egdell, B. A. Hovanes, J. M. Harris *J. Biomed. Mater. Res.*, **1992**, 26 (6), 779-790.
- [96] S. Nagaoka, Y. Takiuchi, K. Yokota, H. Tanzawa, S. Nishiumi in: *Polymers as Biomaterials: Molecular Modelling – Applications and Principles* (S. W. Shalaby, A. S. Hoffmann, B. D. Ratner, T. A. Horbett, eds.) S. 361 ff, Plenum Press, New York, **1985**.
- [97] Neuere Untersuchungen haben diese Annahme wieder in Frage gestellt, indem die konformellen Freiheitsgrade der OEG-Ketten durch Packungskräfte innerhalb des SAM eingeschränkt wurden. Außerdem sind Proteinadsorptionscharakteristika offenbar stark substratabhängig. Siehe dazu: P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides, P. E. Laibinis *J. Phys. Chem. B*, **1998**, 102, 426-436.
- [98] R. Breinbauer, M. Köhn *ChemBioChem*, **2003**, 4, 1147-1149.
- [99] G. T. Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [100] Pieters *et al.* haben in diesem Zusammenhang den Begriff der *Bioorthogonalität* geprägt. Siehe dazu: L. Ballell, K. J. Alink, M. Slijper, C. Versluis, R. M. J. Liskamp, R. J. Pieters *ChemBioChem*, **2005**, 6, 291-295.
- [101] H. C. Hang, C. R. Bertozzi *Acc. Chem. Res.*, **2001**, 34, 727-736.
- [102] R. Huisgen in: *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry* (A. Padwa, ed.), Wiley, New York, **1984**, 1-176.
- [103] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless *Angew. Chem.*, **2002**, 114, 2708-2711; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2596-2599.
- [104] A) R. Huisgen *Angew. Chem.*, **1963**, 75, 604-637; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1963**, 2, 565-598. B) R. Huisgen *Angew. Chem.*, **1963**, 75, 742-754; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1963**, 2, 633-645.
- [105] A) K. V. Gothelf, K. A. Jorgensen *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 863-909. B) J. Mulzer *Org. Synth. Highlights*, **1991**, 77-95.
- [106] A. R. Katritzky, Y. Zhang, S. K. Singh *Heterocycles*, **2003**, 60, 1225-1239.
- [107] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless *Angew. Chem.*, **2001**, 113, 2056-2075; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004-2021.



- [108] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3057-3064.
- [109] *Science*, **2001**, *291* (5512), 2337-2376.
- [110] E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle *Synthesis*, **1978**, *2*, 155-158.
- [111] G. R. Newkome, Z. Q. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 2003-2004.
- [112] D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith *Polym. J.*, **1985**, *17*, 117-132.
- [113] N. Röckendorf, Th. K. Lindhorst *Top. Curr. Chem.*, **2001**, *217*, 201-238.
- [114] O. Renaudet, P. Dumy *Org. Lett.*, **2003**, *5*, (3), 243-246.
- [115] P. Dumy, I. M. Eggelston, S. Cervigni, U. Sila, X. Sun, M. Mutter *Tett. Lett.*, **1995**, *36*, 1255-1258.
- [116] S. Peluso, T. Rückle, C. Lehmann, M. Mutter, C. Peggion, M. Crisma *ChemBioChem*, **2001**, *2*, 432-437.
- [117] M. Mrksich *Chem. Soc. Rev.*, **2000**, *29*, 267-273.
- [118] A) R. Roy *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **1996**, *6*, 692-702. B) D. Zanini, R. Roy *Bioconjugate Chem.*, **1997**, *8*, 187-192.
- [119] D. A. Fulton, J. F. Stoddart *Bioconjugate Chem.*, **2001**, *12*, 655-672.
- [120] S.-I. Nishimura, Y. C. Lee Synthetic Glycopolymers: New Tools for Glycobiology in: *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, (S. Dumitriu, ed.) Marcel Dekker, New York, **1998**.
- [121] A) R. Roy The Chemistry of Neoglycoconjugates in: *Carbohydrate Chemistry*, (G. J. Boons, ed.) Chapman and Hall, Glasgow **1994**. B) R. Roy *Top. Curr. Chem.*, **1997**, *187*, 241-274. C) J. Kadokawa, H. Tagaya, K. Chiba *Synlett*, **1999**, 1845-1856.
- [122] A) T. Kunitake *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1992**, *31*, 709-726. B) P. Boullanger *Top. Curr. Chem.*, *187*, 276-.
- [123] Y. C. Lee, R. T. Lee *Neoglycoconjugates: Preparation and Applications*, Academic Press, San Diego, **1994**.

- [124] A. Mulder, J. Huskens, D. N. Reinhoudt *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 3409-3424.
- [125] A) P. H. Seeberger, W.-C. Haase *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 4349-4393. B) R. Liang, L. Yan, J. Loebach, M. Ge, Y. Uozumi, K. Sekanina, N. Horan, J. Gildersleeve, C. Thompson, A. Smith, K. Biswas, W. C. Still, D. Kahne *Science*, **1996**, 274, 1520-1522.
- [126] D. Barnes-Seeman, S. B. Park, A. N. Koehler, S. L. Schreiber *Angew. Chem.*, **2003**, 115, (21), 2478-2481; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, (21), 2376-2379.
- [127] B. Schweitzer, S. Roberts, B. Grimwade, W. Shao, M. Wang, Q. Fu, Q. Shu, I. Laroche, Z. Zhou, V. T. Tchernev, J. Christiansen, M. Velleca, S. F. Kingsmore *Nat. Biotech.*, **2002**, 20, 359-356.
- [128] H. Jehle, H. Eickhoff *Nachr. Chemie*, **2004**, 52 (7/8), 870-871.
- [129] M. C. Pirrung *Angew. Chem.*, **2002**, 114, 326-341; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 1276-1289.
- [130] A) M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vohringer, T. O. Joos *Trends Biotechnol.*, **2002**, 20, 160-166. B) D. S. Wilson, S. Nock *Angew. Chem.*, **2003**, 115, 510-517; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 494-500.
- [131] S. P. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas *Science*, **1991**, 251, 767-773.
- [132] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown *Science*, **1995**, 270, 467-470.
- [133] K. R. Love, P. H. Seeberger *Angew. Chem.*, **2002**, 114, (19), 3733-3736; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, (19), 3583-3586 und darin enthaltene Referenzen.
- [134] M. Köhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schröder, L. Soullère, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann *Angew. Chem.*, **2003**, 115, 6010-6014; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 5830-5834.
- [135] N. Kanoh, S. Kumashiro, S. Simizu, Y. Kondoh, S. Hatakeyama, H. Tashiro, H. Osada *Angew. Chem.*, **2003**, 115, 5742-5745; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 5584-5587.
- [136] Im Aufsatz von H. Waldmann *et al.*<sup>[134]</sup> finden sich folgende Verweise: Immobilisierung von Wirkstoffmolekülen mit Sulfanyl-Funktionen: A) G. MacBeath,

- A. N. Koehler, S. L. Schreiber *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 7967–7968; mit Hydroxy-Funktionen: B) P. J. Hergenrother, K. M. Depew, S. L. Schreiber *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 7849–7850; mit Oxim-Bildung: C) J. R. Falsey, M. Renil, S. Park, S. Li, K. S. Lam *Bioconjugate Chem.*, **2001**, *12*, 346–353; durch Hybridisierung von PNA-Markern: D) N. Winssinger, J. L. Harris, B. J. Backes, P. G. Schultz *Angew. Chem.*, **2001**, *113*, 3254–3258; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 3152–3155; E) N. Winssinger, S. Ficarro, P. G. Schultz, J. L. Harris *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11139–11144; F) F. G. Kuruvilla, A. F. Shamji, S. M. Sternson, P. J. Hergenrother, S. L. Schreiber, *Nature*, **2002**, *416*, 653–657; Kohlenhydrat-Arrays: G) D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang *Nat. Biotechnol.*, **2002**, *20*, 275–281; H) S. Fukui, T. Feizi, C. Galustian, A. M. Lawson, W. G. Chai *Nat. Biotechnol.*, **2002**, *20*, 1001–1017; I) B. T. Houseman, M. Mrksich, *Chem. Biol.*, **2002**, *9*, 275–281; Peptid-Arrays: J) C. M. Salisbury, D. J. Maly, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 14868–14870; K) Q. Zhu, M. Uttamchandani, D. Li, M. L. Leasaicherre, S. Q. Yao, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 1257–1260; Immobilisierung von schwach aciden Wirkstoffmolekülen: L) D. Barnes-Seeman, S. B. Park, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.*, **2003**, *115*, 2478–2481; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 2376–2379.
- [137] J. J. La Clair, M. D. Burkart *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 3244–3249.
- [138] K.-I. Kasai, Y. J. Oda *J. Chromatogr.*, **1986**, *376*, 33–47.
- [139] D. C. Schriemer, D. R. Bundle, L. Li, O. Hindsgaul *Angew. Chem.*, **1998**, *110*, 3625–3628; *Angew. Chem.*, **1998**, *37*, 3383–3387.
- [140] B. T. Houseman, M. Mrksich *Chem. & Biol.*, **2002**, *9*, 443–454.
- [141] Eine andere bekannte Methode nutzt die natürliche Affinität von Streptavidin (auf einer Polystyroloberfläche immobilisiert) und Biotin, das über einen Linker mit verschiedenen Rezeptoren funktionalisiert werden kann. Siehe hierzu auch: M. Wilchek, E. A. Bayer *Anal. Biochem.*, **1988**, *171* (1), 1–32.
- [142] E. Engvall, P. Perlmann *Immunochemistry*, **1971**, *8*, 871.
- [143] K. Holmberg, K. Bergström, M.-B. Stark in: *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry* (J. M. Harris, ed.) S. 303 ff, Plenum Press, New York, **1992**.
- [144] F. Lottspeich, H. Zorbas *Bioanalytik*, S. 98 ff, Spektrum, Heidelberg, **1998**.

- [145] A. Voller, D. E. Bidwell in: *Alternative Immunoassays* (W. P. Collins, ed.), Chapter 6, Wiley, New York, **1985**.
- [146] C. Ge, W. Yu, C. Li, N. Wang, N. Gu *Science in China, Series B: Chemistry*, **2004**, *47*, (2), 134-141.
- [147] K. Drickamer, M. E. Taylor *Genome Biol.*, **2002**, *3*, 1034.1-1034.4.
- [148] D. M. Ratner, E. W. Adams, J. Su, B. R. O'Keefe, M. Mrksich, P. H. Seeberger *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 379-383.
- [149] SciFinder-Recherche, Februar 2005.
- [150] C. Pale-Grosdemange, E. S. Simon, K. L. Prime, G. M. Whitesides *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113* (1), 12-20.
- [151] M. Zwahlen, S. Herrwerth, W. Eck, M. Grunze, G. Hähner *Langmuir*, **2003**, *19*, 9305-9310.
- [152] P. I. Kitov, C. Railton, D. R. Bundle *Carb. Res.*, **1998**, *307*, 361-369.
- [153] S. Svedhem, L. Öhberg, S. Borrelli, R. Valiokas, M. Andersson, S. Oscarson, S. C. T. Svensson, B. Liedberg, P. Konradsson *Langmuir*, **2002**, *18*, 2848-2858.
- [154] J. M. de la Fuente, A. G. Barrientos, T. C. Rojas, J. Rojo, J. Cañada, A. Fernández, S. Penadés *Angew. Chem.*, **2001**, *113*, 2317-2321; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2257-2261.
- [155] J. Rojo, V. Díaz, J. M. de la Fuente, I. Segura, A. G. Barrientos, H. H. Riese, A. Bernad, S. Penadés *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 291-297.
- [156] B. Nolting, J.-J. Yu, G.-y. Liu, S.-J. Cho, S. Kauzlarich, J. Gervay-Hague *Langmuir*, **2003**, *19*, 6465-6473.
- [157] E. Katz, E. Willner *Angew. Chem.*, **2004**, *116*, 6166-6235; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6042-6108.
- [158] M. Mrksich, C. S. Chen, Y. Xia, L. E. Dike, D. E. Ingber, G. M. Whitesides *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *93*, (20), 10775-10778.
- [159] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides *Langmuir*, **2001**, *17*, 5605-5620.

- [160] R. Valiokas, S. Svedhem, S. C. T. Svensson, B. Liedberg *Langmuir*, **1999**, *15*, 3390-3394.
- [161] L. Yan, C. Marzolin, A. Terfort, G. M. Whitesides *Langmuir*, **1999**, *13*, 6704-6712.
- [162] J. Lahiri, L. Isaacs, J. Tien, G. M. Whitesides *Anal. Chem.*, **1999**, *77*, 777-790.
- [163] B. T. Houseman, E. S. Gawalt, M. Mrksich *Langmuir*, **2003**, *19*, 1522-1531.
- [164] T. A. Eberspacher, J. P. Collman, C. E. D. Chidsey, D. L. Donohue, H. Van Ryswyk *Langmuir*, **2003**, *19*, 3814-3821.
- [165] J. K. Lee, Y. S. Chi, I. S. Choi *Langmuir*, **2004**, *20*, 3844-3847.
- [166] J. P. Collman, N. K. Devaraj, C. E. D. Chidsey *Langmuir*, **2004**, *20*, 1051-1053.
- [167] Th. Lummerstorfer, H. Hoffmann *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 3963-3966.
- [168] G. Ramachandraiah, N. R. Chandra, A. Surolia, M. Vijayan *Glycobiology*, **2003**, *13*, (11), 765-775.
- [169] R. A. Bryce, I. H. Hillier, J. H. Naismith *Biophys. J.*, **2001**, *81*, 1373-1388.
- [170] V. P. Raut, M. A. Agashe, S. J. Stuart, R. A. Latour *Langmuir*, **2005**, *21*, 1629-1639.
- [171] H. C. Kolb, K. B. Sharpless *Drug Discovery Today*, **2003**, *24*, (8), 1128-1137.
- [172] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C.-H. Wong *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 14397-14402.
- [173] F. Pérez-Balderas, M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernández-Mateo, F. G. Calvo-Flores, J. A. Calvo-Asín, J. Isac-García, F. Santoyo-González *Org. Lett.*, **2003**, *5*, (11), 1951-1954.
- [174] P. Wu, A. K. Feldman, A. K. Nugent, C. J. Hawker, A. Scheel, B. Voit, J. Pyun, J. M. J. Fréchet, K. B. Sharpless, V. V. Fokin *Angew. Chem.*, **2004**, *116*, 4018-4022; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 3928-3932.
- [175] T. S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 609-612.
- [176] M. Kleinert, N. Röckendorf, Th. K. Lindhorst *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, *18*, 3931-3940.

- [177] A) A. Giannis, Universität Leipzig, persönliche Mitteilung; B) R. Mazitschek, M. Mülbaier, A. Giannis *Angew. Chem.*, **2002**, *114*, 4216-4218; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 4059-4061.
- [178] M. Frigerio, M. Santagostino, S. Sputore *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 4537-4538.
- [179] J. Katajisto, T. Karskela, P. Heinonen, H. Lönnberg *J. Org. Chem.*, **2002**, *69*, (23), 7995-8001.
- [180] G. V. S. Reddy, G. V. Rao, R. V. K. Subramanyam, D. S. Iyengar *Synth. Comm.*, **2000**, *30*, (12), 2233-2237.
- [181] P. L. Anelli, L. Lattuada, F. Uggeri *Synth. Comm.*, **1998**, *28*, (1), 109-117.
- [182] J. Hartung, S. Hünig, R. Kneuer, M. Schwarz, H. Wenner *Synthesis*, **1997**, *12*, 1433-1438.
- [183] P. Bitha, T. W. Strohmeyer, Z. Li, Y.-I. Lin *Synth. Comm.*, **2000**, *30*, 1233-1238.
- [184] Etwa ein Jahr später veröffentlichten PENADÉS *et al.* die Synthese dieses Bausteins. In dieser Publikation wird das Thiol zum Disulfid oxidiert und anschließend zum Aufbau von Gold Glyconanopartikeln eingesetzt: Á. G. Barrientos, J. M. de la Fuente, T. C. Rojas, A. Fernández, S. Penadés *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 1909-1921.
- [185] P. Fischer, C. Schmidt, H. Finkelmann *Macromol. Rapid Comm.*, **1995**, *16*, (6), 435-447.
- [186] C. K. Jin, H. J. Jeong, M. K. Kim, J. Y. Kim, Y.-J. Yoon, S.-G. Lee *Synlett*, **2001**, *12*, 1956-1958.
- [187] M. J. Pfammatter, V. Siljegovic, T. Darbre, R. Keese *Helv. Chim. Acta*, **2001**, *84*, 678-689.
- [188] N. Röckendorf, O. Sperling, Th. K. Lindhorst *Austr. J. Chem.*, **2002**, *55*, 87-93.
- [189] A) N. Firon, I. Ofek, N. Sharon *Infect. Immun.*, **1984**, *43*, 1088-1090; B) C.-C. Lin, Y.-C. Yeh, C.-Y. Yang, C.-L. Chen, G.-F. Chen, C.-C. Chen, Y.-C. Wu *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 3508-3509.
- [190] Th. K. Lindhorst, M. Dubber, U. Krallmann-Wenzel, S. Ehlers *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, *11*, 2027-2034.

- [191] A. K. Horst, S. Kötter, Th. K. Lindhorst, A. Ludwig, E. Brandt, C. Wagener *Med. Microbiol. Immunol.*, **2001**, *190*, 145-149.
- [192] P. T. Vanhooren, E. J. Vandamme *J. Chem. Tech. Biotech.*, **1999**, *74*, 479-497.
- [193] L. Lucka, M. Fernando, D. Grunow, C. Kannicht, A. K. Horst, P. Nollau, and C. Wagener *Glycobiology*, **2005**, *15*, 87-100.
- [194] J. Dahmen, T. Frejd, G. Grönberg, T. Lave, G. Magnusson, G. Noori, *Carbohydr. Res.*, **1983**, *116*, 303-307.
- [195] Th. K. Lindhorst, S. Kötter, U. Krallmann-Wenzel, S. Ehlers, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2001**, 823-831.
- [196] G. R. Newkome, R. K. Behera, C. N. Moorefield, G. R. Baker *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 7162-7167.
- [197] Dissertation S. Kötter, Universität Hamburg, **2000**. Elektronisch verfügbar unter: <http://www.chemie.uni-hamburg.de/bibliothek/diss2000.html>.
- [198] Dissertation N. Röckendorf, Universität Kiel, **2003**. Elektronisch verfügbar unter: [http://e-diss.uni-kiel.de/diss\\_909/](http://e-diss.uni-kiel.de/diss_909/).
- [199] T. Ray *Handbook of Reagents for Organic Synthesis – Activating Agents and Protecting Groups* (A. J. Pearson, W. J. Roush, eds.) Wiley, Weinheim, **1999**, 243 und enthaltene Referenzen.
- [200] A) W. K. C. Park, S. J. Meunier, D. Zanini, R. Roy *Carbohydrate Letters*, **1995**, *1*, 179-184; B) S. J. Meunier, Q. Wu, S.-N. Wang, R. Roy *Can. J. Chem.*, **1997**, *75*, (11), 1472-1482.
- [201] T. Gartiser, C. Selve, J.-J. Delpuech *Tet. Lett.*, **1983**, *24*, (15), 1609-1610.
- [202] Dieses Molekül wurde in einer zweistufigen Synthese durch Tosylierung von Hexaethylenglycol (TosCl, DABCO, EA, 0 °C → RT, 30 min, 85 %) und anschließende nukleophile Substitution (NaN<sub>3</sub>, TBAI, DMF, 70 °C, 4 h, 82 %) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.
- [203] S. G. Alvarez, M. T. Alvarez *Synthesis*, **1997**, *4*, 413-414.
- [204] L. G. Green, The Scipps Research Institute, La Jolla, persönliche Mitteilung.

- [205] W. L. Mock, T. A. Irra, J. P. Wepsiec, M. Adhya *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 5302-5308.
- [206] W. L. Mock *Top. Curr. Chem.*, **1995**, *175*, 1-24.
- [207] C. Meschke, Dissertation, Duisburg **2001**. Elektronisch verfügbar unter: <http://www.ub.uni-duisburg.de/ETD-db/theses/available/duett-06082001-095729/unrestricted/>.
- [208] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 3192-3193.
- [209] Für den motivierten und engagierten Einsatz bei dem „Click“-Optimierungsansatz sei der Schwerpunktpraktikantin NINA SCHWALB ausdrücklich gedankt.
- [210] M. Moore, P. Norris *Tet. Lett.*, **1998**, *39*, 7027-7030.
- [211] K. Banert, M. Hagedorn *Angew. Chem.*, **1989**, *101*, 1710-1711; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1989**, *28*, 1675-1676.
- [212] J. M. Dyke, A. P. Groves, A. Morris, J. S. Ogden, A. A. Dias, A. M. S. Oliveira, M. L. Costa, M. T. Barros, M. H. Cabral, A. M. C. Moutinho *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 6883-6887.
- [213] Dissertation Stephan Laabs, FU Berlin, **2001**. Elektronisch verfügbar unter: <http://www.diss.fu-berlin.de/2001/116>.
- [214] P. B. Alper, S.-C. Wong *Tet. Lett.*, **1996**, *37*, 6029-6032.
- [215] J. T. Lundquist, J. C. Pelletier *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 781-783.
- [216] P. T. Nyffeler, C.-H. Liang, K. M. Koeller, C.-H. Wong *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 10773-10778.
- [217] P. Siemsen, R. C. Livingston, F. Diederich *Angew. Chem.*, **2000**, *112*, 2740-2776; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 2632-2657.
- [218] Es sind auch andere hochspezifisch bindende Proteine für dieses Trimannosid bekannt. Siehe z. B. P. Bonay, R. Molina, M. Fresno *Glycobiology*, **2001**, *11*, (9), 719-729.
- [219] H. Paulsen, F. Reck, I. Brockhausen *Carbohydr. Res.*, **1992**, *236*, 39-71.



- [220] B. Becker, R. H. Furneaux, F. Reck, O. A. Zubkov *Carbohydr. Res.*, **1999**, *315*, 148-158.
- [221] K. Döge, Diplomarbeit, Kiel **2003**.
- [222] A. J. Link, D. A. Tirrell *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 11164-11165.
- [223] M. Dubber, Th. K. Lindhorst *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 5275-5281.
- [224] W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radić, P R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, K. B. Sharpless *Angew. Chem.*, **2002**, *114*, 1095-1101; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 1053-1057.
- [225] W. Mier, B. Beijer, K. Graham, W. E. Hull *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 2543-2552.
- [226] X. Fun, C. Albermann, J. Jiang, J. Liao, C. Zhang, J. S. Thorson *Nature Biotech.*, **2003**, *21*, (12), 1467-1469.
- [227] M. Dubber, Dissertation, Hamburg **2001**. Elektronisch verfügbar unter: <http://www.chemie.uni-hamburg.de/bibliothek/diss2001.html>.
- [228] A. Cotté, B. Bader, J. Kuhlmann, H. Waldmann *Chem. Eur. J.*, **1999**, *5*, 922-936.
- [229] P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, D. L. Allara, Y.-T. Tao, A. N. Parikh, R. G. Nuzzo *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 7152-7167.
- [230] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y.-T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 321-335.
- [231] Th. K. Lindhorst, C. Kieburg *Synthesis*, **1995**, *10*, 1228-1230.
- [232] A) C. W. Extrand *Langmuir*, **2003**, *19*, 3793-3796; B) K. Abe, H. Takigudie, K. Tamada *Langmuir*, **2000**, *16*, 2394-2397; C) J. Lahann, S. Mitagori, T. N. Tran, H. Kaido *Science*, **299**, 371-374.
- [233] [Http://www.vectorlabs.com/products.asp?catID=58&locID=146](http://www.vectorlabs.com/products.asp?catID=58&locID=146).
- [234] J. H. Naismith, R. A. Field *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, (2), 972-976.
- [235] P. Geetha Rani, K. Bachhawat, S. Misquith, A. Surolia *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, (42), 29694-29698.

- [236] C. P. Swaminathan, N. Surolia, A. Surolia *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 5153-5159.
- [237] W. I. Weis, K. Drickamer *Annu. Rev. Biochem.*, **1996**, *65*, 441-473.
- [238] A) E. Fitches, S. D. Woodhouse, J. P. Edwards, J. A. Gatehouse *Journal of Insect Physiology*, **2001**, *47*, (7), 777-787; B) A. Barrea, Y. Bourneb, E. J. M. Van Damme, W. J. Peumans, P. Rougé *Biochimie*, **2001**, *83*, (7), 645-651; C) G. Hestera, C. Schubert-Wright *Journal of Molecular Biology*, **1996**, *262*, (4), 516-531; D) K. Saito, A. Misaki, I. J. Goldstein *Glycoconjugate Journal*, **1997**, *14*, (8), 889-896; E) E. Davidson, D. Stewart *Industrial Crops and Products*, **2004**, *19*, (2), 137-146.
- [239] N. Röckendorf, Th. K. Lindhorst *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 4441-4445.
- [240] W. Kern, S. Iwabuchi, H. Sato, V. Böhmer *Macromol. Chem.*, **1979**, *180*, (10), 2539-2542.
- [241] A) *Polymer Bulletin* (Berlin, Germany), **2001**, *46* (2-3), 123-130; B) *PCT Int. Appl.*, **1994**, 67 ff; C) *Tet. Lett.*, **1979**, *31*, 2933-2936; D) *J. Ind. Chem. Soc.*, **1973**, *50* (4), 290-292.
- [242] K. Yamashita, V. Janout, E. M. Bernard, D. Armstrong, S. L. Rege *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 6249-6253.

# Verzeichnis der Schemata

2.1	Triazolbildung zu 1,4- und 1,5-Regioisomeren . . . . .	28
2.2	Vorgeschlagener Mechanismus der Cu(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition . . . . .	30
5.1	Synthese des thiofunktionalisierten Alkyl-Spacers . . . . .	50
5.2	Fehlgeschlagene Oxidation der Hydroxyfunktion des C <sub>11</sub> EG <sub>6</sub> -Spacers	51
5.3	Strategien zur Synthese des EG <sub>6</sub> -Spacers . . . . .	53
5.4	Vergleich: Internes Amid <i>vs.</i> interner Ester . . . . .	55
5.5	Synthese des C <sub>11</sub> -Verdünnungsmoleküls . . . . .	56
5.6	Synthesen der C <sub>11</sub> EG <sub>6</sub> -Verdünnungsmoleküle . . . . .	57
5.7	Entschützung der Thiole . . . . .	58
5.8	Synthese des monomeren Aminofucosids . . . . .	59
5.9	Synthese des monomeren Aminomannosids . . . . .	60
5.10	Synthese der dendritischen Grundstruktur . . . . .	61
5.11	Synthese der Glycocluster . . . . .	62
5.12	Orthogonal geschützter $\alpha,\alpha$ -Bis(aminomethyl)- $\beta$ -alanin-Baustein . . .	64
5.13	Peptidkupplung über gemischtes Anhydrid . . . . .	65
5.14	Synthese der Glycoside mit $\omega$ -thiofunktionalisiertem Spacer . . . . .	66
5.15	Synthese der dendritischen Fucoside mit $\omega$ -thiofunktionalisiertem Spacer	67
5.16	Synthese der dendritischen Mannoside mit $\omega$ -thiofunktionalisiertem Spacer . . . . .	69
5.17	Synthese des thiofunktionalisierten Alkin-Spacers . . . . .	71
5.18	Synthese verschiedener 1,4-Triazole . . . . .	72
5.19	Kombinatorischer Ansatz zur Optimierung der Cycloaddition . . . . .	73
5.20	NMR-Analytik der beiden Triazol-Regioisomere . . . . .	76
5.21	Funktionsgruppenmodifizierungen für „Click“-Bausteine . . . . .	77
5.22	Synthese der Alkin-terminierten Trisäure . . . . .	78

5.23	Synthese eines thiofunktionalisierten SAM-Bausteins mit dendritischer Trisäure durch „Click-Chemie“ . . . . .	78
5.24	Synthese des EG <sub>6</sub> -Spacers mit „Click“-Terminus . . . . .	80
5.25	Synthese des Mannosid-tragenden Amid-Bausteins durch „Click“-Chemie	82
5.26	Synthese der monomeren und der dendritischen, EG <sub>6</sub> -tragenden Mannoside durch „Click-Chemie“ . . . . .	83
5.27	Synthese eines „click-baren“ Fluoreszenzmarkers aus Dansylcadaverin	85
5.28	Synthese der immobilisierbaren Fluoreszenzlabel durch „Click-Chemie“	86
5.29	Übersicht der zur Immobilisierung auf Gold oder Cycloaddition auf SAMs verwandten Moleküle . . . . .	88
5.30	Synthese der saccharidischen, EG <sub>n</sub> -haltigen Isothioharnstoffderivate .	97

# Verzeichnis der Abbildungen

1.1	Schematischer Aufbau eines SAM . . . . .	3
1.2	Nomenklaturbeispiel . . . . .	6
2.1	Schematischer Aufbau einer Zellwand. . . . .	11
2.2	ABO-Blutgruppensystem und dazugehörige Kohlenhydrat-Determinanten . . . . .	12
2.3	Con A-Tetramer . . . . .	13
2.4	a) Röntgenstruktur von MBP-A, b) CRD mit gebundenem Ca . . . . .	14
2.5	<i>Rolling</i> eines Leukozyten an der Gefäßwand . . . . .	15
2.6	Schematischer und molekularer Aufbau eines SAM . . . . .	19
2.7	Wassertropfen auf hydrophiler und hydrophober Oberfläche. . . . .	20
2.8	Darstellung polarisierten Lichts als elektromagnetische Welle . . . . .	21
2.9	a) Grenzflächenspannungen eines Flüssigkeitstropfens; b) Kugelsegmentmethode. . . . .	22
2.10	Experimenteller Aufbau zur Kontaktwinkelbestimmung. . . . .	23
2.11	SPR-Detektion in Echtzeit durch BIAcore-Technologie . . . . .	24
2.12	Typische BIAcore-Sensogramme . . . . .	25
3.1	Mögliche multivalente Architekturen . . . . .	33
3.2	Funktionsprinzip des ELISA-Tests. . . . .	36
3.3	Unspezifische Adsorption und Konformationsänderung im ELISA-Test. . . . .	37
3.4	Vorteile der Fixierung von Oligoethylenglycolen auf ELISA-Platten. . . . .	38
3.5	Zahl der Veröffentlichungen zu „Self-assembled Monolayer“ . . . . .	39
3.6	Schematischer Aufbau von SAMs aus gemischten Komponenten . . . . .	40
3.7	Multivalente Neoglykokonjugate durch 1,3-dipolare Cycloadditionen . . . . .	46
5.1	Schematischer Aufbau der Glyco-SAMs in modularer Bauweise . . . . .	48
5.2	Strategien zur Struktur einer Verknüpfungseinheit (Linker) zwischen Rezeptorfunktionalität und Platzhaltereinheit . . . . .	50

---

5.3	Zwei Strategien für „Click on SAM“ . . . . .	79
5.4	Initiale Immobilisierung von <b>5</b> . . . . .	103
5.5	Initiale Immobilisierung von <b>45</b> und <b>47</b> . . . . .	105
5.6	Initiale Immobilisierung von <b>51</b> und <b>47</b> mit Verdünnungsbaustein <b>5</b> .	106
5.7	Synchronisiertes Sensogramm nach SPR-Experiment mit Con A . . .	108
5.8	„proof of principle“: Mannose-spezifische Wechselwirkung mit Con A .	110
5.9	Differenzsensogramm bei verschiedenen Analytkonzentrationen (Con A)	113
5.10	Sättigungskurve zum Sensogramm aus Abbildung 5.9 . . . . .	113
5.11	Differenzsensogramm bei verschiedenen Analytkonzentrationen (GNL)	114
5.12	Differenzsensogramm bei verschiedenen Analytkonzentrationen (AAL)	116
5.13	Differenzsensogramm bei verschiedenen Analytkonzentrationen (BSA)	117
5.14	Vergleich der SPR-Differenzsignale bei verschiedenen Proteinanalyten	118
5.15	Differenzsensogramme gemischter 1:25-Monoschicht mit verschiedenen Analytkonzentrationen (Con A) . . . . .	120
5.16	Differenzsensogramme gemischter 1:10-Monoschicht mit verschiedenen Analytkonzentrationen (Con A) . . . . .	121
7.1	Indizierung der Atompositionen . . . . .	129

# Anhang A: Quellennachweis der Abbildungen

Abbildung	Quelle
2.1	modifiziert aus: <a href="http://www.kle.nw.schule.de/gymgoch/faecher/biologie/cytologi/membran.htm">http://www.kle.nw.schule.de/gymgoch/faecher/biologie/cytologi/membran.htm</a>
2.3	Entnommen aus: <a href="http://www.chemikerboard.de/lexikon/Concanavalin_A,erklaerung.htm">http://www.chemikerboard.de/lexikon/Concanavalin_A,erklaerung.htm</a> ; ursprüngliche Veröffentlichung: siehe J. H. Naismith, R. A. Field <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>1996</b> , 271, (2), 972-976.
2.4 a)	<a href="http://www2.bioch.ox.ac.uk/druck/mannA.htm">http://www2.bioch.ox.ac.uk/druck/mannA.htm</a>
2.4 b)	<a href="http://bmbiris.bmb.uga.edu/moremen/ERManI/Structure/MBPligand.gif">http://bmbiris.bmb.uga.edu/moremen/ERManI/Structure/MBPligand.gif</a>
2.5	<a href="http://www-lsp.ujf-grenoble.fr/recherche/a3t2/a3t2a5/verdier/biorheologie.html">http://www-lsp.ujf-grenoble.fr/recherche/a3t2/a3t2a5/verdier/biorheologie.html</a>
2.6	modifiziert aus: K. Motesharei, D. C. Myles <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , <b>1998</b> , 120, 7328-7336.
2.9, 2.10	B. Zeysing <i>Dissertation</i> , Uni Hamburg, <b>2004</b>
2.11	<a href="http://www.astbury.leeds.ac.uk/Facil/spr.htm">http://www.astbury.leeds.ac.uk/Facil/spr.htm</a> <a href="http://www.uni-saarland.de/mediadb/profil/veroeffentlichungen/ffmagazin/2-2004/Hartmann.pdf">http://www.uni-saarland.de/mediadb/profil/veroeffentlichungen/ffmagazin/2-2004/Hartmann.pdf</a> <a href="http://www.biacore.com/customer/references.phtml">http://www.biacore.com/customer/references.phtml</a>
2.12	R. Bukowski <i>Dissertation</i> , Uni Lübeck, <b>2001</b>
3.1	modifiziert aus: Th. K. Lindhorst <i>Top. Curr. Chem.</i> , <b>2002</b> , 218, 201-235.
3.6	modifiziert aus: S. Svedhem, L. Öhberg, S. Borrelli, R. Valiokas, M. Andersson, S. Oscarson, S. C. T. Svensson, B. Liedberg, P. Konradsson <i>Langmuir</i> , <b>2002</b> , 18, 2848-2858.
3.7	H. C. Kolb, K. B. Sharpless <i>Drug Discovery Today</i> , <b>2003</b> , 24, (8), 1128-1137.

## Anhang B: Sicherheitsdaten

Verbindung	Abkürzung	R-Sätze	S-Sätze	Symbol
Aceton	–	11	9-16-23.2-33	<b>F</b>
Acetanhydrid	Ac <sub>2</sub> O	10-34	26-45	<b>C</b>
Acetonitril	MeCN	11-23/24/25	16-27-45	<b>F, T</b>
Acetylchlorid	AcCl	11-14-34	9-16-26-45	<b>F, C</b>
<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat	HATU	36/37/38	26-36	<b>X<sub>i</sub></b>
2,2'-Azoisobuttersäuredinitril	AIBN	–	–	<b>E, X<sub>n</sub></b>
<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat	HBTU	36/37/38	26-36	<b>X<sub>i</sub></b>
Bortrifluoridethyletherat	BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O	15-34-48/23	26-36/37/39-45	<b>F, T</b>
11-Bromundec-(1)-en	-	20/22-36/37/38	2-36	<b>X<sub>n</sub></b>
<i>tert</i> -Butylmethylether	MTBE	11-66	16-23.2-29-33	<b>F</b>
Chlorameisensäureisobutylester	IBCF	10-23/24/25-34	16-26-36/37/39-45	<b>T</b>
Chloroform	–	22-38.40/20/22	36/37	<b>X<sub>n</sub></b>
Cyclohexan	CH	11	9-16-33	<b>F</b>
Dansylcadaverin	–	–	–	<b>X<sub>n</sub></b>



Verbindung	Abkürzung	R-Sätze	S-Sätze	Symbol
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en	DBU	22-34-52/53	26-36/37/39-45-61	<b>C</b>
Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat	Boc <sub>2</sub> O	10-26-36/38-43	28.1-36/37-45	<b>T</b> <sup>+</sup>
1,4-Diazabicyclo[2.2.0]-octan	DABCO	22-36/37/38	22-26-37	<b>X<sub>n</sub></b>
Dichlorethan	DCE	11-22K-36/37/38	53-45	<b>F, T</b>
Dichlormethan	DCM	40	23.2-24/25-36/37	<b>X<sub>n</sub></b>
<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	DCC	22-24-41	24-26-37/39-45	<b>T</b>
Diethylether	Et <sub>2</sub> O	12-19	9-16-29-33	<b>F</b> <sup>+</sup>
<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid	DIC	14-17-34-48/20	16-26-29-36/37/39-45	<b>T</b>
Diisopropylethylamin	DIPEA	11-36/38	–	<b>F, X<sub>i</sub></b>
<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid	EDC	36/37/38	26-36	<b>X<sub>n</sub></b>
4-(Dimethylamino)-pyridin	DMAP	25-36/38	45	<b>T</b>
Diethylenglycoldimethylether	DME	60-61-10-19	53.1-45	<b>F</b>
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	DMF	61-E20/21-36	53-45	<b>T</b>
Dimethylsulfoxid	DMSO	36/38	26	<b>X<sub>n</sub></b>
Essigsäure	AcOH	10-35	26-36/37/39-45	<b>C</b>
Essigsäureethylacetat	EE	11	16-23.2-29-33	<b>F</b>
Ethanol	EtOH	11	7-16	<b>F</b>
9-Fluorenylmethylchlorformiat	Fmoc-Cl	34	26-36/37/39-45	<b>C</b>
Hexaethylenglycol	HO-EG <sub>6</sub>	–	–	–
1-Hydroxybenzotriazolhydrat	HOBt	5-11	7/9-16-33	<b>F</b>

Verbindung	Abkürzung	R-Sätze	S-Sätze	Symbol
Isopropanol	i-PrOH	11	7-16	<b>F</b>
Kaliumcarbonat	–	22-36/37/38	22-26	<b>X<sub>n</sub></b>
Kaliumhydroxid	–	35	26-37/39-45	<b>C</b>
Kupfer(I)iodid	–	36/37/38	26-37/39	<b>X<sub>i</sub></b>
Lithiumaluminiumhydrid	LAH	15	24/25-43.12-7/8	<b>F</b>
2,6-Lutidin	–	10-20/21/22	16-36/37	<b>X<sub>n</sub></b>
Magnesiumsulfat	–	–	22-24/25	-
Methanol	MeOH	11-23/25	7-16-24-45	<b>F, T</b>
Methylamin (2 M in THF)	–	12-19-36/37/38	16-26-29-36/37/39-45	<b>F<sup>+</sup>, X<sub>i</sub></b>
Morpholin	–	10-20/21/22-34	23-36-45	<b>C</b>
Natriumazid	–	28-32	28.1-45	<b>T<sup>+</sup></b>
Natriumchlorid	–	–	24/25	-
Natriumhydrid	–	15	7/8-24/25-43.1	<b>F</b>
Natriumhydrogencarbonat	–	–	24/25	–
Natriumhydroxid	–	35	26-37/39-45	<b>C</b>
Natriummethanolat	NaOMe	11-14-34	8-16-26-43.6-45	<b>C, F</b>
Natriumsulfat	–	–	–	–
Palladium/Aktivkohle	Pd/C	-	24/25	–
Phosphorigsäuretriethylester	P(OEt) <sub>3</sub>	10-22-36/37/38	16-26-36	<b>X</b>
Piperidin	–	11-23/24-34	16-26/27-45	<b>F, T</b>
Propargylamin	–	11-23/24/25-34	16-26-33-36/37/39-45	<b>F, T</b>
Propiolsäure	–	24-25-34	26-36/37/39-45	<b>T</b>
Pyridin	Py	11-20/21/22	26-28	<b>F, X<sub>n</sub></b>
Pyridiniumchlorochromat	PCC	49-8-43-50/53	53.1-17-36/37-45-60-61	<b>O, T, N</b>
Pyridiniumdichromat	PDC	49-43-50/53	53.1-45-60-61	<b>T, N</b>

Verbindung	Abkürzung	R-Sätze	S-Sätze	Symbol
Salzsäure	HCl	36/37/38	26-36/37/39-45	<b>C, X<sub>i</sub></b>
Tetrabutylammonium-bromid	TBABr	22-36/37/38	26-36	<b>X<sub>n</sub>i</b>
Tetrabutylammonium-iodid	TBAI	22-36/37/38	26-36	<b>X<sub>i</sub></b>
Tetrahydrofuran	THF	11-19-36/37	16-29-33	<b>F, X<sub>i</sub></b>
Thioessigsäure	AcSH	11-22-34	16-26-36/37/39-45	<b>F, C</b>
Toluol	Tol	11-20	16-25-29-33	<b>F, X<sub>n</sub></b>
<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid	TosCl	34	26-36/37/39-45	<b>C</b>
Triethylamin	TEA	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45	<b>C, F</b>
Trifluoressigsäure	TFA	20-35	9-26-27-28.1-45	<b>C</b>
Triphenylphosphan	PPh <sub>3</sub>	11-20-36/37/38	16-26-33-36/37/39	<b>N, X<sub>n</sub></b>
Tripropylamin	NPr <sub>3</sub>	10-20/21-25-34	16-26-28A-36/37/39-45	<b>T</b>
Triphenylmethylchlorid	TrCl	34	24/25	<b>C</b>
Benzyltrimethylammoniumhydroxid	Triton B	34	26-36/37/39-45	<b>C</b>
Wasserstoff	–	12	9-16-33	<b>F<sup>+</sup></b>

# Anhang C: Lebenslauf

## Persönliche Daten

Mike Kleinert, geboren am 21.02.1976 in Stadthagen, ledig, Nationalität: Deutsch

## Schulbildung

1983 – 1987 Grundschole Nienstädt  
1987 – 1989 Orientierungsstufe Helpsen  
1989 – 1995 Ratsgymnasium Stadthagen  
Juni 95 Abitur in Stadthagen, Hauptfächer: Chemie, Physik, Griechisch

## Hochschulausbildung

Okt. 1995 Beginn des Chemiestudiums an der Universität Hannover  
Okt. 1997 Diplomvorprüfung an der Universität Hannover  
Okt. 99 – März 2000 Forschungsaufenthalt im Arbeitskreis von Prof. Steven V. Ley, University of Cambridge, UK; Thema: *Studies Towards the Synthesis of a Vicinal Tricarbonyl-Unit*  
Dez. 2000 Diplomhauptprüfung  
Dez. 2000 – Mai 2001 Anfertigung der Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. H. M. R Hoffmann, PhD, DSc am Institut für Organische Chemie der Universität Hannover; Thema: *Asymmetrische Fragmentsynthesen zum Aufbau der Disorazol A<sub>1</sub>-Nordhälfte*  
Dez. 2001 Beginn der vorliegenden Doktorarbeit unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Th. K. Lindhorst am Institut für Organische Chemie der CAU Kiel; Thema: *Cluster-Glycoside als Bausteine für Selbstanordnende Monoschichten (SAMs): Glyco-SAMs als Glycocalix-Mimetika*

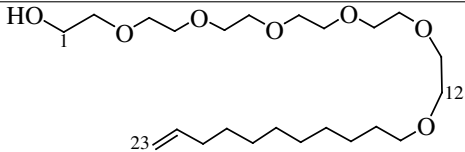
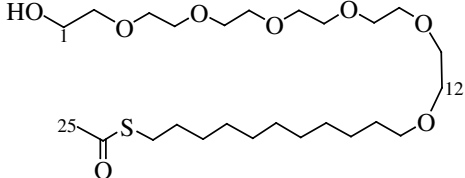
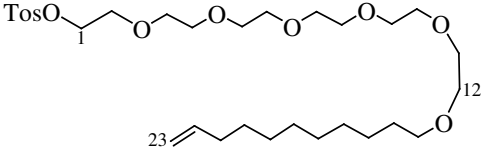
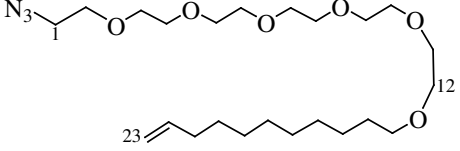
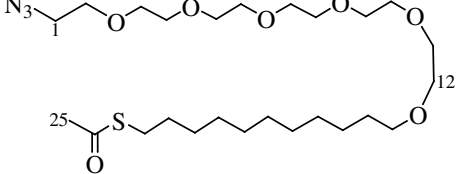
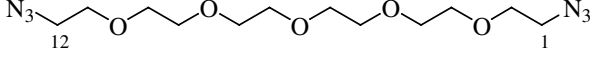
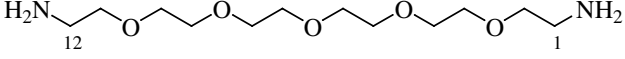
**Wissenschaftlicher****Werdegang**

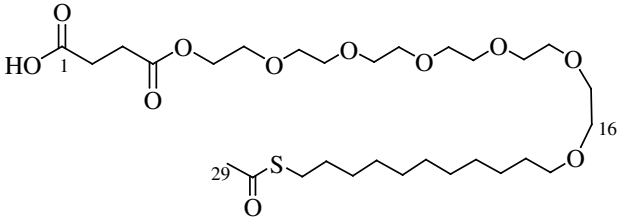
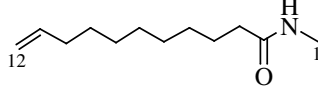
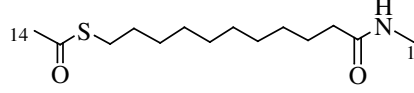
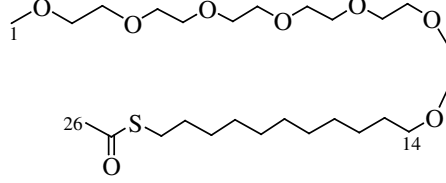
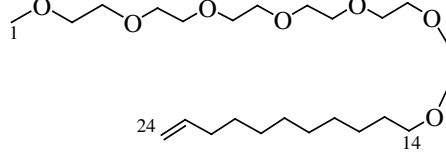
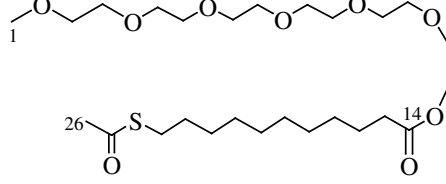
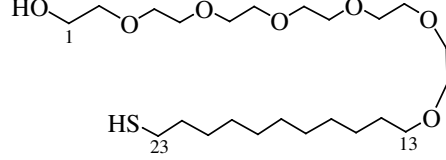
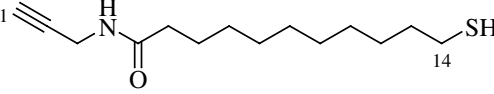
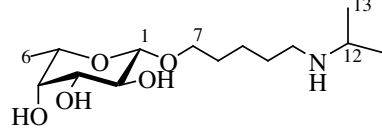
- Juni 98 – Juni 99 Betreuung des Praktikums „Chemisches Praktikum für Mediziner“ an der Medizinischen Hochschule Hannover, Hannover
- Okt. 99 – März 2000 ERASMUS-Stipendiat im Arbeitskreis von Prof. Steven V. Ley
- Juli – Aug. 2001 Industriepraktikum bei Honeywell, Seelze; R & D Chemical Specialties
- seit 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter – Betreuung von Fortgeschrittenen- und SchwerpunktpraktikantInnen im Organisch-chemischen Praktikum, sowie Betreuung der Vorlesung „Organische Chemie I“ am Institut für Organische Chemie der CAU Kiel
- Juli 2004 Teilnahme am Doktorandenkurs der BASF AG, Ludwigshafen: 107<sup>th</sup> International Summer Course

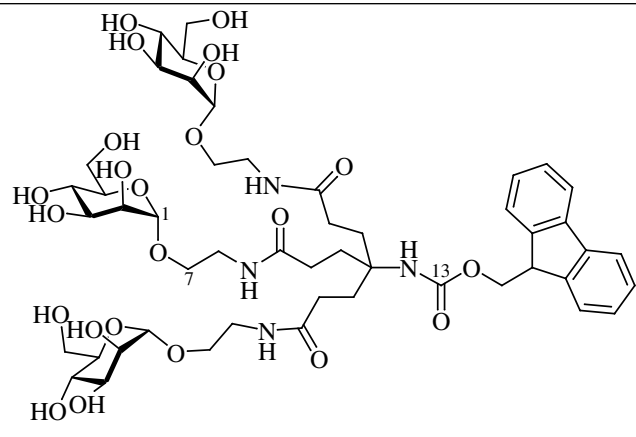
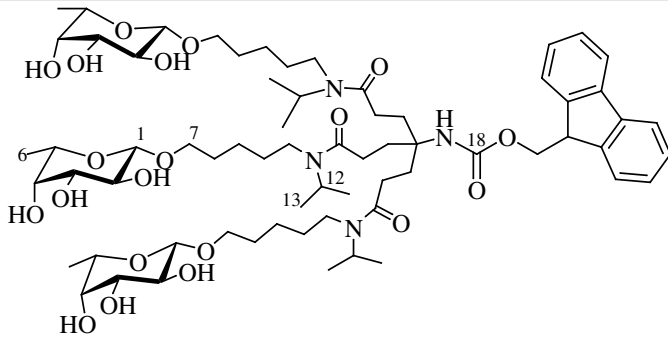
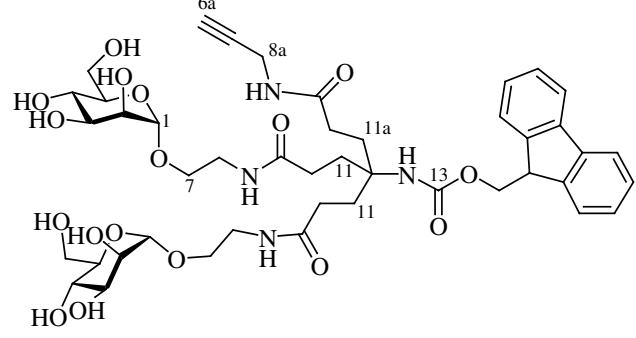
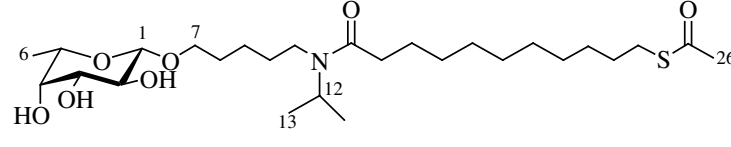
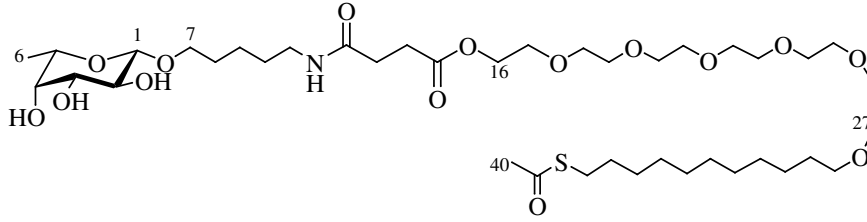
**Veröffentlichungen**

- 2003 „*Synthetic studies toward the disorazoles: synthesis of a masked northern half of disorazole D<sub>1</sub> and a cyclopropane analog of the masked northern half of disorazole A<sub>1</sub>*“ Lars Ole Haustedt, Sreeletha B. Panicker, Mike Kleinert, Ingo V. Hartung, Ulrike Eggert, Barbara Niess and H. M. R. Hoffmann *Tetrahedron*, **2003**, 59, 6967–6977.
- 2004 „*Glyco-SAMs as Glycocalyx Mimetics: Synthesis of L-Fucose- and D-Mannose- Terminated Building Blocks*“ Mike Kleinert, Niels Röckendorf and Thisbe K. Lindhorst *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 18, 3931–3940.

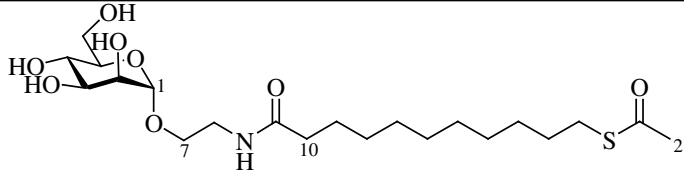
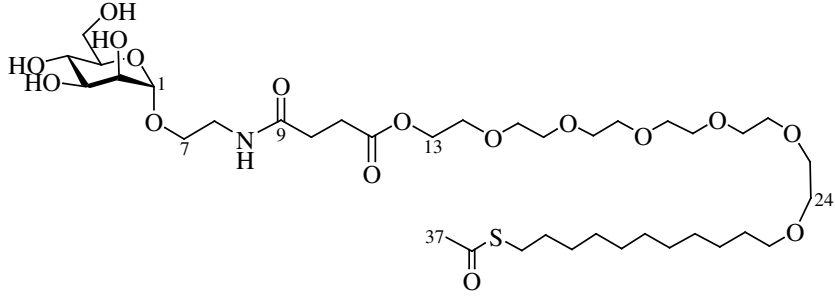
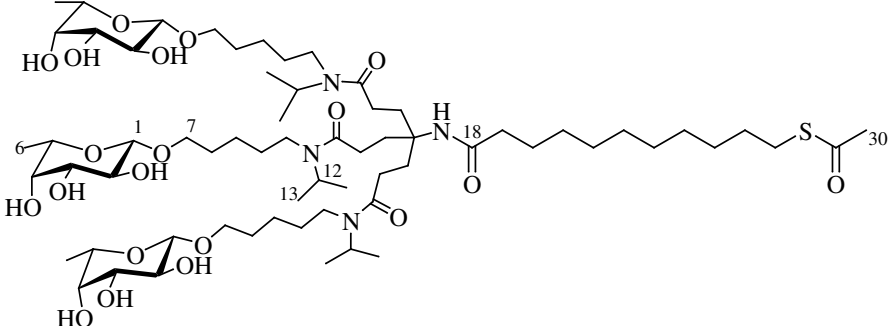
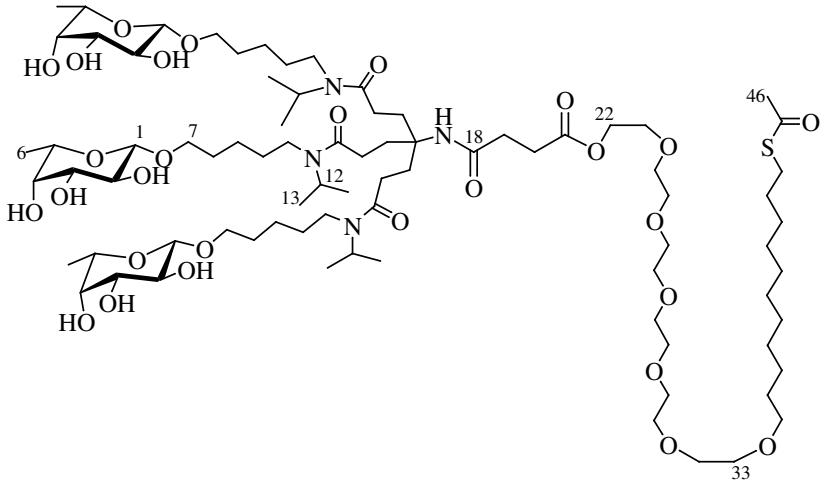
# Anhang D: Verbindungen

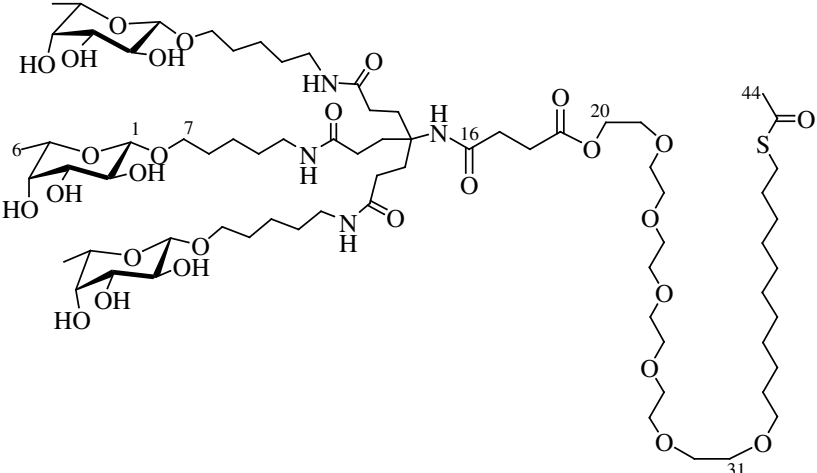
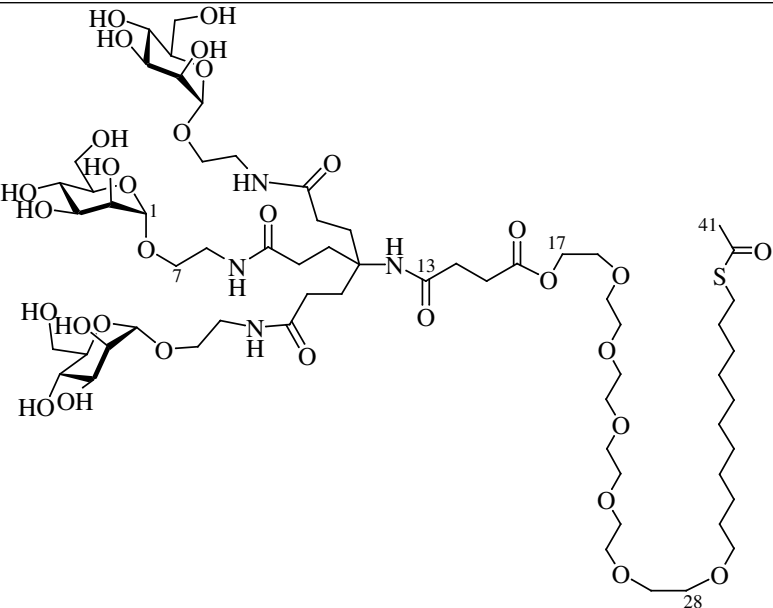
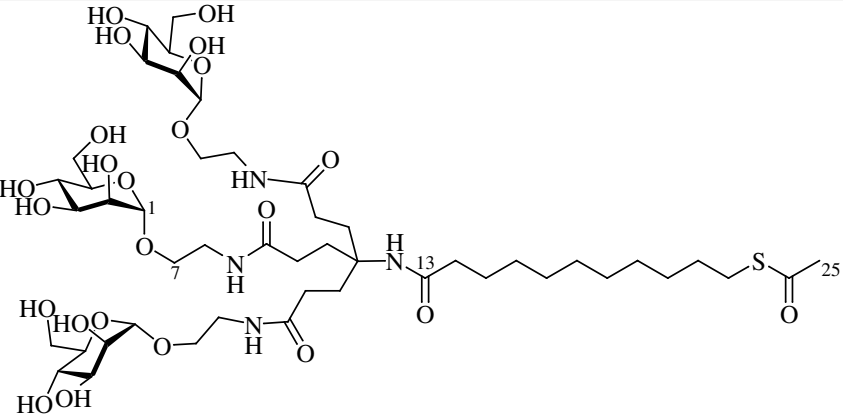
Molekül	Nummer
	<b>3</b>
	<b>5</b>
	<b>7</b>
	<b>8</b>
	<b>9</b>
	<b>11</b>
	<b>12</b>

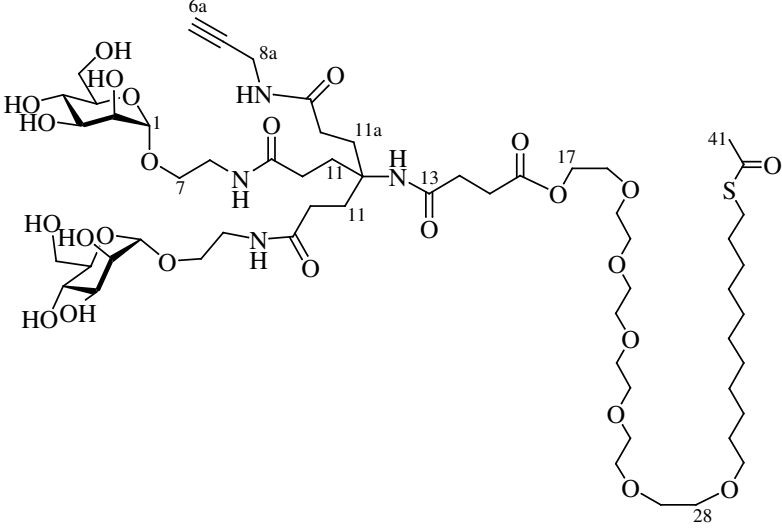
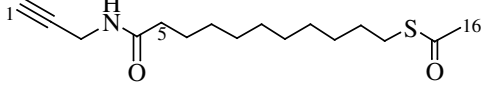
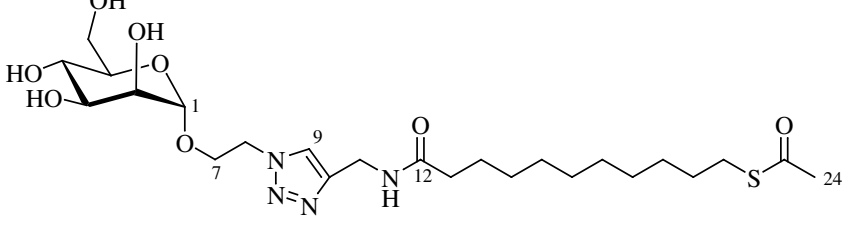
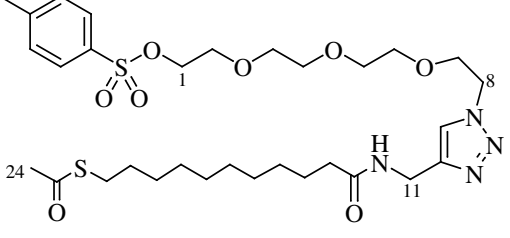
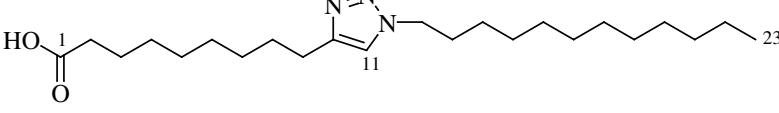
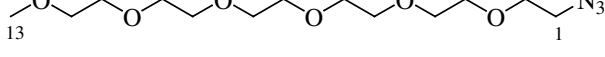
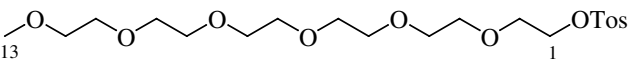
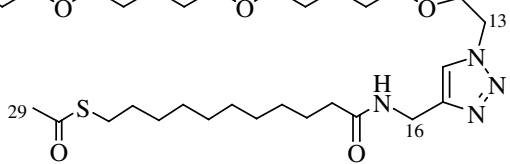
Molekül	Nummer
	15
	17
	18
	19
	20
	21
	22
	24
	30

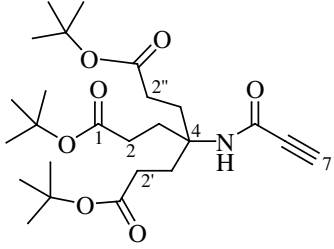
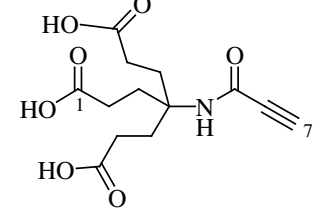
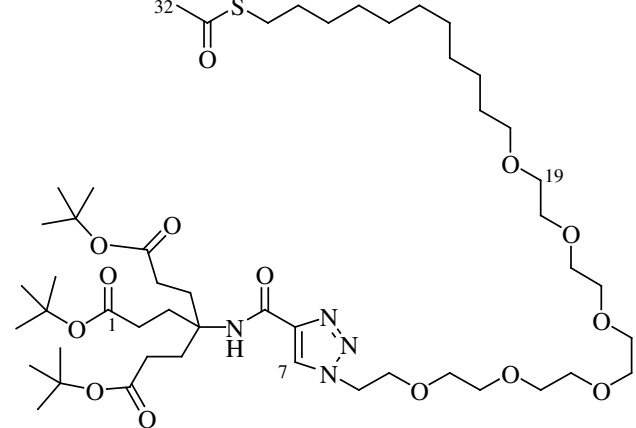
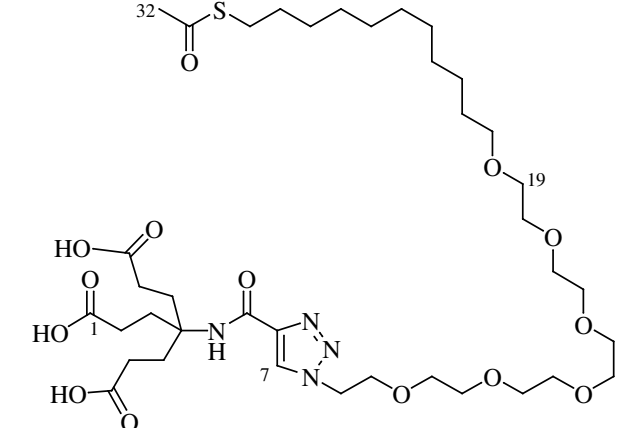
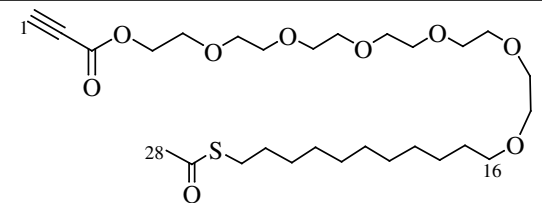
Molekül	Nummer
	<b>39</b>
	<b>40</b>
	<b>41</b>
	<b>44</b>
	<b>45</b>

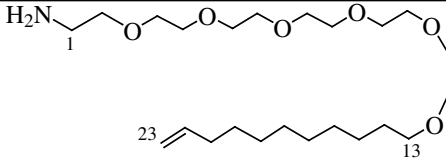
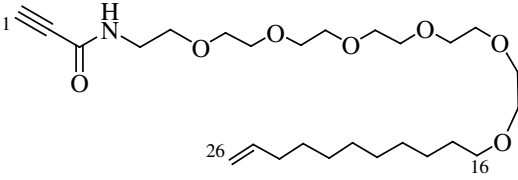
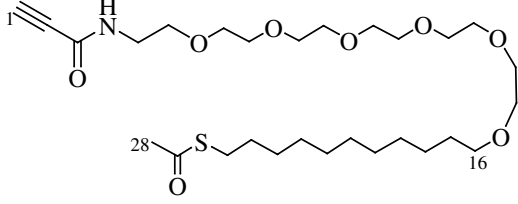
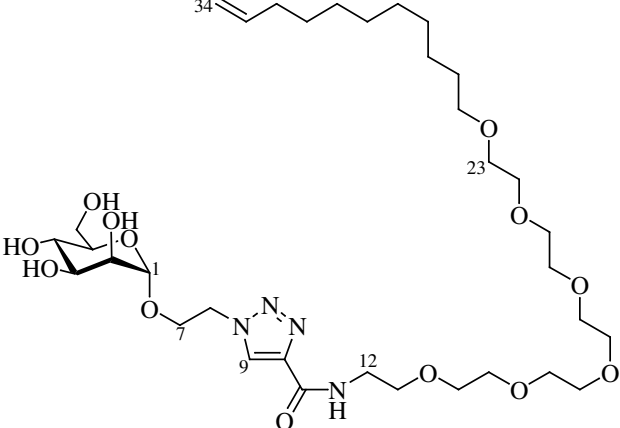
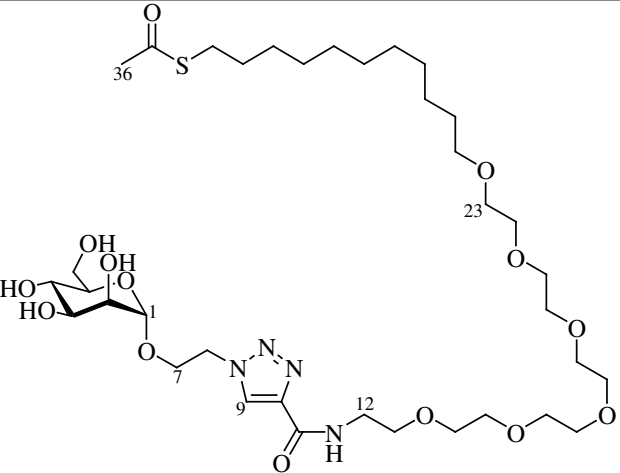


Molekül	Nummer
	46
	47
	48
	49

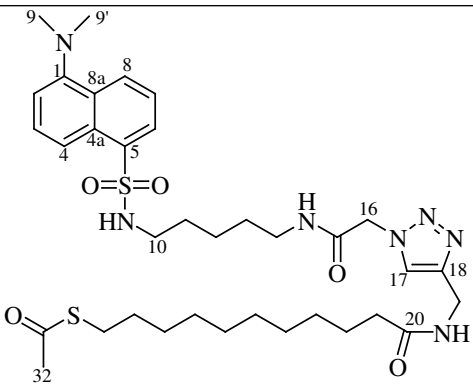
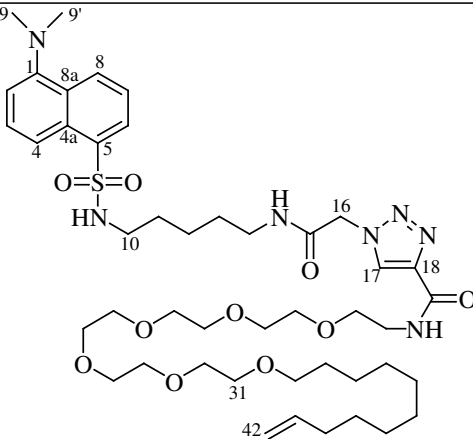
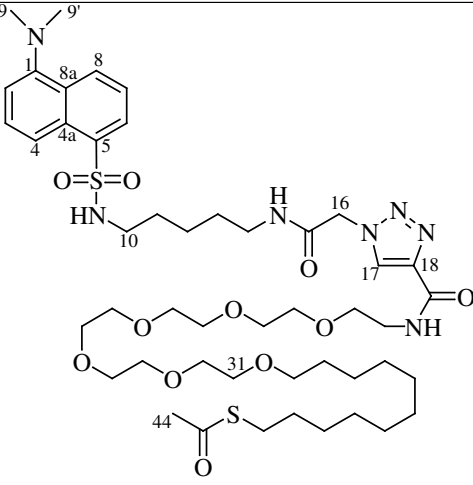
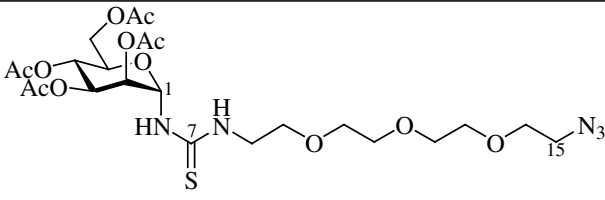
Molekül	Nummer
 <p>Chemical structure of compound 50. It features a central core with three hydroxylated sugar moieties (labeled 6, 1, 7) and a long, flexible polyether chain (labeled 20) terminated by a thioether group (labeled 31) and a carbonyl group (labeled 44).</p>	50
 <p>Chemical structure of compound 51. It features a central core with three hydroxylated sugar moieties (labeled 1, 7, 1) and a long, flexible polyether chain (labeled 17) terminated by a thioether group (labeled 28) and a carbonyl group (labeled 41).</p>	51
 <p>Chemical structure of compound 52. It features a central core with three hydroxylated sugar moieties (labeled 1, 7, 1) and a long, flexible polyether chain (labeled 13) terminated by a thioether group (labeled 25) and a carbonyl group.</p>	52

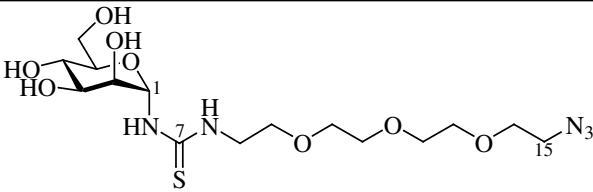
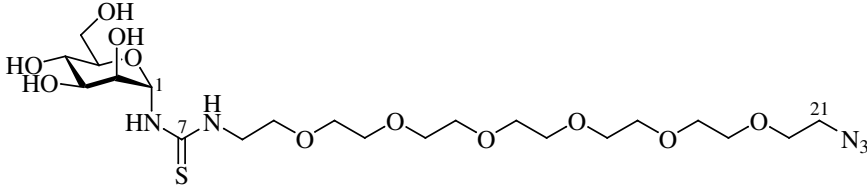
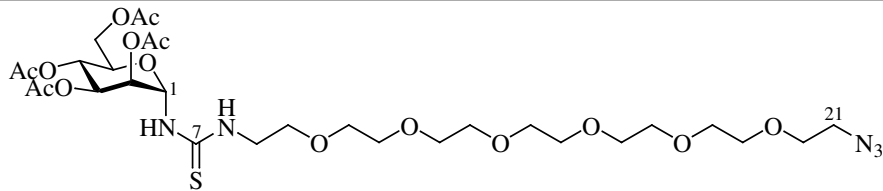
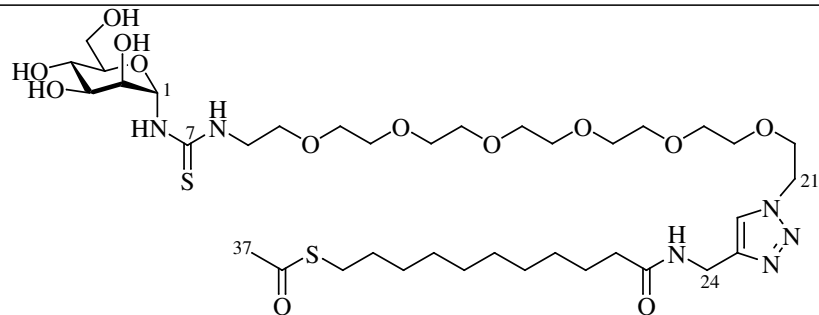
Molekül	Nummer
	<b>53</b>
	<b>54</b>
	<b>58</b>
	<b>59</b>
	<b>61</b>
	<b>64</b>
	<b>66</b>
	<b>67</b>

Molekül	Nummer
	<b>69</b>
	<b>70</b>
	<b>71</b>
	<b>72</b>
	<b>73</b>

Molekül	Nummer
	74
	75
	76
	77
	78

Molekül	Nummer
	80
	81
	87
	88

Molekül	Nummer
	89
	90
	91
	92

Molekül	Nummer
	93
	95
	94
	96