

# **Design, Synthese und Testung potentieller Inhibitoren der Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II**

JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ



## **Dissertation**

Eingereicht zur Erlangung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)“

im Bereich medizinische Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Christoph Borek

geb. in Wiesbaden

Mainz, Februar 2019



Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 2014 bis Februar 2019 am Institut für Pharmazie und Biochemie – Therapeutische Lebenswissenschaften der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter Anleitung von [REDACTED]

Vorstand der  
Prüfungskommission:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter

[REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung:

[REDACTED]





## Erklärung der Urheberschaft

Ich, Christoph Borek, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Design, Synthese und Testung potentieller Inhibitoren der Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II“ selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuches oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe

Mainz, 12.02.2019

.....

Ort, Datum

Christoph Borek



*“Sometimes, if you pay real close attention to the pebbles you find out about the ocean.”*

Terry Pratchett



# Danksagung



## Abstract

# Design, synthesis and testing of potential inhibitors of the Golgi- $\alpha$ -mannosidase II

The enzyme Golgi- $\alpha$ -mannosidase II (GMII) plays a crucial role in the *N*-glycosylation pathway, which is involved in the metastatic process of several types of cancer. It provides essential precursors of glycosyl chains which are necessary for cell recognition through interaction with selectins on the cell surface. In different cancer cells, modified glycosylation patterns were found. Their origin is believed to be the misregulation of protein expression which leads to unnatural high concentration of glycosyl transferases. In clinical trials, the reduction of metastasis and tumor growth by inhibition of the GMII has been shown. Hence the inhibition of this enzyme represents a promising target in cancer therapy.

As a new class of active substances covalent reversible inhibitors are to be developed and tested. These should combine the advantages of covalent inhibitors omitting their disadvantages. These inhibitors require extremely precise adaptation of the ligand structure to its receptor and in the reactivity of the inhibitor in order to form a covalent reversible adduct with the enzyme. To predict potential inhibitors molecular docking methods and quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods were used. The main task of this thesis was the synthesis of these structures as well as the synthesis of fluorescent substrates to establish new assays with  $\alpha$ -mannosidases and  $\beta$ -glucosidases. In total, 41 substances were synthesized. An overview of the individual subjects is shown in figure 1.

In a docking assisted de-novo-design a structure (L039) was identified, to meet all identified requirements for a covalent reversible inhibition of GMII in QM/MM-calculation. In further docking studies, several structures from the substance class of monocyclic *N,O*-acetals were identified as potential covalent reversible inhibitors. Furthermore, investigations on a spiroacetal were carried out.

In the context of this work, 25 monocyclic *N,O*-acetals, two derivatives of azamannose as potential building block, isofagomine and its 5-isomer, four potential inhibitors of a potential allosteric site of GMII and fragments of L039 were synthesized, purified and analysed spectrometroscopically. None of those compounds showed significant inhibition of dGMII.

To investigate the activity of potential inhibitors, enzyme assays were carried out. For this task, two substrates were prepared in four- and five-steps synthesis, as well as a reference inhibitor of  $\beta$ -glucosidases (isofagomine) in a six-step synthesis to validate the assay systems.



## Zusammenfassung

# Design, Synthese und Testung potentieller Inhibitoren der Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II

Die Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II (GMII) spielt eine entscheidende Rolle im *N*-Glycosylierungsprozess. Dieser ist maßgeblich an der Metastasierung diverser Krebstumorarten beteiligt, da er essentielle Vorstufen der zur Zellerkennung notwendigen Glycosylketten bereitstellt, welche auf der Zelloberfläche mit Selectinen interagieren. Auf der Oberfläche verschiedener Krebszellen wurden modifizierte Glycosylierungsmuster nachgewiesen, als deren Ursache eine Fehlregulierung der Expression angenommen wird, die zu unnatürlich hohen Konzentrationen an Glycosyltransferasen führt. In klinischen Studien konnte die Reduzierung von Tumorwachstum und Metastasierung durch die Inhibition der GMII bereits nachgewiesen werden. Daher stellt die Inhibition dieses Enzyms einen vielversprechenden Angriffspunkt in der Krebstherapie dar.

Als neue Wirkstoffklasse für die GMII sollten kovalent reversible Inhibitoren entwickelt und getestet werden, da sie die Vorteile kovalenter Inhibitoren durch Reversibilität ohne deren Nachteile kombinieren. Solche Inhibitoren bedürfen äußerst genauer Anpassung der Struktur an den Rezeptor und hinsichtlich der Reaktivität in Bezug auf die Reaktion mit dem Inhibitor zur Bildung eines kovalent reversiblen Addukts. Zur Vorhersage von potentiellen Inhibitoren wurden molekulares Docking durchgeführt sowie auf quantenmechanische und molekularmechanische (QM/MM) Simulationen zurückgegriffen. Der Kerninhalt dieser Arbeit war die Synthese dieser Verbindungen sowie die Synthese von fluorogenen Substraten für  $\beta$ -Glucosidasen und  $\alpha$ -Mannosidasen. Insgesamt wurden 41 Verbindungen synthetisiert. Eine Übersicht der einzelnen Teilprojekte ist in Abbildung 1 dargestellt.

In Docking-gestütztem De-Novo-Design wurde eine Struktur (L039) entwickelt, die allen zuvor durch QM/MM-Simulationen identifizierten Anforderungen an einen kovalent reversiblen Inhibitor genügt. In weiteren Dockingstudien wurden diverse Verbindungen aus der Substanzklasse der monocyclischen *N,O*-Acetale als potentiell kovalent reversible Inhibitoren identifiziert. Daneben wurden Untersuchungen an einem Spiroacetal durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ein Spiroacetal, 25 monocyclische *N,O*-Acetale, zwei Derivate der Azamannose als potentielle Synthesebausteine, Isofagomin und dessen 5-Epimer,

vier potentielle Inhibitoren für eine potentielle allosterische Bindetasche sowie Fragmente der Struktur L039 synthetisiert, aufgereinigt und spektroskopisch charakterisiert. Keine dieser Verbindungen zeigte signifikante Hemmung der dGMII.

Zur Untersuchung der Aktivität der potentiellen Inhibitoren wurden Enzymassays durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zwei Substrate in vier- bzw. fünfstufiger Synthese für fluorometrische Assays sowie ein Referenz-Inhibitor der  $\beta$ -Glucosidase (Isofagomin) in sechstufiger Synthese zur Validierung des Assays-Systems dargestellt.

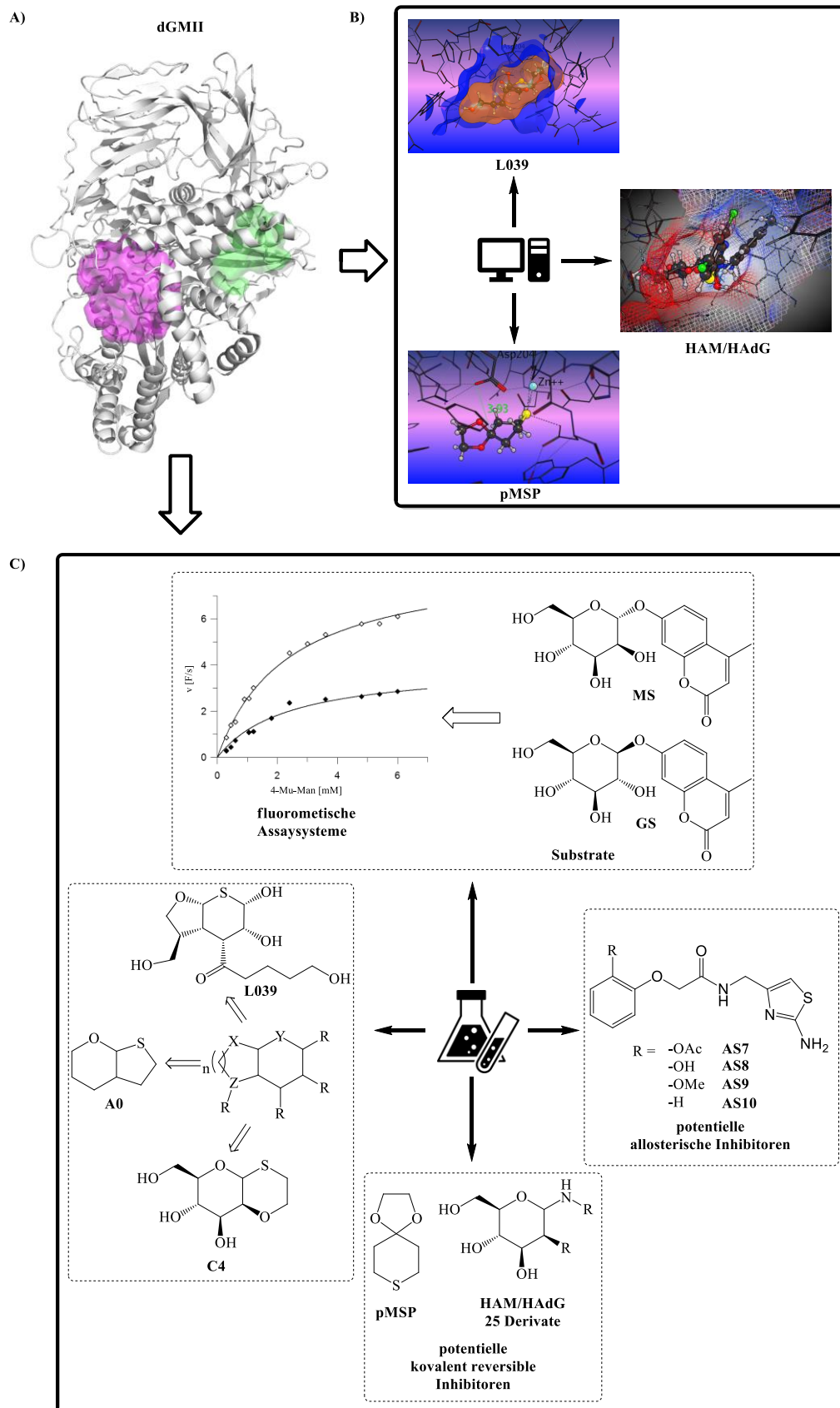


Abbildung 1: Übersicht über die in dieser Arbeit behandelten Forschungsprojekte an der Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II A) Kristallstruktur pdb: 1HWW, darin markiert sind die Größe und Position der aktiven Bindetasche in grün; B) computergestützte Methoden zum Design und zur Beurteilung neuer Inhibitorstrukturen; C) durchgeführte Syntheseprojekte.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Erklärung der Urheberschaft .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>VII</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>IX</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>XVII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Der Metastasierungsprozess .....	1
1.2 Die Rolle des <i>N</i> -Glycosylierungswegs im Metastasierungsprozess .....	4
1.3 Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II .....	6
1.4 Modellenzyme für hGMII .....	6
1.4.1 Struktur .....	6
1.4.2 Hydrolysemechanismus der dGMII .....	8
1.4.3 Jack Bean Mannosidase .....	13
1.4.4 $\beta$ -Glucosidase aus Mandeln .....	14
1.5 Bekannte Glycosidase-Inhibitoren .....	16
1.6 Dockingstudien .....	20
1.6.1 Programme und Parameter .....	21
1.6.2 RMSD-Wert und Ligandeneffizienz .....	21
<b>2 Motivation und Zielsetzung .....</b>	<b>23</b>
2.1 Etablierung fluorometrischer Enzymassays .....	23
2.2 Potentiell kovalent reversible bicyclische Acetale .....	23
2.2.1 Spiroacetale .....	27
2.2.2 Monocyclische <i>N,O</i> -Acetale .....	27
2.3 Nicht-kovalente Inhibitoren .....	28
2.3.1 Isofagomin .....	28
2.3.2 Azamannose als Synthesebaustein .....	29
2.4 Allosterische Inhibitoren .....	29
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
3.1 Dockingstudien und Synthesen .....	31
3.1.1 Potentiell kovalent reversible Acetale .....	31
3.1.2 Allosterische Inhibitoren .....	74
3.1.3 Sonstige Synthesen .....	78
3.2 Enzymassays .....	85
3.3 Allgemeine Vorbemerkungen .....	85
3.3.1 Zur Etablierung fluorometrischer Assays-Systeme .....	85
3.3.2 Assayaufbau .....	86

3.4	Enzymkinetik .....	87
3.5	Enzyminhibition .....	90
3.5.1	Kompetitive Inhibitoren .....	91
3.5.2	Nicht-kompetitive Inhibitoren .....	93
3.5.3	Unkompetitive Inhibitoren .....	95
3.5.4	Slow-binder .....	96
3.5.5	Formeln .....	99
3.6	Enzymassays .....	101
3.6.1	Assays an $\alpha$ -Mannosidasen .....	101
3.6.2	Assays an $\beta$ -Glucosidase .....	102
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>105</b>
4.1.1	Zur Etablierung des $\alpha$ -Mannosidaseassays .....	105
4.1.2	Zur Etablierung des Glucosidaseassays .....	106
4.1.3	Zur Testung der monocyclischen <i>N,O</i> -Acetale .....	107
4.1.4	Zur Testung der nicht-kovalenten Inhibitoren .....	107
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Experimentalteil .....</b>	<b>116</b>
6.1	Allgemeine Vorbemerkungen .....	116
6.1.1	Verwendete Messgeräte .....	116
6.1.2	Chromatographische Methoden .....	117
6.1.3	Verwendete Chemikalien .....	118
6.2	Substrate .....	118
6.2.1	GS: 4-Methylumbellifer-7-yl- $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranosid .....	118
6.2.2	MS: 4-Methylumbellifer-7-yl- $\alpha$ - <i>D</i> -mannopyranosid .....	122
6.3	Bicyclische Acetale .....	128
6.3.1	Pyridinium <i>p</i> -Toluensulfonat (PPTS) <sup>169</sup> .....	128
6.3.2	Testsystem A0 bzw. B0 .....	128
6.3.3	A1 ( <i>E</i> )-((2-Chlorovinyl)sulfonyl)benzen <sup>124</sup> .....	129
A1a	2,2-Dichlorophenylsulfan .....	129
6.3.4	A1b ((2,2-Dichloroethyl)sulfonyl)benzen: .....	130
6.3.5	A2 ( <i>E</i> )-((2-Chlorovinyl)sulfonyl)benzen .....	131
6.3.6	A3 ( <i>R,E</i> )-2-(((2-(Phenylsulfonyl)vinyl)oxy)methyl)oxiran <sup>170</sup> .....	132
6.3.7	A4 (3 <i>S</i> )-4-Phenylsulfonyl-2,3-dihydrofuran-3-methanol <sup>170</sup> .....	133
6.3.8	C1 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- $\alpha$ - <i>D</i> -mannopyranosyl-thiopseudoharnstoff .....	134
6.3.9	C2 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-1-thio- $\alpha$ - <i>D</i> -mannopyranose .....	135
6.3.10	C3 2-Chlorethyl 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-1-thio- $\alpha$ - <i>D</i> -mannopyranose .....	135
6.3.11	<i>trans</i> -2,3-Dibrompyran (DBP) .....	137

6.3.12	1,4-dioxa-8-thiaspiro[4.5]decan (pMSP) .....	137
6.4	Monocyclische <i>N,O</i> -Acetale .....	139
6.4.1	Generelle Arbeitsvorschrift .....	141
6.4.2	HAM-B1 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ( <i>S</i> ))-2-(hydroxymethyl)-6-(phenylamino)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triol .....	141
6.4.3	HAM-B2 2-(((2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)amino)benzoesäure .....	143
6.4.4	HAM-B3 3-(((3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ( <i>S</i> ))-3,4,5-Trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)amino)benzoesäure .....	144
6.4.5	HAM-B6 4-(((2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-Trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)amino)benzonnitril.....	145
6.4.6	HAM-B7 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-2-(Hydroxymethyl)-6-((2-hydroxyphenyl)-amino)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triol .....	146
6.4.7	HAM-B8 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-2-(Hydroxymethyl)-6-((3-hydroxyphenyl)amino)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triol.....	147
6.4.8	HAM-B9 3-(((2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-Trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)amino)benzonnitril.....	149
6.4.9	HAM-B11 Ethyl-4-(((2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)amino)benzoat.....	150
6.4.10	HAM-B16 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-2-((3,4-Dimethoxyphenyl)amino)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triol .....	151
6.4.11	HAM-B18 4-(((2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-Trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)amino)benzoesäure.....	152
6.4.12	HAM-B21 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-2-(Hydroxymethyl)-6-((2-(hydroxymethyl)phenyl)-amino)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triol .....	153
6.4.13	HAM-B22 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-2-((4-(2-Hydroxyethyl)phenyl)amino)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triol .....	155
6.4.14	HAM-B24 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-2-(Hydroxymethyl)-6-((4-isopropylphenyl)amino)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triol .....	156
6.4.15	HAM-B95 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-2-(Hydroxymethyl)-6-((4-methoxyphenyl)amino)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triol.....	157
6.4.16	HAM-B96 2-(4-(((2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-Trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)amino)phenyl)essigsäure.....	158
6.4.17	HAdG-D1 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )-2-(Hydroxymethyl)-6-(phenylamino)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4-diol.....	159
6.4.18	HAdG-D2 2-(((2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)amino)benzoesäure.....	160
6.4.19	HAdG-D3 3-(((4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)amino)benzoesäure.....	162
6.4.20	HAdG-D6 4-(((2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)amino)benzonnitril .....	163

6.4.21	HAdG-D7	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )-2-(Hydroxymethyl)-6-((2-hydroxyphenyl)amino)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4-diol .....	164
6.4.22	HAdG-D8	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )-2-(Hydroxymethyl)-6-((3-hydroxyphenyl)amino)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4-diol .....	165
6.4.23	HAdG-D18	4-(((2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)amino)benzoesäure .....	166
6.4.24	HAdG-D22	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )-6-((4-(2-Hydroxyethyl)phenyl)amino)-2-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4-diol .....	167
6.4.25	HAdG-D24	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )-2-(Hydroxymethyl)-6-((4-isopropylphenyl)amino)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4-diol .....	169
6.4.26	HAdG-D96	2-(4-(((2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)amino)phenyl)essigsäure .....	170
6.5	Nicht-kovalente Inhibitoren .....		172
6.5.1	Isofagomin und 5-epi-Isofagomin .....		172
6.5.2	Azamannose .....		182
6.6	Potentielle allosterische Inhibitoren .....		193
6.6.1	AS1: 4-(Chloromethyl)thiazol-2-amin Hydrochlorid .....		193
6.6.2	AS2: 4-(Aminomethyl)thiazol-2-amin .....		194
6.6.3	AS3: 2-(2-Acetoxyphenoxy)essigsäure.....		195
6.6.4	AS4: 2-(2-Acetoxyphenoxy)essigsäurechlorid .....		196
6.6.5	AS5: 2-(2-Methoxyphenoxy)essigsäurechlorid .....		197
6.6.6	AS6: 2-Phenoxyessigsäurechlorid.....		198
6.6.7	AS7:	2-(2-(((2-Aminothiazol-4-yl)methyl)amino)-2-oxoethoxy)phenylessigsäure .....	199
6.6.8	AS8 (ChBr7):	<i>N</i> -((2-Aminothiazol-4-yl)methyl)-2-(2-hydroxyphenoxy)acetamid 200	
6.6.9	AS9:	<i>N</i> -((2-Aminothiazol-4-yl)methyl)-2-(2-methoxyphenoxy)acetamid .....	201
6.6.10	AS10:	<i>N</i> -((2-Aminothiazol-4-yl)methyl)-2-phenoxyacetamid .....	202
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>		<b>204</b>
7.1	Strukturen im Designprozess zu L039 .....		204
7.2	Amin-Reste für die Dockingstudie mit monocyclischen <i>N,O</i> -Acetalen .....		206
7.3	Fluorimetrische Assays .....		211
7.3.1	Enzymassay mit dGMII .....		212
7.3.2	Enzymassays mit der Jack Bean Mannosidase .....		219
7.3.3	Enzymassay mit der $\beta$ -Glucosidase aus Süßmandeln .....		224
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>		<b>227</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>		<b>233</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>		<b>250</b>



## Abkürzungen

### Abkürzungen

[x]	Konzentration von x
°C	Grad Celsius
μL	Mykroliter
μM	mykromolar
4-MU-Glc	4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucopyranosid
4-MU-Man	4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid
Å	Ångström
abs.	absolut
ACN	Acetonitril
AG	Arbeitsgruppe
Ala	Alanin
AMA	Acetylgeschütztes Mercapto-Acetal
Äq.	Äquivalent
Arg	Arginin
AS	Allosterischer Inhibitor
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATR	attenuated total reflection (abgeschwächte Totalreflexion)
AzMan	Azamannose
BnBr	Benzylbromid

## Abkürzungen

C	Kohlenstoff
c	Konzentration
CDCI <sub>3</sub>	Deuteriochloroform
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
COSY	correlation spectroscopy
<i>D</i>	<i>D</i> -konfiguriert nach <i>Fischer</i>
DBU	Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Doublett von Doublett
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP	Dolichol-Phosphat-Precursor
dt	Doublett von Triplet
EC	Enzyme Commission
EE	Ethylacetat
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
ER	endoplasmatisches Retikulum
ES	Enzym-Substrat-Komplex
ESI	Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex

## Abkürzungen

ESI-MS	Electro Spray Ionisation-Massenspektrometrie
<i>et al.</i>	et alii/aliae/alia
F/s	Fluoreszenzeinheiten pro Sekunde
FT-IR	Fourier Transformierte-Infrarot Spektroskopie
g	Gramm
GH	Glycosid-Hydrolase
Glc	Glucose
GlcNAc-T	<i>N</i> -Acetylglucosaminyltransferase
GMII	Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II
GS	Glucosidase-Substrat
h	Stunde
HAdG	<i>N,O</i> -Acetale auf 2-Deoxyglucose-Basis
HAM	<i>N,O</i> -Acetale auf Mannose-Basis
HAR	Hirshfeld Atom Refinement
hGM	Humane Golgi- $\alpha$ -Mannosidase
hLM	Humane Lysosomale Mannosidase
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
I	Inhibitor

## Abkürzungen

IC <sub>50</sub>	Inhibitorkonzentration bei 50% Enzymhemmung
IR	Infrarotspektroskopie
JBM	Mannosidase der Jack-Bohne
JGU	Johannes Gutenberg-Universität
JMU	Julius-Maximilians-Universität
kcal	Kilokalorie
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K <sub>i</sub>	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
K <sub>i</sub> '	Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes
kJ	Kilojoule
KM	<i>Michaelis-Menten-Konstante</i>
KOH	Kaliumhydroxid
konz.	konzentriert
<i>L</i>	<i>L</i> -konfiguriert nach <i>Fischer</i>
LC/MS	Liquid Chromatography-/Mass Spectroscopy
LE	Ligandeneffizienz
LHDMS	Lithium-bis(trimethylsilyl)amid (Lithiumhexamethyldisilamide)
Lit.	Literatur
mbar	Millibar
MeCN	Methylcyanid/Acetonitril

## Abkürzungen

MeOD	Deuteromethanol
MeOH	Metahol
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethan-sulfonsäure
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MS	Mannosidase-Substrat
NaOH	Natriumhydroxid
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
nM	nanomolar
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy
NS	Anzahl der Schweratome
op	optischen Reinheit
Pd(OH) <sub>2</sub>	Palladium(II)hydroxid
PLB	Propensity for ligand binding
pMSP	Paramercaptospiroacetal
pNP	Paranitrophenyl
ppm	parts per million

## Abkürzungen

PPTS	Pyridinium- <i>para</i> -toluensulfonat
pTOS	<i>para</i> -Toluensulfonsäure
QM/MM	Quantummechanics-/Molecularmechnics
R	rectus (Stereodeskriptor nach Cahn-Ingold-Prelog-Konvention)
R	Rest
R <sub>f</sub>	retarding front
RMSD	quadratisch gemittelter Abstand
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s	Singulett
S	sinister (Stereodeskriptor nach Cahn-Ingold-Prelog-Konvention)
SC	Säulenchromatographie
THF	Tetrahydrofuran
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UK	United Kingdom
v	Geschwindigkeit
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
v <sub>i</sub>	Anfangsgeschwindigkeit
v <sub>max</sub>	Maximale Geschwindigkeit
v <sub>s</sub>	Gleichgewichtsgeschwindigkeit

## Abkürzungen

WW	Wechselwirkung
XRD	Röntgendiffraktion
Zn	Zink
$\Delta G$	Freie Gibbs-Energie





## Einleitung

# 1 Einleitung

Krebs ist eine der häufigsten nicht natürlichen Todesursachen in Industrienationen<sup>1</sup>. Studien mit Krebspatienten im Endstadium haben gezeigt, dass die spezifische Inhibition der Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II (GMII) durch Swainsonin eine Reduktion des Tumorwachstums und der Metastasierung bewirkt<sup>2,3</sup>. Insbesondere der Effekt auf die Metastasierung, die 90 % aller Krebstodesfälle zu verantworten hat<sup>4</sup>, ist ein Therapieansatzpunkt, in dem die GMII eine entscheidende Rolle spielt.

## 1.1 Der Metastasierungsprozess

Der Begriff Metastasierung beschreibt den Prozess der Absiedlung und Ausbreitung von Tumorzellen von einem Primärtumor zu entfernten Organen im Körper. Die Metastasierungskaskade lässt sich in folgende Schritte unterteilen (siehe Abbildung 2):

1. Anlagerung der Tumorzelle an die Wirtszelle- bzw. Extrazelluläre Matrix
2. Proteolyse von Gewebsbarrieren/Endothelzellen
3. Migration der Tumorzellen durch das Gewebe
4. Bildung von Kolonien im Zielorgan

Zunächst erfolgt die Anheftung der Tumorzellen des Primärtumors über Tumor-Zell-Oberflächenrezeptoren<sup>5-8</sup> an die Basalmembran. Diese Anlagerung erfolgt über Selectine, die bestimmte Glycoproteine erkennen und auf deren Rolle später noch weiter eingegangen wird. In Schritt 2 sezernieren die Tumorzellen Degradationsenzyme<sup>9</sup>, wobei die Tumor-eigene Angiogenese eine entscheidende Rolle spielt<sup>10,11</sup>. Darauf folgt die Invasion des Tumors (**A** in Abbildung 2), wodurch er Blutgefäße oder das lymphatische System penetrieren kann. Dort wächst der Tumor und/oder siedelt einzelne Tumorzellen ab (**B** in Abbildung 2), welche dann im Blutkreislauf zirkulieren. Dabei interagieren sie mit verschiedenen Blutzellen wie Leukozyten und Blutplättchen sowie körpereigenen Schutzmechanismen wie Lymphozyten. Letztendlich findet die Adhäsion der überlebenden Krebszellen an das Endothel über Kohlenhydrat-Liganden der Zelloberfläche der Tumorzellen und E-Selectine des Endothels statt. Im Anschluss daran erfolgt die Extravasation der Tumorzellen aus dem Gefäß. Um sich weiter zu vervielfältigen und letztendlich einen metastatischen (sekundären) Tumor zu bilden, müssen die migrierten und extravasierten Krebszellen im Parenchym (dem durch spezifische

## Einleitung

Zellen der Organe gebildeten Gewebe) überleben<sup>12-14</sup>. In mehreren Studien wurde allerdings gezeigt, dass die wenigsten injizierten Tumorzellen überhaupt in der Lage sind, metastatische Tumore zu bilden. So zeigte *Sakurai et al.*, dass 98.5 % injizierter menschlicher Lungenkrebszellen nach 24 h abgestorben waren<sup>15</sup>. *Luzzi et al.* kamen in Untersuchungen zum Metastasierungsprozess von B16F1 (Hautkrebszellen) in Mäusen zu ähnlichen Ergebnissen<sup>16</sup>, nach denen ca. 99.99 % der injizierten Zellen aufgrund von Apoptose und Nekrose, oder durch Eintreten in einen inaktiven Schlafzustand keine entfernten Läsionen bilden. Selbst nach Bildung neuer Mikrometastasen wurden die meisten davon bis zum Tag drei nach Injektion wieder abgebaut. Dementsprechend sind nur sehr wenige überlebende Tumorzellen notwendig, um neue Metastasen zu bilden.

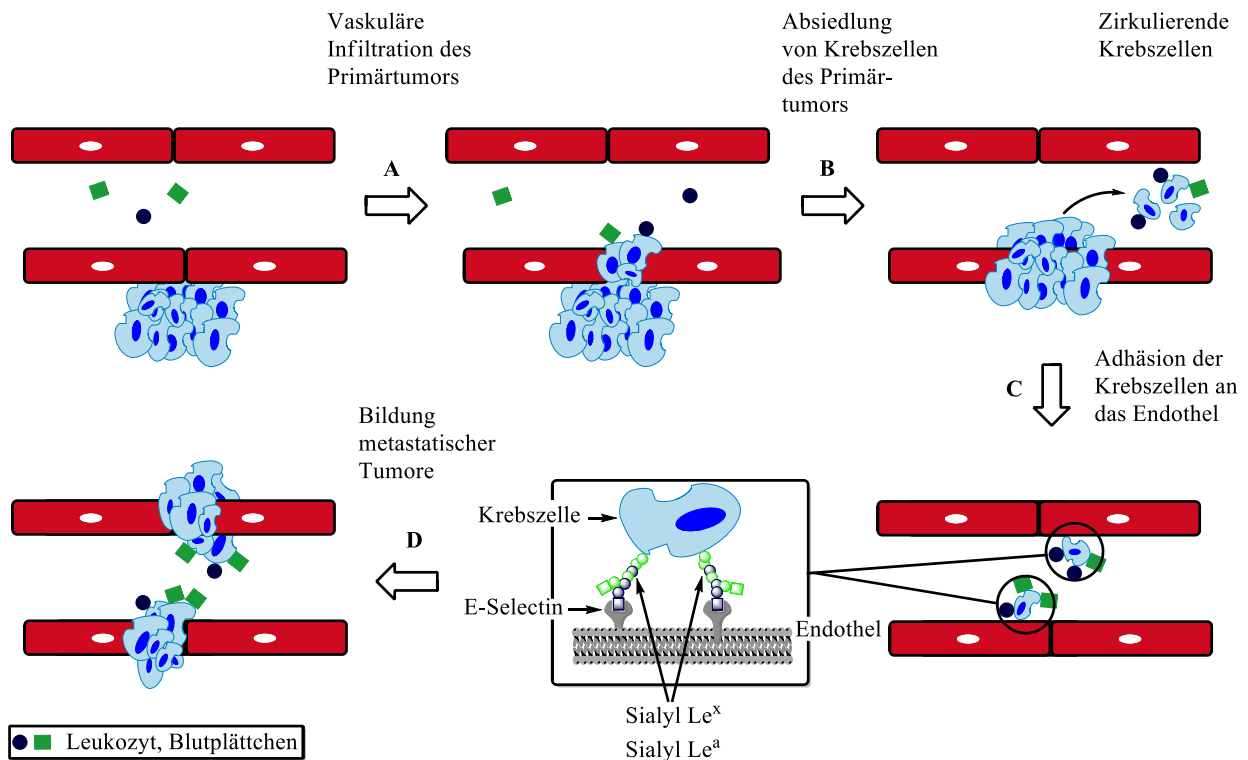


Abbildung 2: Schematischer Metastasierungsprozess in Anlehnung an Kannagi *et al.*<sup>17</sup>

Die Adhäsion der Krebszellen erfolgt durch die Interaktion von oberflächlichen Kohlenhydrat-Liganden der Krebszellen und Selectinen des Endothels<sup>18</sup>. Auf der Zelloberfläche vieler Krebszellen wurden in erhöhtem Maß Kohlenhydratstrukturen von Sialyl Lewis A (sLe<sup>a</sup>) und Sialyl Lewis X (sLe<sup>x</sup>), Tetrasaccharide mit der Sequenz NeuAcGal[Fuc]GlcNAc für sLe<sup>a</sup> und NeuAcGal[Fuc]GlcNAc für sLe<sup>x</sup>, gefunden<sup>18-22</sup>. Als interagierende Gegenstücke aufseiten des Endothels wurden E-, P- und L-Selectine, Glycoproteine aus der Gruppe der Lectine mit Massen zwischen 42 kDa und 91 kDa, identifiziert.

## Einleitung

P-Selectine werden in  $\alpha$ -Zellorganellen von Endothel- oder Blutplättchen gespeichert. L-Selectin wird in Leukozyten exprimiert, E-Selectine werden ausschließlich an aktivierten Endothelzellen exprimiert<sup>23</sup>. Selectin-Liganden auf der Krebszelloberfläche werden als potentielle Mediatoren in der Interaktion zwischen Leukozyten und Blutplättchen angesehen, welche die Anheftung von Krebszellen an das Endothel erleichtern und somit die Metastasenbildung begünstigen<sup>17,24</sup>. Mögliche Tumor-Selectin-Interaktionen sind in Abbildung 3 dargestellt.

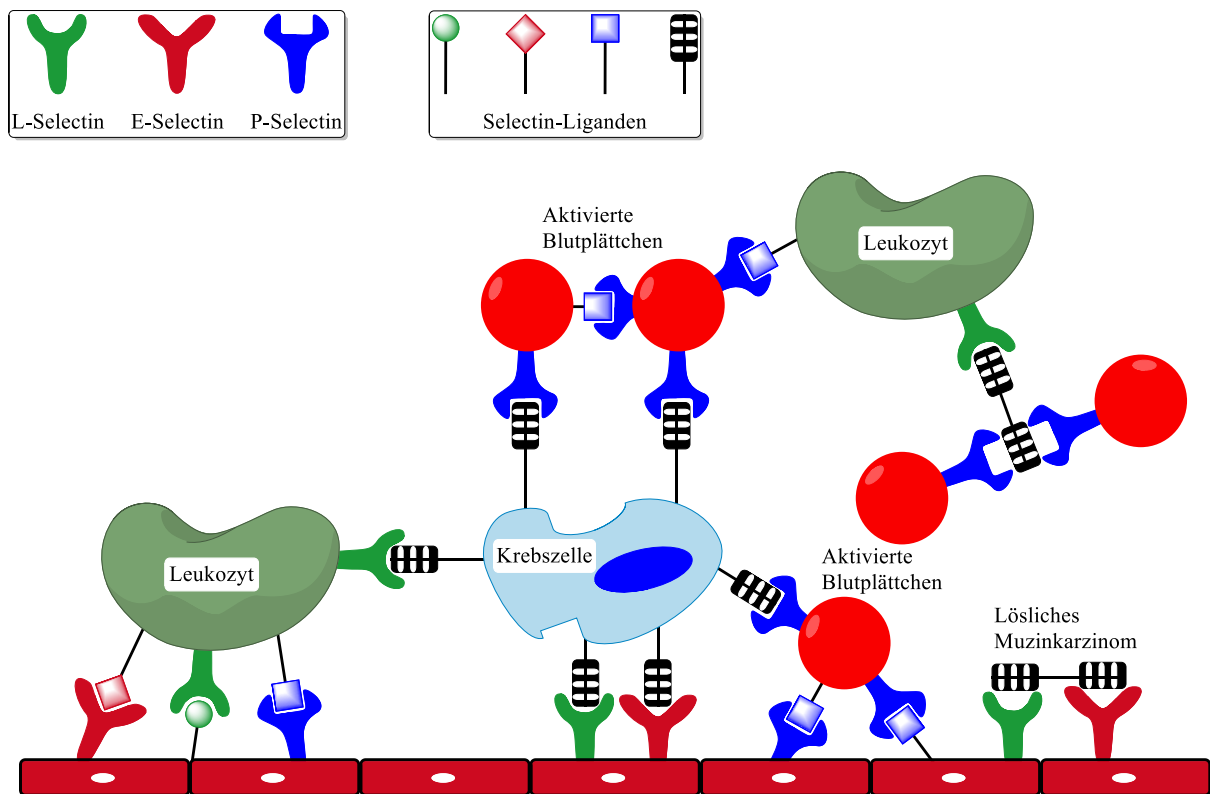


Abbildung 3: Mögliche Interaktionen zwischen (Tumor)Zellen, Selectinen und Selectinliganden während des Metastasierungsprozesses nach Läubli *et al.*<sup>24</sup>

Als Ursache für die veränderten Glycosylierungsmuster wird eine Fehlregulierung der Expression angenommen, welche zu unnatürlich großen Mengen an Glycosyltransferasen führt<sup>25</sup>. So wurden in vielen Tumorarten der Brust, des Darms und in Melanomen die *N*-Acetylglucosaminyltransferase V (GlcNAc-T V), ein Enzym, welches ein spezifisch verzweigtes *N*-Acetylglucosaminmuster auf den Glycoproteinen erzeugt, als überexprimiert berichtet<sup>26-33</sup>. Weitere Beispiele sind die  $\alpha$ -(1,3)-Fucosyltransferasen IV und VII,  $\alpha$ -(2,3)-Sialyltransferasen,  $\beta$ -(1,4)-Galactosyltransferasen und *N*-Acetylglucosaminyltransferasen<sup>23,34</sup>.

## Einleitung

Selectine wiederum erkennen bevorzugt die tetraglycosidischen SLe<sup>x</sup>- und SLe<sup>a</sup>-Strukturen, die durch diese Glycosyltransferasen synthetisiert werden. Die schlechte Prognose für Krebspatienten mit überexprimierten Fucosyltransferasen IV oder VII stützt diese These<sup>35</sup>. Da es sich als aufgrund fehlender Strukturinformationen sowie niedriger Substrataffinität der Glycosyltransferasen zum natürlichen Substrat und komplexen Übergangszuständen als schwierig erwiesen hat, Inhibitoren für diese Enzyme zu entwickeln<sup>36-38</sup>, wird versucht, schon früher in den Entstehungsprozess der Glycosylketten einzugreifen. Dieser Prozess soll im Folgenden (Kapitel 1.2) näher besprochen und mögliche Ansatzpunkte aufgezeigt werden.

### 1.2 Die Rolle des *N*-Glycosylierungswegs im Metastasierungsprozess

Wie in Kapitel 1.1 erwähnt, spielt das veränderte Glycosylierungsmuster auf der Oberfläche von Krebszellen eine entscheidende Rolle im Metastasierungsprozess. Die Synthese der Glycosylgruppen erfolgt über den *N*-Glycosylierungsweg, bei dem es sich um eine posttranslationale Modifikation handelt, bei der ein Oligosaccharid kovalent an die Seitenkette von Asparagin gebunden wird. Der Prozess (schematisch dargestellt in Abbildung 4) beginnt mit dem Aufbau des Dolicol-Phosphat-Precursors (DPP), bestehend aus Dolichol, *N*-Acetylglucosamin sowie neun Mannose- und drei Glucoseeinheiten, welcher co-translational auf Asparaginreste, die sich in der Sequenzfolge Asn-Xaa-Ser/Thr befinden müssen<sup>39</sup>, übertragen wird. Dieses Konstrukt wird dann in das endoplasmatische Retikulum (ER) transferiert, wo es dann durch verschiedene Glycosid-Hydrolasen (GH) und Transferasen, unter anderem der Familie GH38<sup>40</sup>, prozessiert wird. Nach dem Transfer in das ER erfolgen zunächst Kürzungen des Glycoproteins durch Glucosidasen und Mannosidasen, bevor das Konstrukt im Golgi-Apparat weiter hydrolysiert und mit GlcNAc verknüpft wird. Durch die Golgi-Endomannosidase können diese Schritte teilweise auch schon früher im Golgi-Apparat stattfinden. Die Aufgabe der GMII besteht konkret in der Verkürzung des GlcNAcMan<sub>5</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>-Gerüsts durch Abspaltung der  $\alpha$ -(1,3)-Mannose- und  $\alpha$ -(1,6)-Mannose-Einheiten zu GlcNAcMan<sub>3</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub><sup>41</sup>. Nach Verlängerung dieses Bausteins um eine weitere GlcNAc-Einheit durch die *N*-Acetylglucosaminyltransferase II entsteht so der Grundbaustein für den Aufbau komplexerer Oligosaccharid-Gerüste<sup>42-44</sup>. Darin wurden bereits Eingriffe an verschiedenen Stellen des *N*-Glycosylierungswegs untersucht. Als exemplarische Therapieansätze seien hier Castanospermin<sup>45</sup>, Deoxynojirimycin sowie Derivate davon<sup>46</sup> als Inhibitoren der ER  $\alpha$ -Glucosidasen I und II (Punkte A und B), Deoxymannojirimycin<sup>47</sup> und

## Einleitung

Kifunensin<sup>48</sup> als Inhibitoren der Golgi- $\alpha$ -Mannosidase I (Punkte C und D) sowie Swainsonin<sup>49,50</sup> als Inhibitor der Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II (Punkt E) genannt.

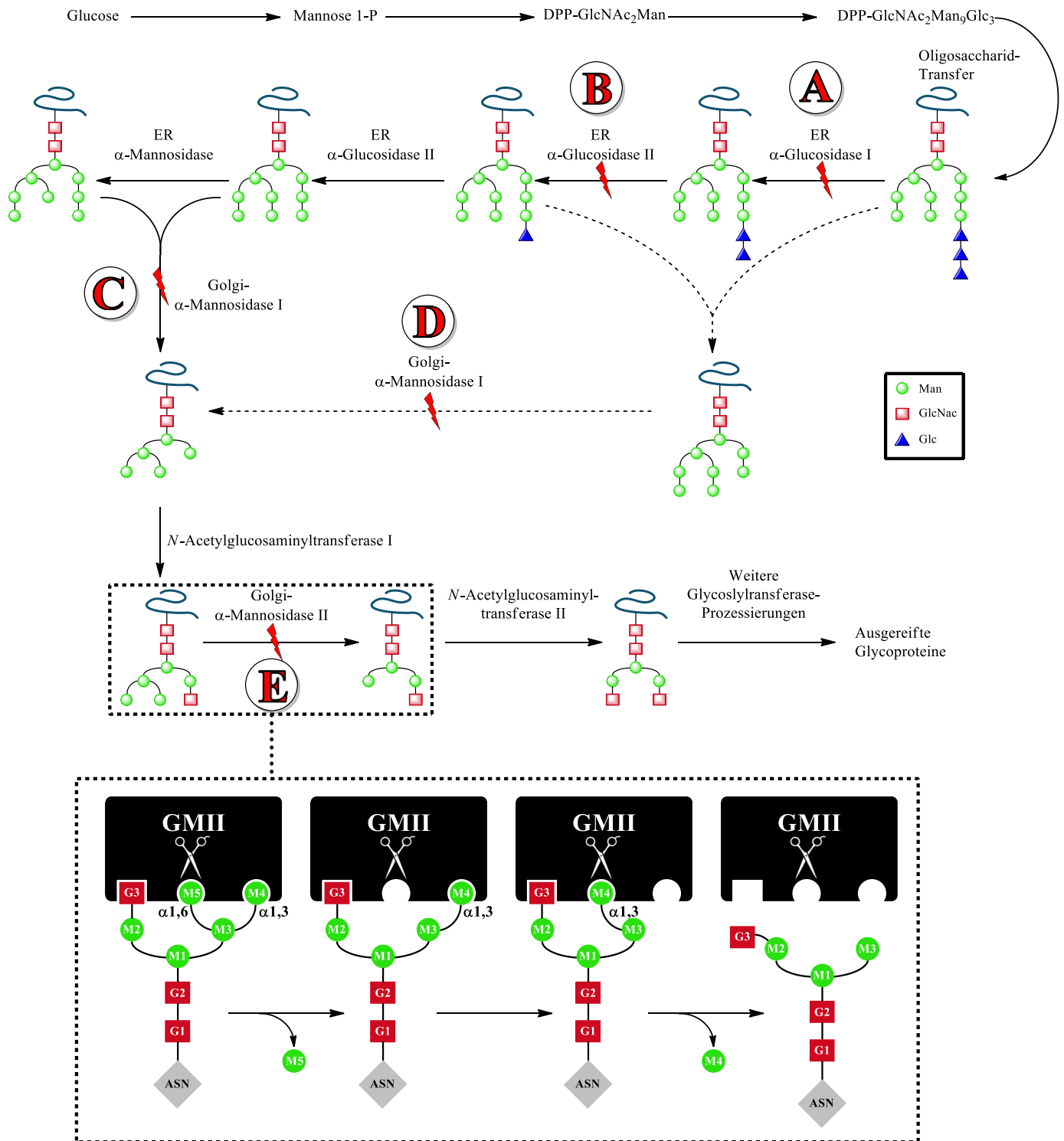


Abbildung 4: Schematische Darstellung des *N*-Glycosylierungswegs und der Funktion der GMII (angelehnt an die Darstellung von Rose *et al.*<sup>51</sup> und Dwek *et al.*<sup>46</sup>) mit verschiedenen therapeutischen Ansatzpunkten<sup>52</sup>

## Einleitung

### 1.3 Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II

Die Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II ist ein Schlüsselenzym im *N*-Glycosylierungsweg und stellt ein potentielles Ziel in der Entwicklung neuer Inhibitoren zur Behandlung metastasierender Krebserkrankungen dar. Ihre Aufgabe besteht in der Abspaltung zweier Mannoseeinheiten von dem Zwischenprodukt GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, nämlich der  $\alpha$ -(1,3)- und  $\alpha$ -(1,6)- verknüpften Mannoseeinheiten M4 und M5, zu GlcNAcMan<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (vgl. Abbildung 4).

### 1.4 Modellenzyme für hGMII

Da es äußerst schwer ist, die humane Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II in ausreichenden Mengen und Reinheit zu erhalten, existiert bis heute keine Kristallstruktur des Enzyms. Als Modellenzym dient daher die GMII aus *Drosophila melanogaster*, deren Sequenz zu 41 % identisch und zu 61 % ähnlich zu der der hGM ist. Zudem wurden für beide vergleichbare kinetische Eigenschaften, Inhibitor-Sensitivitäten und Substratspezifitäten nachgewiesen<sup>53,54</sup>. Daneben stellt die Jack Bean  $\alpha$ -Mannosidase (JBM aus *Canavalia ensiformis*, der Riesenbohne) als kommerziell erhältliche Glycosidase ein veritables Modellenzym dar. Obwohl bis heute weder die Primärsequenz noch die strukturellen Details dieses Enzyms in Gänze bekannt sind, konnte durch Analyse der Fragmente des Proteins durch proteolytischen Verdau 959 der 981 Aminosäuren bestimmt werden. LC/MS-Studien zeigten zudem eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz der katalytischen Bindetasche zur humanen lysosomalen  $\alpha$ -Mannosidase (hLM) und der hGMII<sup>55,56</sup>.

#### 1.4.1 Struktur

Die humane Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II (hGMII) gehört zur Familie GH38 der Glycosidhydrolasen (Enzymeintrag EC 3.2.1.114)<sup>57,58</sup>. Bei ihr handelt es sich um ein Typ II Transmembranprotein (mit intrazellulärem *N*-Terminus) mit einer Masse von ca. 125 kDa. Wie alle strukturell sehr ähnlichen Angehörigen der Familie GH38 ist sie in der Lage,  $\alpha$ -(1,2)-,  $\alpha$ -(1,3)- und  $\alpha$ -(1,6)-verknüpfte Mannoseeinheiten zu hydrolysieren<sup>59</sup>. Sie besteht aus einer kleinen *N*-terminalen  $\alpha/\beta$ -Domäne, einem Bündel aus drei  $\alpha$ -Helices sowie einem immunoglobulinartigen C-terminalen, reinen  $\beta$ -Faltblatt. Diese Domänen bilden ein durch fünf Disulfidbrücken verbundenes kompaktes Gebilde, welches durch eine Bindestelle für ein

## Einleitung

Zinkatom in der aktiven Bindetasche stabilisiert ist (siehe Abbildung 5). Die das katalytische Zentrum beinhaltende Domäne befindet sich auf der luminalen Seite des C-Terminus und ist durch einen integralen Membrananker an das restliche Protein gekoppelt<sup>60</sup>. Als tertiäre Struktur zeigt die GMII eine kompakte Struktur mit einer konvexen *N*-terminalen Seite und einer planaren Oberfläche auf der gegenüberliegenden Seite.

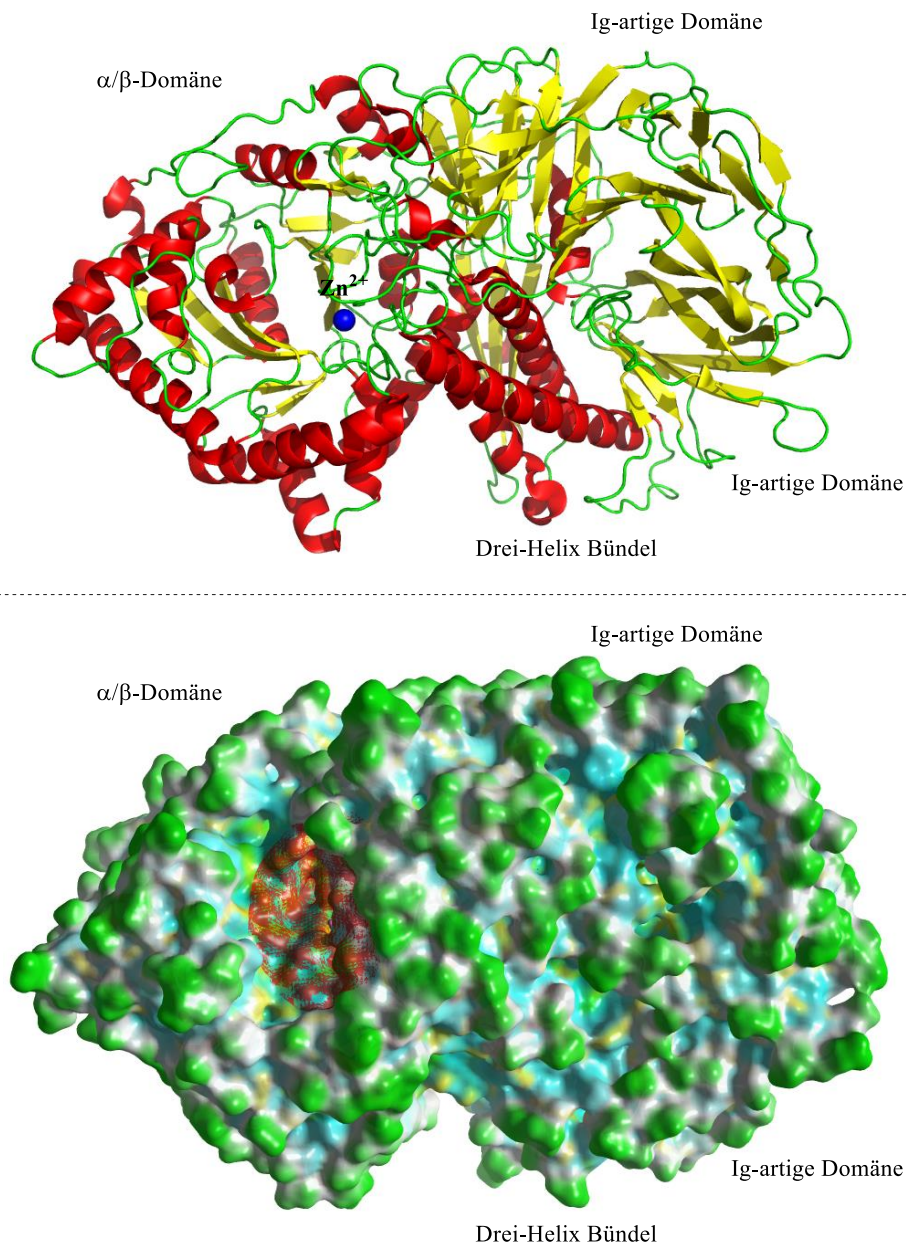


Abbildung 5: oben: Molekülstruktur der Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II aus *Drosophila melanogaster* (dGMII) aus der Röntgenstruktur pdb: 1HWW<sup>53</sup>. Das zentrale  $Zn^{2+}$ -Ion ist in blau dargestellt; unten: Oberfläche derselben Kristallstruktur, bei der lösemittelzugängliche Bereiche in grün, hydrophobe Bereiche in hellblau und polare Bereiche in gelb eingefärbt sind. Die aktive Bindetasche ist in rot angedeutet.

## Einleitung

Das katalytische Zentrum befindet sich auf der dem Golgi-Lumen zugewandten Seite, eingebettet in einer erweiterten Tasche in der  $\alpha/\beta$ -Domäne, welche vornehmlich aus sauren Aminosäuren aufgebaut und hochkonserviert ist. Das aktive Zentrum ist eine kleine Einbuchtung in dieser negativ geladenen Region, in deren Zentrum ein Zinkion einerseits zur Stabilisierung beiträgt, welches zudem aber auch eine wichtige Rolle in dem Hydrolyse-Prozess und der Substraterkennung spielt<sup>53</sup>.

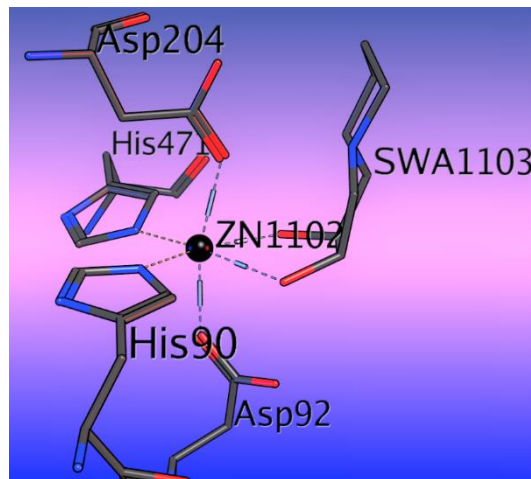


Abbildung 6: Oktaedrische Sechsfachkoordination des zentralen Zinkions in der Kristallstruktur pdb 1HWW

Dieses Zinkion ist im freien Protein T<sub>5</sub>-quadratisch-pyramidal durch die Seitenketten Asp92, His90, His470 und His471 sowie ein Lösemittelmolekül komplexiert. Ein Substratmolekül verdrängt das Lösemittelmolekül und koordiniert seinerseits zweifach an das Zink, wodurch es dann in einem oktaedrischen Ligandenfeld sechsfach koordiniert wird<sup>51</sup>. Diese Koordination wird auch in der Kristallstruktur im Komplex mit Swainsonin gefunden (Abbildung 6).

### 1.4.2 Hydrolysemechanismus der dGMII

Das Polysaccharidgerüst GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, welches in den Golgi-Apparat eintritt, wird um die  $\alpha$ -(1,6)- und  $\alpha$ -(1,3)- verknüpften Mannoseeinheiten M5 und M4 verkürzt. Dabei bindet das Substrat an eine große Furche auf der Enzymoberfläche (vgl. Abbildung 5). In dieser können drei Bereiche abgegrenzt werden, die die hauptsächlichen Wechselwirkungen mit den beiden Mannoseresten M4 und M5 sowie dem *N*-Acetylglucosamin G3 ausbilden.



## Einleitung

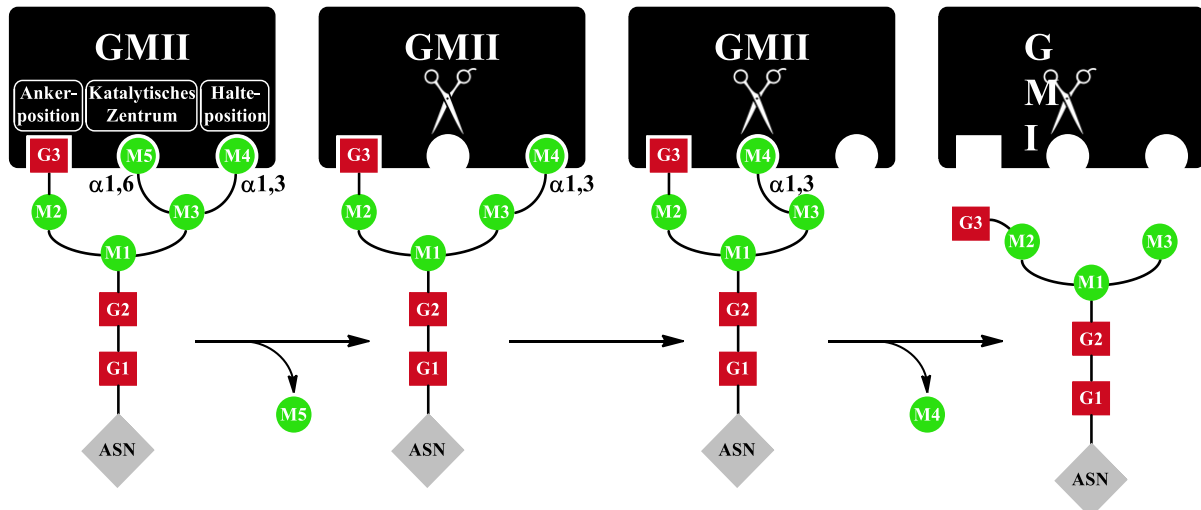


Abbildung 7: Schematischer Hydrolysemechanismus der GMII nach Shah *et al*<sup>61</sup>

Die **Ankerposition** hält das Polysaccharid in Position, das **katalytische Zentrum** hydrolysiert zunächst M5, derweil M4 in einer **Halteposition** fixiert wird. Nach der Abspaltung von M5 verlässt M4 seine Position und nimmt den Platz im katalytischen Zentrum ein, wo es ebenfalls abgespalten wird (siehe Abbildung 7). Die Wechselwirkungen zwischen Substrat und der dGMII sind schematisch in Abbildung 8 dargestellt. Diese drei Positionen zeichnen sich dabei durch folgende Eigenschaften und Strukturen aus:

### Katalytisches Zentrum:

Die  $\alpha$ -(1,6)-gebundene Mannoseeinheit M5 ist sehr stark durch die Ausbildung vieler Wasserstoffbrückenbindungen und Stapelinteraktionen mit hoch konservierten Resten in der aktiven Tasche gebunden. Die Hydroxylgruppen in Position 2, 3 und 4 binden über Wasserstoffbrücken an die zwei konservierten Tyrosine Tyr269 und Tyr727, an His471 und das Asp472. Zusätzlich bildet die hydrophobe Seite des Zuckerrings Stapelinteraktionen mit Trp95 und Tyr727 aus. Die Sauerstoffatome an Position 2 und 3 koordinieren das Zink-Ion. Der nucleophile Angriff an C1 von M5 erfolgt durch die Positionierung zwischen dem nucleophilen Aspartat 204 und der als Säure-Base-Katalysator fungierenden Asparaginsäure 341.

### Halteposition:

Die  $\alpha$ -(1,3)-gebundene Mannoseeinheit M4 besetzt eine Halteposition 9 Å vom nucleophilen Asp204 entfernt. Sie bildet mehrere Wechselwirkungen zu einem GMII-konservierten Arginin

## **Einleitung**

(Arg343) aus. Die generelle Beschaffenheit dieser Tasche ist recht offen und ermöglicht keinerlei Stapelwechselwirkungen<sup>61</sup>.

### **Ankerposition:**

Das *N*-Acetylglucosamin G3 ist stabil in einer engen Tasche 13 Å von M5 und 14 Å von M4 entfernt. Es bildet starke Stapelwechselwirkungen mit einem in allen GMII konservierten Tyrosin-Rest (Tyr267) aus. Die Acetylgruppe ist zwischen einem konservierten Tryptophan (Trp299) und Prolin (Pro298) fixiert und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem konservierten Histidin (His273) aus. Aufgrund der sehr flexiblen Gestalt des Substrates ist die Fixierung und Stabilisierung desselben notwendig. Die Koordination von G3 orientiert somit die zu hydolysierenden Mannoseeinheiten in die katalytische Position<sup>61</sup>. Außerdem gewährleistet sie die korrekte Rotation von M4 von der Halteposition in das katalytische Zentrum<sup>51</sup>.

## Einleitung

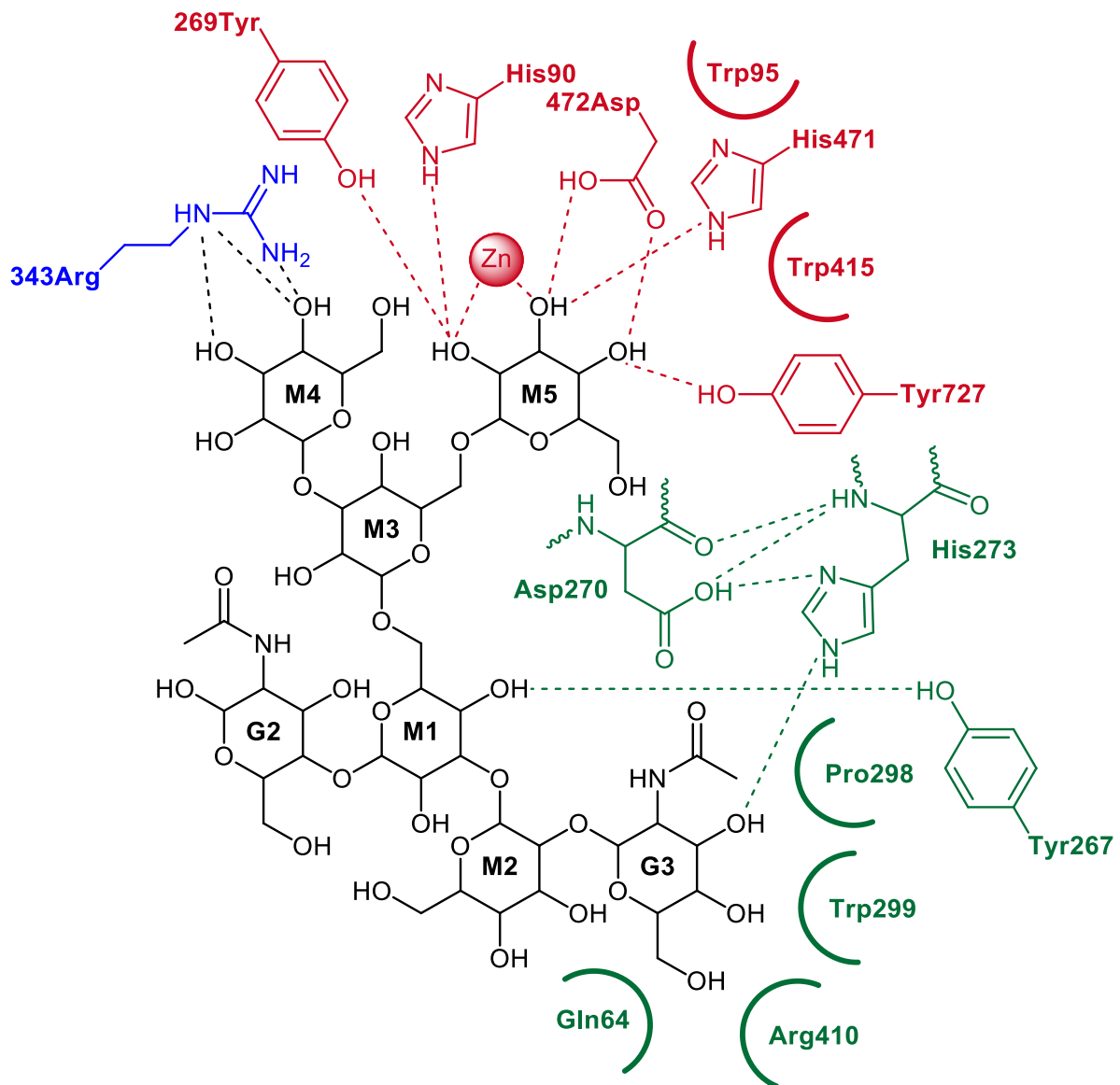


Abbildung 8: Zweidimensionale Übersicht der Interaktionen zwischen dem Substrat und der dGMII, bestimmt durch einen LigPlot+ (erhalten aus der Kristallstruktur pdb: 3CZN) nach *Shah et al.*<sup>61</sup>.

Die relative räumliche Lage der drei beschriebenen Taschen in der dGMII mit dem natürlichen Substrat GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ist in Abbildung 9 gezeigt und wurde aus der Kristallstruktur (pdb: 3CZN) einer Mutante der dGMII (D204A dGMII) erhalten. In dieser wurde das nucleophile Aspartat 204 durch ein Alanin ersetzt, um die katalytische Prozessierung zu unterbinden. Im Vergleich des E-I-Komplexes des Apoenzyms mit dem des freien Enzym D204A der dGMII zeigt sich zudem, dass die Anbindung des Substrats quasi keinerlei Konformationsänderung bewirkt<sup>61</sup>.

## Einleitung

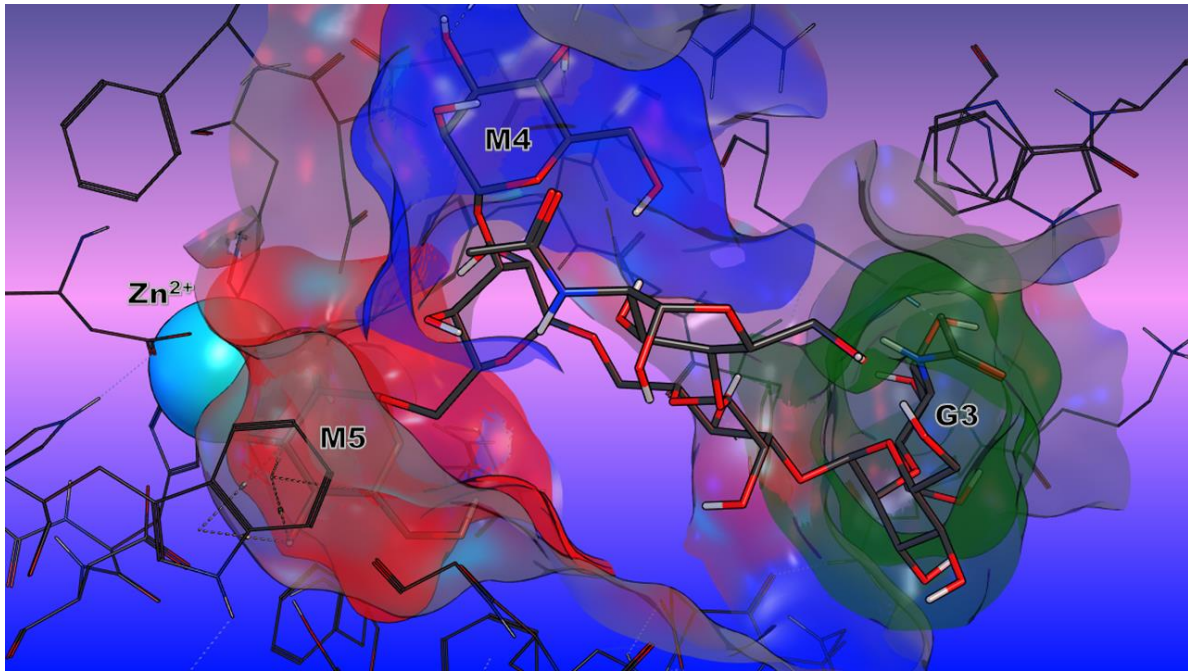


Abbildung 9: Das natürliche Substrat GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> im Komplex mit der D204A-Mutante der dGMII (pdb: 3CZN) mit farblicher Markierung der drei beteiligten Zucker-Bindepositionen: M5 im katalytischen Zentrum (rot), M4 in der Halteposition (blau) und G3 in der Ankerposition (grün).

### Der Hydrolysemechanismus:

Als retendierende Glycosylhydrolase spaltet die GMII ihr Substrat in einem zweistufigen Prozess über einen kovalenten Glycosyl-Enzym-Komplex. Als Übergangszustand tritt dabei ein intermediäres Oxocarbenium-Ion auf<sup>40,41,62</sup>. Dabei nimmt das Mannosyl-Enzym-Intermediat eine verzerrte <sup>1</sup>S<sub>5</sub>-Boot-Struktur ein, wodurch die Hydroxylgruppe der Zuckereinheit eine günstige, durch umliegende Aminosäurereste den Übergangszustand stabilisierte Position einnimmt<sup>41,51</sup>. In dieser steht die Abgangsgruppe, im Einklang mit Deslongchamp's *antiperiplanar lone pair hypothesis*<sup>63</sup>, anti-periplanar zum nicht-bindenden Elektronenpaar des Ringsauerstoffs. Daneben senkt diese Konformation die Energiebarriere für den Angriff des Wassermoleküls durch Minimierung der sterischen Abschirmung durch die *syn*-ständigen Protonen des Zuckers an C3 und C5. Die zu prozessierende Mannoseeinheit wird durch Koordination des Zinks durch die Hydroxylgruppen an C3 und C4 in der katalytischen Diade, bestehend aus dem nucleophilen Aspartat 204 und der als Säure/Base-Katalysator fungierenden Asparaginsäure 341, fixiert<sup>53,64</sup>. Die Hydrolyse wird durch die Protonierung des exocyclischen Glycosylsauerstoffs an C1 und gleichzeitigen Angriff des nucleophilen Aspartats 204 eingeleitet. Daraus resultiert der Bruch der glycosidischen Bindung unter Bildung des kovalenten Enzym-Substrat-Intermediats mit Oxocarbenium-Charakter. Die darauffolgende

## Einleitung

Hydrolyse durch ein Wassermolekül setzt die Mannoseeinheit unter Retention der ursprünglichen  $\alpha$ -Konfiguration frei (siehe Abbildung 10).

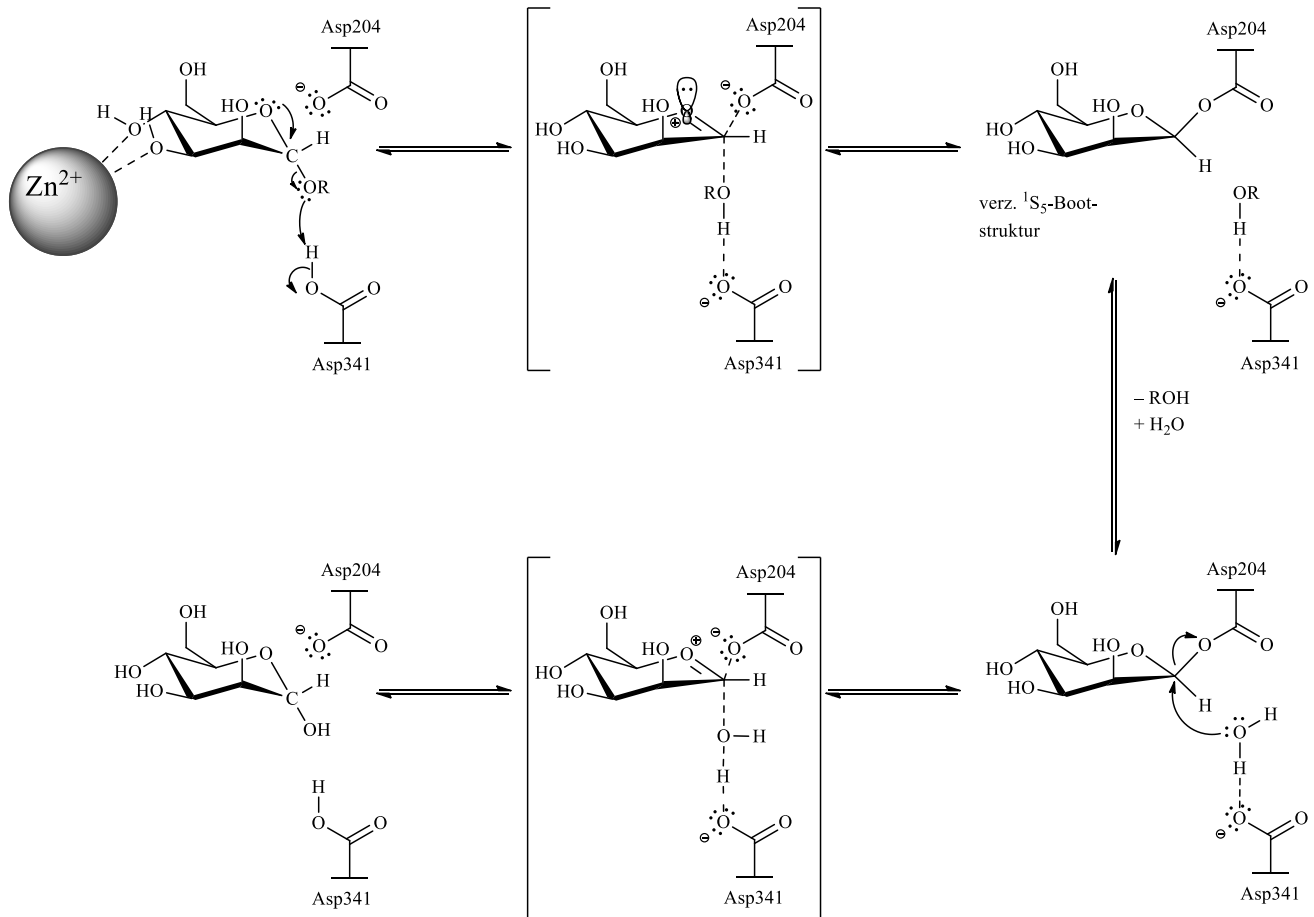


Abbildung 10: Hydrolysemechanismus der dGMII nach Reilly<sup>40</sup> und Koshland<sup>62</sup>

### 1.4.3 Jack Bean Mannosidase

Als weiteres Modellenzym für die hGMII wurde die kommerziell erhältliche Mannosidase aus *Canavalia ensiformis* (JBM), der Riesenbohne, verwendet. Von diesem Enzym sind bis heute weder die komplette primäre Sequenz noch die dreidimensionale Struktur bekannt. 2013 gelang es der Arbeitsgruppe Kumar 98 % der Proteinsequenz (959 Aminosäuren) durch proteolytischen Verdau und Analyse der Fragmente zu bestimmen<sup>56</sup>. Das Enzym ist eine Zink-Metalloprotease, bestehend aus zwei Untereinheiten mit Massen von rund 66 kDa und 44 kDa. Die größere Untereinheit ist dabei glycosyliert, die kleinere nicht<sup>65,66</sup>. Die JBM spaltet  $\alpha$ -(1,2)-,  $\alpha$ -(1,3)- und  $\alpha$ -(1,6)-verknüpfte Mannoseeinheiten von höheren Mannose-Oligosacchariden,

## Einleitung

aber auch eine Vielzahl von Aglykonen<sup>67</sup>. Sie ist ebenfalls ein retendierendes Enzym, welches auch einen zweistufigen Hydrolysemechanismus vollzieht<sup>66</sup> (vgl. Abbildung 10). Das katalytische Zentrum der JBM hat LC/MS-Studien zufolge eine große sequenzielle Similarität zu einer Vielzahl von Klasse II Golgi- und lysosomalen  $\alpha$ -Mannosidasen. Auch bei ihr wurde ein Aspartat als katalytisches Nucleophil identifiziert, wodurch die JBM auch in die Klasse 38 der Glycosylhydrolasen einzuordnen ist<sup>67</sup>. Sie wird, wie andere Mannosidase-II-Enzyme, durch Swainsonin und Mannostatin inhibiert<sup>49,68,69</sup>. Aufgrund der guten Verfügbarkeit im Vergleich zu Säugetier  $\alpha$ -Mannosidasen findet sie breite Anwendung im Bereich der Zuckerforschung<sup>66</sup>.

### 1.4.4 $\beta$ -Glucosidase aus Mandeln

$\beta$ -Glucosidasen (EC 3.2.1.21) gehören zur Familie der Glycosylhydrolasen 1 und 3. Sie spalten  $\beta$ -glycosidischen Bindungen und finden Anwendung in Landwirtschaft, Biotechnologie, Industrie und der Medizin, und spielen eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen<sup>70</sup>. Veränderungen an  $\beta$ -Glucosidasen sind mit verschiedenen Krankheiten wie der Parkinson'schen Krankheit, Lewy-Körperdemenz und der lysosomalen Speicherkrankheit (Morbus Gaucher) verknüpft<sup>71,72</sup>. Die im Rahmen dieser Arbeit adressierte  $\beta$ -Glucosidase wurde als Familie 1 Glycosidase identifiziert<sup>73</sup>. Diese Familie retendierender Glycosylhydrolasen spaltet glycosidische Bindungen mittels eines nucleophilen Glutamats<sup>74,75</sup>, im Unterschied zu den Angehörigen der Familie 3, welche zu diesem Zweck ein nucleophiles Aspartat nutzen<sup>70</sup>. Bekannte Inhibitoren sind das irreversibel desaktivierende Conduritol-B-Epoxid<sup>76,77</sup> und das reversible Isofagomin<sup>78,79</sup> (siehe Abbildung 11).

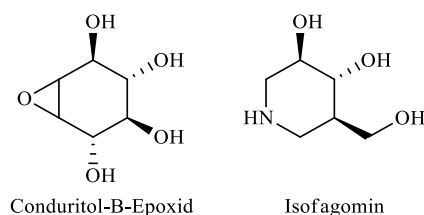


Abbildung 11: Strukturen von Conduritol-B-Epoxid (die Stereozentren an C1 und C6 können dabei sowohl 1*R*, 6*S*- als auch 1*S*, 6*R*-konfiguriert sein) und Isofagomin

Der Hauptunterschied zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glycosidasen besteht in der relativen Anordnung des katalytischen Nucleophils und des Protonendonors zueinander. In  $\beta$ -Glycosidasen kann die

## Einleitung

Protonierung der C1-Sauerstoff-Bindung sowohl aus *anti*- als auch aus *syn*-Stellung heraus erfolgen<sup>80</sup>.

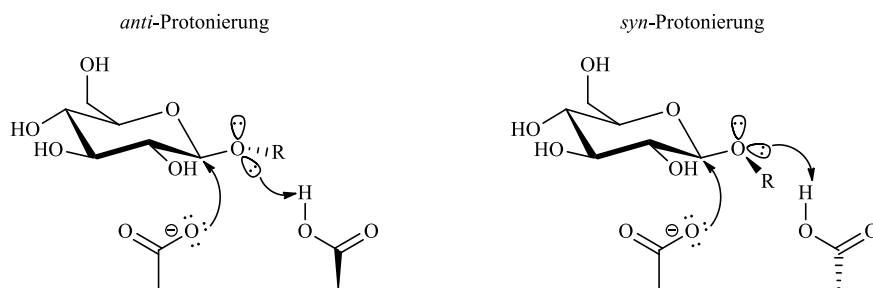


Abbildung 12: *Anti*- und *syn*-Protonierung, wie sie in  $\beta$ -Glycosidasen erfolgen kann, nach *Heightmann* und *Vasella*<sup>80</sup>

Hinsichtlich des Oxocarbeniumion-Charakters scheint dieser der bevorzugte Übergangszustand für die axiale Hydrolyse in  $\alpha$ -Glycosidasen zu sein, wohingegen in  $\beta$ -Glycosidasen mit äquatorialer Hydrolyse das Carbokation den bevorzugten Übergangszustand beschreibt<sup>81</sup>. Im Vergleich von *Isofagomin* als  $\beta$ -Glycosidase-Inhibitor und *Deoxynojirimycin* als  $\alpha$ -Glycosidase-Inhibitor kann dies verdeutlicht werden.

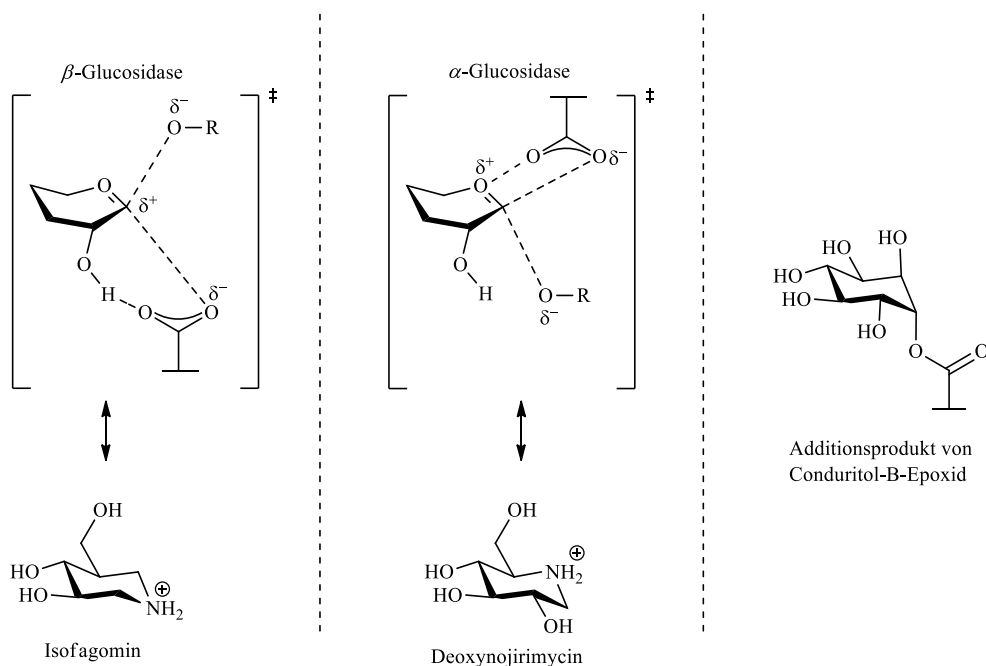


Abbildung 13: Vergleich der Übergangszustände in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glycosidasen mit Inhibitoren für diese Enzymklassen und das Additionsprodukt von *Conduritol-B-Epoxid* nach kovalenter Anbindung an das katalytische Nucleophil nach *Melo et al.*<sup>81</sup>

Hinter dem Design dieser Inhibitoren steht die Annahme, dass der Übergangszustand einen maßgeblichen Einfluss auf die Stabilisierung des Hydrolysemechanismus hat. Die Imitation

## Einleitung

desselben führt demnach zu einer guten Inhibition<sup>82</sup>. Epoxidische Inhibitoren hingegen sind kompetitive, irreversible Inhibitoren, welche kovalent an das katalytische Nucleophil des aktiven Zentrums binden. Dabei wird angenommen, dass zuerst der Epoxidsauerstoff von der Säure/Base-Katalysator-Einheit protoniert und daraufhin das anomere Kohlenstoffatom nucleophil angegriffen wird, wodurch ein Ester gebildet wird (siehe Abbildung 13).

### 1.5 Bekannte Glycosidase-Inhibitoren

Da Glycosidasen eine entscheidende Rolle in Modifikationsprozessen und Signalerkennungswegen spielen, gelten sie als Angriffspunkte für zahlreiche Krankheiten. Trotz großen wissenschaftlichen Interesses existieren nur wenige Glucosidase-Inhibitoren und keine Mannosidase-Inhibitoren auf dem europäischen und US-amerikanischen Arzneistoffmarkt. Als Beispiele für Glucosidase-Inhibitoren seien die Diabetespräparate Miglitol (Glyset<sup>®</sup>) und Acarbose (Glucobay<sup>®</sup>) sowie das Virostatikum Oseltamivir (Tamiflu<sup>®</sup>) und Miglustat (Zavesca<sup>®</sup>) zur Behandlung der lysosomalen Speicherkrankheit Morbus Gaucher<sup>83-85</sup> (Abbildung 14) genannt.

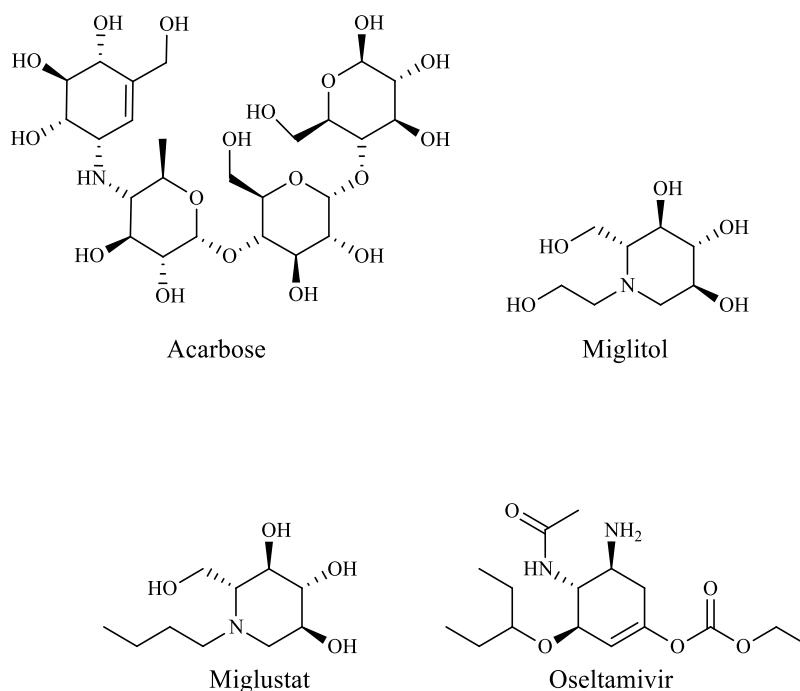


Abbildung 14: Strukturen verkehrsfähiger Glucosidase-Inhibitoren

Im Fokus aktueller Forschung stehen insbesondere Aminozucker, die bei physiologischem pH-Wert in ihrer protonierten Form den postulierten Übergangszustand (Abbildung 13) imitieren.



## Einleitung

In Abbildung 15 sind Beispiele möglicher Ansatzpunkte für Glycosidase-Inhibitoren im *N*-Glycosylierungsweg aufgezeigt. Die dabei aufgeführten Moleküle werden dabei alle als potentielle Mimetika für den Oxocarbenium- oder Cabokation-Übergangszustand postuliert, was als essenzielles Merkmal für eine gute Inhibition angesehen wird<sup>46,64,80,86</sup>.

Zu den Glucosidase-Inhibitoren der Interventionspunkte **A** und **B** in Abbildung 15:

Die Nojirimycin-Derivate leiten sich von Nojirimycin, einem der ersten entdeckten Iminozucker ab. 1-Deoxynojirimycin wurde 1966 erstmals von dem Naturstoffchemiker *Hans Paulsen* an der Universität Hamburg synthetisiert<sup>87</sup>. Im selben Jahr wurde Nojirimycin aus der Fermentationsbrühe von *Streptomyces lavaendulae* isoliert<sup>88</sup>. In der traditionellen chinesischen Medizin wurde der anti-hyperglycämische Effekt von 1-Deoxynojirimycin schon seit Langem in Form von Maulbeerblättern genutzt und der Wirkstoff 1970 aus eben diesen isoliert<sup>89</sup>. Castanospermin, ein Indolizidinalkaloid, wurde 1981 aus Samen von *Castanospermum australe* extrahiert und als potenter und selektiver Inhibitor der lysosomalen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucosidase ohne Beeinflussung anderer Glycosidasen berichtet<sup>90-92</sup>.

Zu dem Mannosidase-Inhibitor der Interventionspunkte **C** und **D** in Abbildung 15:

1-Deoxymannojirimycin wurde schon 1961, unwissentlich als Bestandteil der Rinde der zu den Hülsenfrüchten gehörenden *Lonchocarpus sericus*, mit insektizider und pestizider Wirkung beschrieben<sup>93</sup>. 1984 wurde es aus der artverwandten Hülsenfrucht *Lonchocarpus costaricensis* isoliert. 1-Deoxymannojirimycin ist ein Inhibitor der Mannosidase I<sup>94</sup>.

## Einleitung

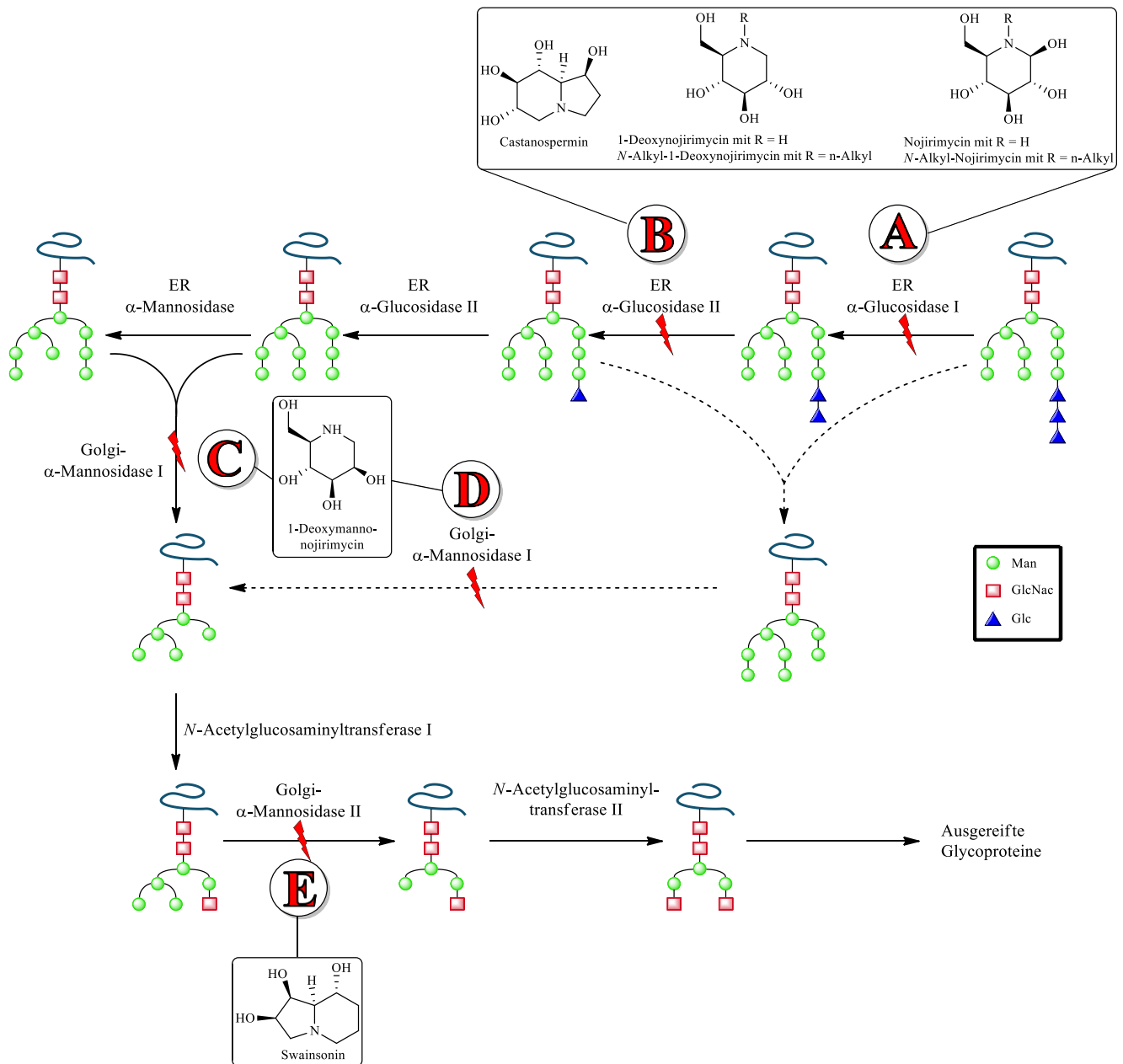


Abbildung 15: Ansatzpunkte für Arzneistoffe mit Beispielen im *N*-Glycosylierungsweg nach Dwek<sup>46</sup>

Zu dem Mannosidase-Inhibitor des Interventionspunktes **E** in Abbildung 15:

Das Indolizidin Swainsonin ist ein Alkaloid, welches zuerst aus *Swainsona canescens*, einer Hülsenfruchtart aus Australien isoliert<sup>95</sup> wurde. Es kommt in diversen Pflanzen der Gattungen *Astragalus* und *Swainsona* vor, welche unter dem Sammelbegriff Locoweed zusammengefasst werden. Es inhibiert unselektiv die Jack Bean  $\alpha$ -Mannosidase, die Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II sowie die lysosomale  $\alpha$ -Mannosidase<sup>68,96-98</sup>. Die Inhibition der letzteren ist für die toxische Wirkung des Swainsonins verantwortlich. Da der *N*-Glycosylierungsweg an dieser frühen Stelle unterbrochen wird, akkumulieren mannosereiche Oligosaccharide im Lysosom, was zu

## Einleitung

erheblichen Vergiftungserscheinungen führt<sup>99</sup>. Insbesondere der sogenannte Locoismus, abgeleitet vom spanischen *loco* = dt. „wahnsinnig“, war namensgebend für den Sammelbegriff der Swainsonin enthaltenden Pflanzenarten. Allerdings sind die durch Swainsonin unterdrückte Prozessierung von Oligosaccharidketten des Influenza-Virus A (Hämagglutinin) durch Inhibition von  $\alpha$ -(1,2)-Mannosidasen von großem Interesse<sup>50</sup>. Daneben wurden auch die Inhibitionen von  $\alpha$ -(1,3)- und  $\alpha$ -(1,6)-Mannosidasen berichtet<sup>97</sup>. Swainsonin besitzt Tumor- und metastasierungs-suppressive Wirkung. In weiterführenden Studien zeigte Swainsonin gute therapeutische Effekte auf Lymphdrüsenkrebs<sup>2</sup>, Darmkrebs<sup>100</sup>, Ehrlich Aszitem Karzinom<sup>101</sup>, Leberkrebs<sup>102</sup> und Leukämie<sup>103</sup>.

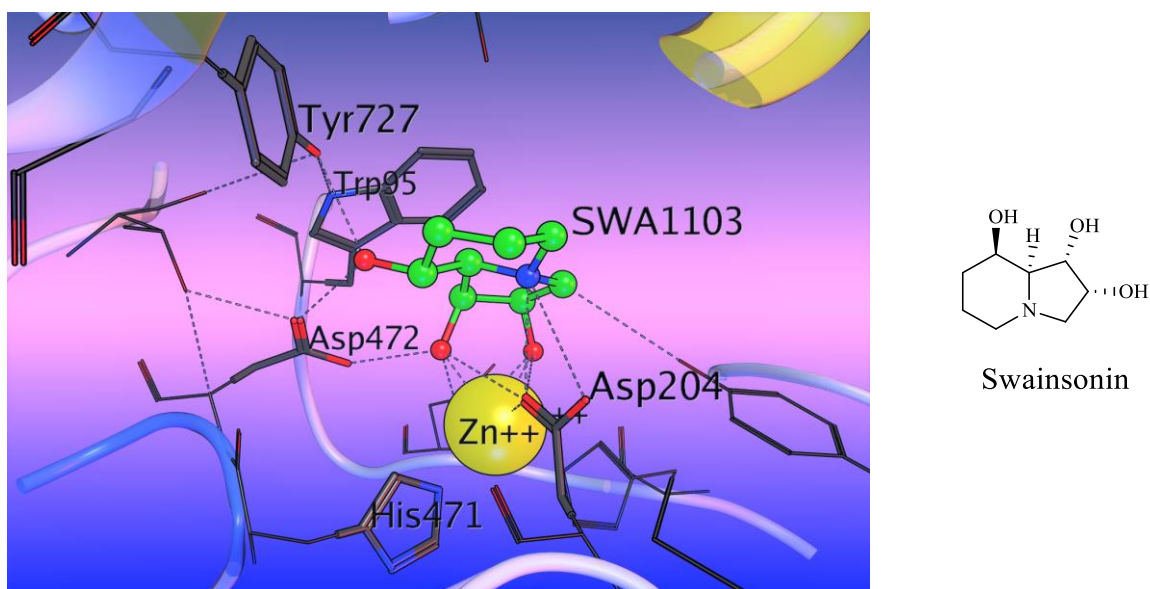


Abbildung 16: Wechselwirkungen von Swainsonin in der aktiven Tasche der dGMII aus der Kristallstruktur pdb 1HWW

Die Analyse der Kristallstruktur von Swainsonin in der dGMII (pdb 1HWW<sup>53</sup>) zeigt die Wechselwirkungen im aktiven Zentrum. Dabei wird deutlich, dass Swainsonin sehr gut den Übergangszustand des natürlichen Substrats (vgl. Abbildung 10 und Abbildung 13) imitiert. Der Fünfring nimmt eine ähnliche Position wie der Hexosering des Substrats ein. Die beiden Hydroxygruppen koordinieren analog an das Zink wie das kovalente Intermediat im Hydrolysemechanismus. Der protonierte Stickstoff besetzt die Position des ringinternen Sauerstoffs und des anomeren Kohlenstoffs. Gleichzeitig wechselwirkt er mit dem negativ geladenen Nucleophil Asp204. In dieser Position gehalten, ergeben sich zusätzlich Stapelwechselwirkungen des Sechsrings mit Trp95. Die Hydroxylgruppe des Sechsrings interagiert über Wasserstoffbrückenbindung mit Asp472 und Tyr727, was den

## Einleitung

Wechselwirkungen der 4-Hydroxygruppen des Substrats mit diesen Aminosäuren entspricht. Der restliche Teil zeigt in die hydrophobe Tasche des aktiven Zentrums (vgl. Abbildung 16)<sup>41</sup>.

Swainsonin ist der potenteste bekannte Mannosidase-II-Inhibitor mit einem  $IC_{50}$  von 40 nM (JBM); 40 nM (dGMII) und 20-50 nM (hGM II)<sup>59</sup>. Er ist dadurch in der Lage, das Glycosylierungsmuster auf Zelloberflächen zu modifizieren und somit die Expression spezifischer Membran-Glycoproteine zu beeinflussen<sup>104</sup>. Zudem werden weitere antitumor-Effekte durch die Inhibition der Expression von mtp53 und wtp53 sowie durch Einleitung der Apoptose durch Calcium-Überlastung und der damit einhergehenden Aktivierung der Endonuklease in der humanen Magenkrebszelllinie SGC-7901 beschrieben<sup>105-107</sup>.

### 1.6 Dockingstudien

Molekulares Docking ist eine gängige Methode zur Abschätzung von Affinitäten bekannter Liganden zu einem Target und bietet eine gute Möglichkeit, im Vorfeld zu beurteilen, ob eine Molekülstruktur oder Strukturuntereinheit potentiell inhibitorische Wirkung hat. Ebenso bietet es einen Ansatz zum Design neuer oder optimierter Verbindungen. Bei der Suche nach für ein Target völlig neuen Strukturen werden virtuelle Screening-Ansätze durchgeführt, bei denen große Datenbanken von kommerziell oder virtuell erhältlichen Strukturen auf mögliche Wechselwirkungen mit einem Target untersucht werden<sup>108,109</sup>. Die generelle Funktionsweise besteht in der Positionierung einer vorgegebenen Struktur in einen zuvor definierten Volumenbereich des Targets (posing) und der Berechnung dabei auftretender Wechselwirkungen zwischen der Struktur und der Umgebung (scoring).

## Einleitung

### 1.6.1 Programme und Parameter

Zur Berechnung von Wechselwirkungen zwischen potentiellen Inhibitoren und festgelegten Bereichen von Enzymen wurden die Programme FlexX der Softwaresuit LeadIT (Version 2.1.6, [www.bioseolveit.com](http://www.bioseolveit.com)) sowie MOE (Version 2015.1001, Chemical Computing Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite 910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2017) verwendet. Die einzelnen Parameter wurden entweder auf Standardwerten belassen (siehe Tabelle 4 in Kapitel 3.1.1.3.1.1) oder sind bei den jeweiligen Dockingstudien angegeben.

Die Auswertung zur Einordnung der berechneten Wechselwirkungen erfolgt auf Grundlage sogenannter Scoring-Funktionen. Das Ziel dabei ist die Vorhersage von Bindungsenergien, die Diskriminierung von bindenden gegenüber nicht-bindenden Strukturen und Bindemodi sowie die korrekte Vorhersage von Affinitäten. In FlexX wird dies standardmäßig durch den sogenannten L-Score<sup>110</sup> wiedergegeben. MOE verwendet dazu die implementierte Scoring-Funktion (GBVI/WSA dG<sup>111</sup>), welche im Folgenden als M-(K)-Score angegeben wird. Daneben existiert noch eine weiterentwickelte Methode, welche zusätzlich die Solvation bzw. Desolvation von Ligand und Rezeptor, ausgehend von zuvor berechneten Bindeposen, mit berücksichtigt, das HYDE-Assessment<sup>112</sup> (vom englischen *hydration-dehydration*). Diese Scoringfunktion gibt die jeweiligen Energiebeiträge für jedes einzelne Atom des Liganden wieder. Gerade in polaren Umgebungen, wie sie in der Bindetasche der GMII vorliegen, sollte die Desolvation nicht vernachlässigt werden, weshalb dieser Scoringfunktion besondere Beachtung geschenkt wurde.

### 1.6.2 RMSD-Wert und Ligandeneffizienz

Der RMSD-Wert (*root mean square deviation*, die *mittlere quadratische Abweichung*) ist eine wichtige Größe zur Beschreibung der Ähnlichkeit von Bindemodi und Konformationen. Zur Validierung der Güte von Dockingergebnissen kann idealerweise die Position und Konformation eines in der Kristallstruktur vorhandenen Referenzliganden mit der berechneten Position derselben Struktur verglichen werden (*re-docking*). Der RMSD-Wert wird gemäß Gleichung 1 berechnet. Darin beschreibt  $d_i$  den Abstand des  $i$ -ten Atoms zwischen zwei Konformationen (in Å) und  $N$  die Gesamtanzahl dieser Distanzen<sup>113</sup>.

## Einleitung

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N d_i^2}{N}}$$

Gleichung 1: Definition der mittleren quadratischen Abweichung (RMSD)

Für ein vertrauenswürdige Dockingergebnisse sollte das Redocking des Referenzliganden RMSD-Werte unter 2 Å liefern<sup>114,115</sup>.

Die Ligandeneffizienz LE wiederum setzt den berechneten Score eines Dockingergebnisses in Verhältnis zur Anzahl der in der Verbindung enthaltenen Schweratome gemäß Gleichung 2.

$$LE = -1 * \left( \frac{Score}{NS} \right)$$

Gleichung 2: Definition der Ligandeneffizienz

Die LE dient zur Beschreibung der Güte vorhandener Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor einer berechneten Bindepose und gibt Auskunft über das Optimierungspotential des Liganden. Dabei beschreiben der *Score* die berechnete freie Bindungs-Energie ( $\Delta G$ ) und *NS* die Anzahl der Schweratome.

## 2 Motivation und Zielsetzung

### 2.1 Etablierung fluorometrischer Enzymassays

Da der ursprünglich im Arbeitskreis verwendete photometrische Assay als Zweipunktmethode nicht nur anfällig für Pipettierfehler, sondern auch wenig sensitiv ist, sollen fluorometrische Assays mit Substraten, die durch die Prozessierung im Enzym fluoreszierende Moleküle freisetzen, etabliert werden. Zu diesem Zweck sollen die Substrate 4-Methylumbellifer-7-yl- $\beta$ -D-glucopyranosid (4-MU-Glc, **GS**) und 4-Methylumbellifer-7-yl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (4-MU-Man, **MS**) synthetisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten unterschiedliche Ansätze zur Hemmung der dGMII verfolgt werden, nämlich

1. Design und Synthese kovalent-reversibler bicyclischer Acetale
2. Evaluierung der Eignung von Spiroacetalen als Inhibitoren
3. Design und Synthese kovalent-reversibler monocyclischer Acetale

Daneben wurden potentielle allosterische Inhibitoren sowie ein  $\beta$ -Glucosidase-Inhibitor (Isogagomin) synthetisiert.

### 2.2 Potentiell kovalent reversible bicyclische Acetale

Um eine möglichst hohe Verweildauer eines potentiellen Inhibitors im aktiven Zentrum des Enzyms zu erreichen, ohne dieses irreversibel zu blockieren, bieten sich reversibel kovalente Wirkmechanismen an. Durch hochangepasstes Design von entsprechenden Verbindungen sollen die Vorteile kovalenter Inhibitoren (hohe Verweildauer, hohe Affinität, die teilweise aus der kovalenten Anbindung resultiert) mit denen nicht-kovalenter (keine unspezifischen Reaktionen mit off-Targets) kombiniert werden. Die Unterschiede sind schematisch in Abbildung 17 dargestellt.

## Motivation und Zielsetzung

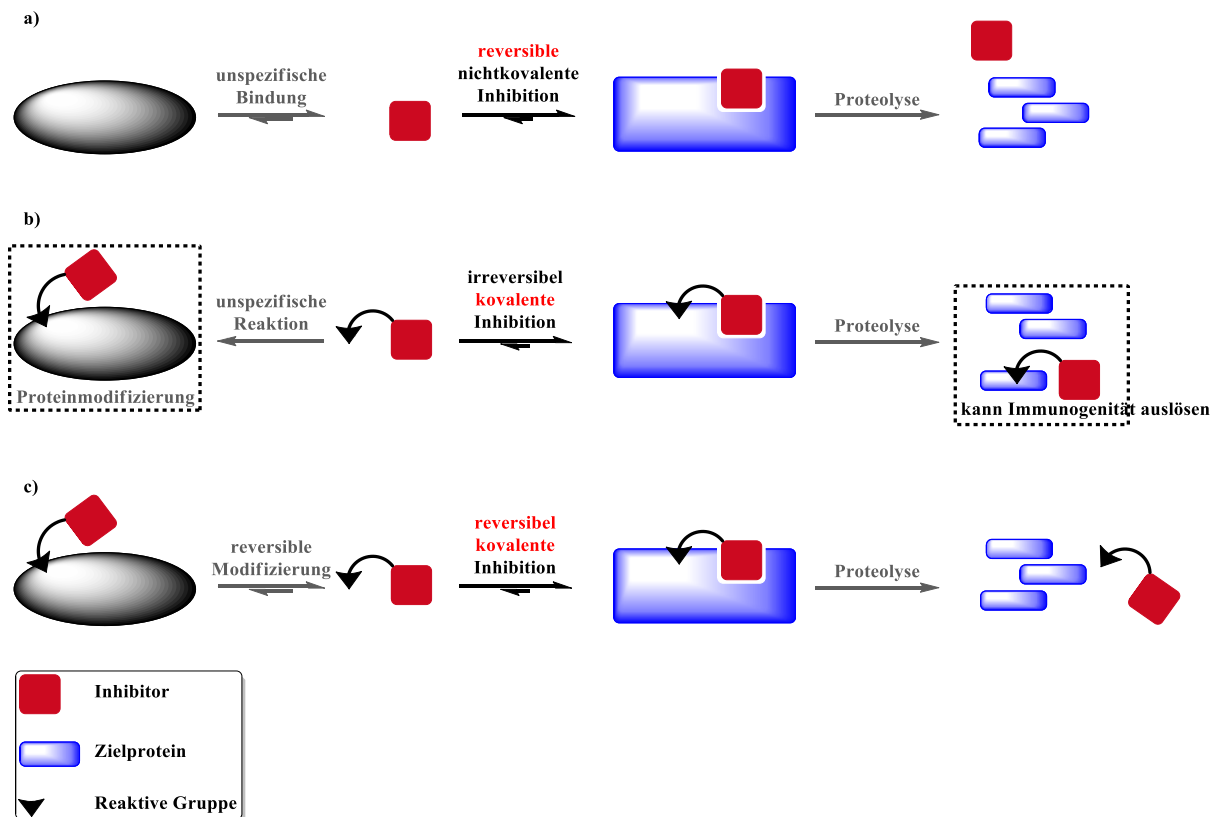


Abbildung 17: Inhibitorische Strategien: a) reversible Inhibition durch chemisch inerte Liganden, b) irreversible Inhibition über reaktive Liganden und c) reversible und kovalente Inhibition durch reaktive Liganden nach *Grossmann*<sup>116</sup>

Über die Betrachtung der Energieprofile der verschiedenen Inhibitionstypen wird klar, dass für irreversible Liganden die Energiebarriere der Rückreaktion zu groß ist, als dass diese eintritt. Im Falle reversibler Liganden ist die freiwerdende Energie durch die Bindung geringer und die Energiebarriere damit klein genug, um eine Rückreaktion zu gestatten (vgl. Abbildung 18).



## Motivation und Zielsetzung

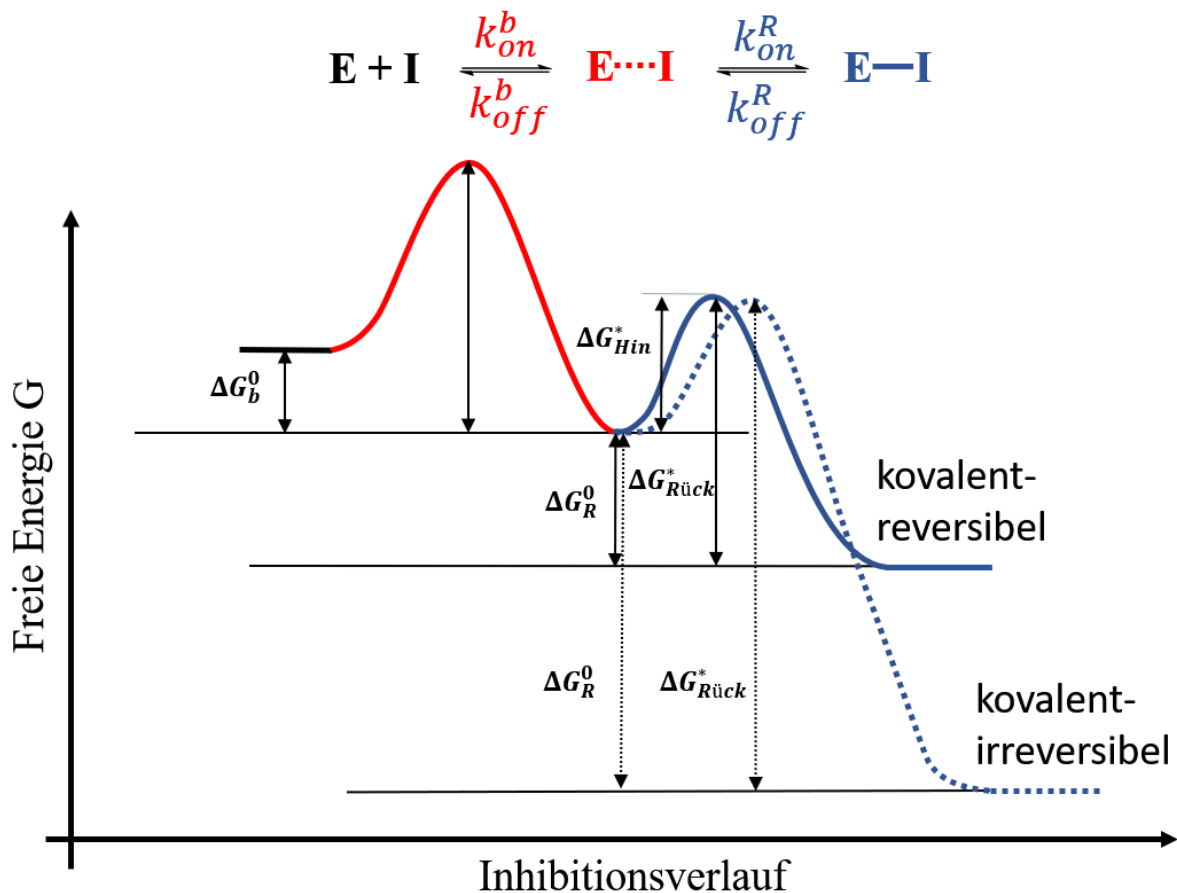


Abbildung 18: Energieprofile nicht-kovalenter (rot), kovalent-irreversibler (blau, gepunktet) und kovalent-reversibler (blau, durchgezogen) Inhibitoren.

Ein prominenter Vertreter eines kovalenten Inhibitors ist das Aspirin, dessen Wirkmechanismus in den vergangenen Jahren erneut detailliert diskutiert wurde<sup>117,118</sup>. Dabei gibt es viele Hinweise darauf, dass die hohe Deaktivierungsrate  $k_{\text{inact}}$  (durch rasche Acetylierung von Ser530) und damit die hohe Effizienz trotz vergleichsweise geringer Affinität zum aktiven Zentrum der Cyclooxygenase 1 ( $K_i$  ca. 20 mM) durch eine vorherige günstige räumliche Ausrichtung des Moleküls durch ladungsvermittelte Wasserstoffbrückenbindung zum Carboxylatrest eines benachbarten Arginins (Arg-120) erreicht wird<sup>117</sup>. Angelehnt an diesen Wirkmechanismus soll, durch eine Orientierung an substratähnlichen Strukturelementen sowie individueller Anpassung an vorhandene Aminosäurereste der aktiven Bindetasche der dGMII, einerseits Selektivität gegenüber ähnlichen Glycosidasen, sowie eine räumliche Orientierung der Inhibitoren ermöglicht werden, welche eine reversible Anbindung an ein Aspartat der katalytischen Triade erzielt. Dabei wird der Fokus auf Strukturelemente gelegt, die eine reversible Reaktion gestatten. Dadurch sollen Nebenwirkungen durch geringe Selektivität, wie sie bei irreversiblen Inhibitoren oder nicht Substrat-angelehnten Wirkstoffen wie Swainsonin oder Mannostatin

## Motivation und Zielsetzung

auftreten<sup>2,119,120</sup>, sowie vollständige Desaktivierung verhindert werden. Zudem soll die notwendige Konzentration zur Inhibition durch die dadurch erreichbare Verlängerung der Verweildauer im aktiven Zentrum stark gesenkt werden.

Nach QM/MM-Berechnungen (quantum mechanics/molecular mechanics) von Engels *et al.* ist eine kovalent reversible Anbindung an ASP204, gekoppelt mit einer ebenfalls reversiblen Ringöffnung (Abbildung 19) energetisch realistisch, wenn mindestens eines der acetalischen Sauerstoffatome durch andere Heteroatome wie Stickstoff oder Schwefel ersetzt werden.

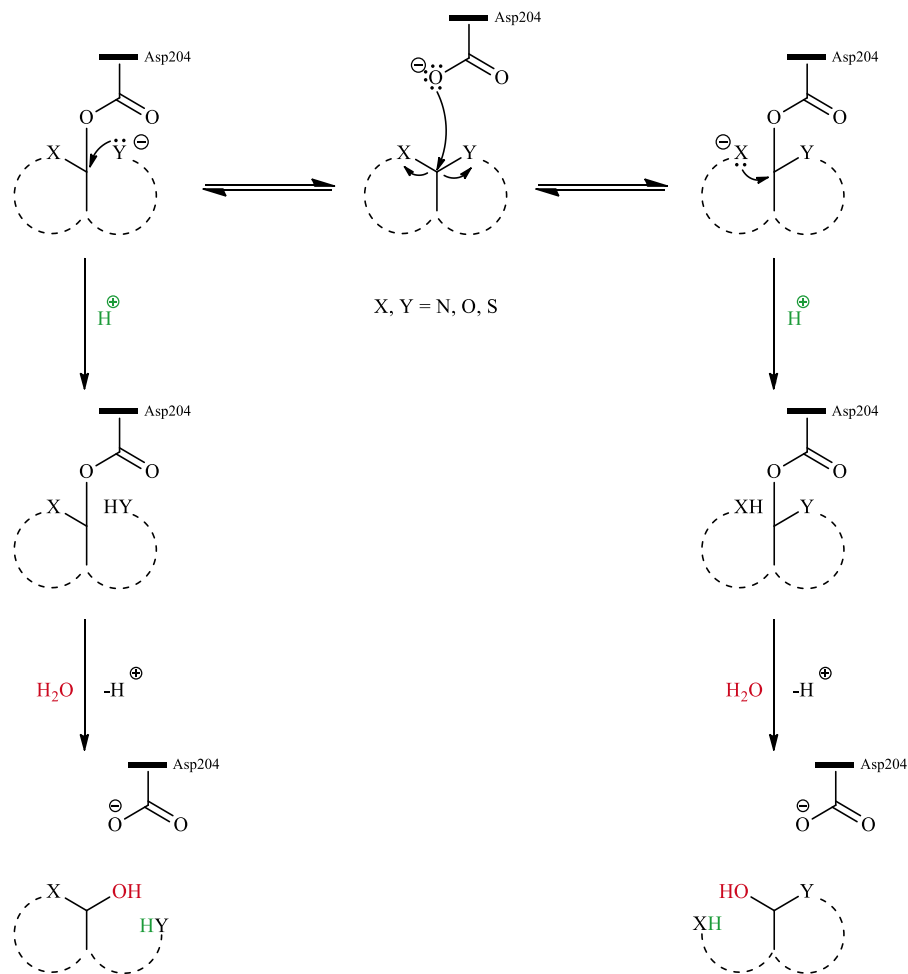


Abbildung 19: Mögliche Reaktionswege für die reversibel kovalente Inhibition durch bicyclische Acetale. Die Ringgröße ist variabel.

Die durch den Angriff von Asp204 entstehenden Anionen sind theoretisch zur Rückreaktion befähigt. Damit würde der Inhibitor zurückgebildet werden und stünde für einen weiteren Angriff zur Verfügung. Sollte das nach dem Angriff von Asp204 entstehenden Anion jedoch protoniert werden, ist diese Rückreaktion nicht mehr möglich. Zur Wahrung der Reversibilität

## Motivation und Zielsetzung

steht dann nur noch die Hydrolyse der Bindung zwischen Asp204 und dem Inhibitor zur Verfügung, wie sie auch bei der Prozessierung von Substraten stattfindet.

### 2.2.1 Spiroacetale

Da theoretisch auch Spiroverbindungen in der Lage sein sollten, gemäß Abbildung 20 eine kovalent-reversible Reaktion mit einem Aspartat einzugehen, wurde die Modellverbindung **pMSP** hinsichtlich der Eignung dieser Verbindungsklasse als potentielle Glycosidase-Inhibitoren untersucht.

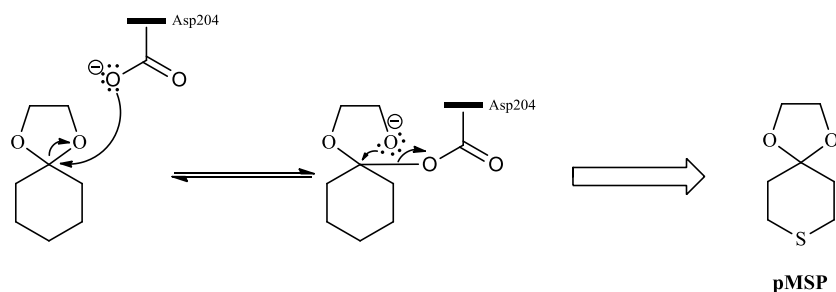


Abbildung 20: Mechanismus der kovalent reversiblen Anbindung von Spiroverbindungen an Aspartate und Struktur der untersuchten Modellverbindung pMSP (para-MercaptoSPiroacetal).

### 2.2.2 Monocyclische *N,O*-Acetale

Als ebenfalls energetisch günstig für eine kovalente Anbindung an Asp204 wurden mittels QM/MM-Rechnungen (quantum mechanics/molecular mechanics von *Engels et al.*) *N,O*-Acetale auf Mannosebasis gefunden. Theoretisch wären diese Strukturen zu einer reversiblen, kovalenten Anbindung befähigt, wobei die ursprüngliche Struktur bei der Bindungsknüpfung verloren ginge. Somit wären sie potentielle einmalig kovalent reversible Inhibitoren (vgl. Kapitel 2.2 Potentiell kovalent reversible bicyclische Acetale).

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit monocyclische *N,O*-Acetale als potentiell kovalent reversible Inhibitoren untersucht, welche theoretisch bei geeigneter räumlicher Nähe zum Asp204, je nach Richtung der Bindungsspaltung (Vgl. Abbildung 21) reversibel oder pseudoreversibel binden könnten.

## Motivation und Zielsetzung

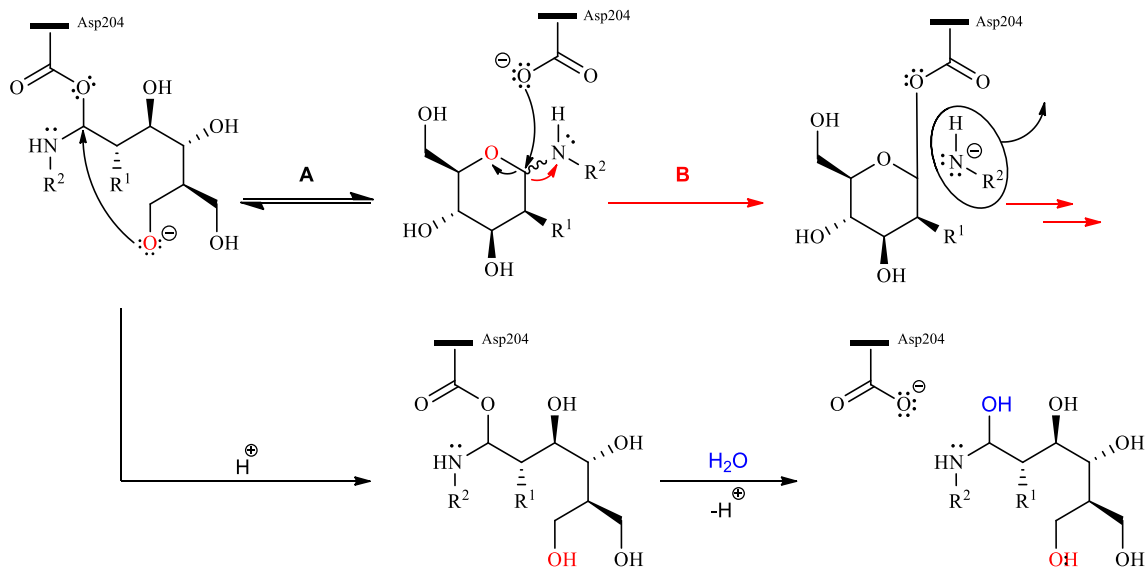


Abbildung 21: Postulierte Ringöffnungen von monocyclischen *N,O*-Acetalen durch Asp204. Im Falle einer Protonierung entweder des Alkoholats (Weg A) oder des Amids (Weg B), ist keine Rückreaktion mehr, sondern nur noch die Hydrolyse der Asp-Inhibitor-Bindung möglich. Die Rückreaktion von Weg B ist zudem sehr unwahrscheinlich, da das abgespaltene Amid abdiffundieren und sich nicht mehr in räumlicher Nähe zum acetalischen Kohlenstoff befinden dürfte.

Bei einer Ringöffnung (Reaktionsweg A in Abbildung 21) wäre der Wirkmechanismus als kovalent reversibel aus Sicht des Inhibitors diskutabel, solange das entstandene Alkoholat nicht protoniert wird. Die Rückreaktion für Weg B ist von vornherein unwahrscheinlich, da sich das abgespaltene Amid wohl durch Diffusion nicht mehr in räumlicher Nähe zum acetalischen Kohlenstoff befinden dürfte. Im Falle einer Protonierung wäre die Rückreaktion ebenfalls nicht mehr möglich. Für diese Fälle stünde der bereits in Kapitel 1.4.2 (Abbildung 10) beschriebene Abspaltungsmechanismus des Enzyms, wie er auch mit dem natürlichen Substrat vollzogen würde, weiterhin offen. Dabei würde der Zuckerrest wieder abgespalten werden, und der Wirkmechanismus wäre aus Sicht des Enzyms kovalent reversibel, der Inhibitor wäre allerdings modifiziert worden und könnte nicht erneut angegriffen werden. Daher wird dieser Weg als pseudoreversibel aus Sicht des Inhibitors angesehen.

## 2.3 Nicht-kovalente Inhibitoren

### 2.3.1 Isofagomin

Als ebenfalls interessante, aber kommerziell nicht als Synthesebausteine verfügbare Verbindungen, wurden Isofagomin und dessen *5-epi*-Isomer (siehe Abbildung 22) untersucht. Dabei sollte es, als bekannter potenter Inhibitor von  $\beta$ -Glucosidasen<sup>78</sup>, zur Etablierung des

## Motivation und Zielsetzung

entsprechenden fluorometrischen Assays sowie als Modellsubstanz für weitere Derivatisierungen synthetisiert werden. Es waren Derivatisierungen insbesondere an den Positionen  $R_a$  und  $R_b$  geplant (Abbildung 22).

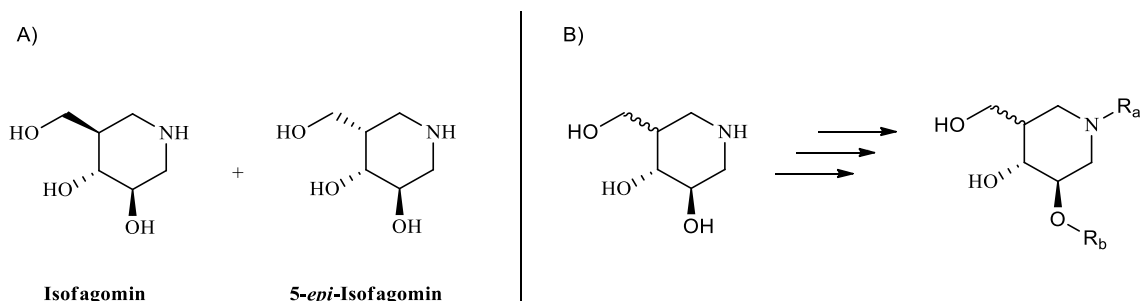


Abbildung 22: A) Struktur von Isifagomin und 5-epi-Isifagomin, B) Derivatisierungsoptionen für Isifagomin und dessen 5-Epimer

### 2.3.2 Azamannose als Synthesebaustein

Als etwaige Vorläuferverbindungen für potentielle kovalent reversible Inhibitoren mit Stickstoff als Heteroatom im Zuckergerüst (siehe Abbildung 23) sollte Azamannose synthetisiert werden.

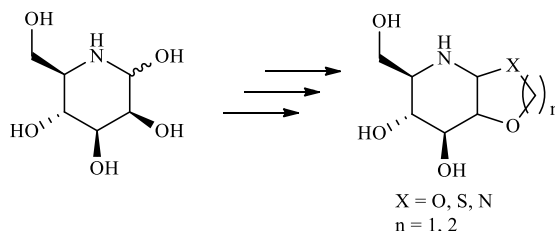


Abbildung 23: Azamannose als Vorläuferverbindung zu kovalent reversiblen Inhibitoren der GMII

## 2.4 Allosterische Inhibitoren

Neben potentiellen Inhibitoren für das aktive Zentrum der GMII sollten, aufgrund der Identifizierung einer potentiellen allosterischen Bindetasche in der GMII durch Lina Irsheid<sup>121</sup>, auch vier strukturell eng verwandte potentielle Inhibitoren für diese Tasche für die Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen synthetisiert werden (siehe Abbildung 24).

## Motivation und Zielsetzung

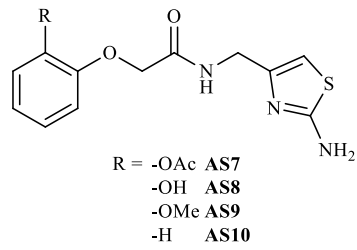


Abbildung 24: Vier strukturell eng verwandte, potentiell allosterische Inhibitoren der GMII zur Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Dockingstudien und Synthesen

##### 3.1.1 Potentiell kovalent reversible Acetale

###### 3.1.1.1 Design von L039 durch De-Novo-Design und molekulares Docking

Ausgehend von der bicyclischen Acetal-Grundstruktur wurde eine optimierte Verbindung entwickelt, indem das Grundgerüst an verschiedenen Stellen modifiziert und wiederholt gedockt wurde, bis zunächst die von *Engels et al.* (JMU Würzburg, nicht veröffentlichte Daten) zuvor bestimmten Randbedingungen erfüllt waren. Diese lauteten:

- Bicyclisches Acetal mit Fünf- oder Sechsringen
- Einer der internen Sauerstoffatome durch Schwefel oder Stickstoff ersetzt
- Zweifache Koordination des zentralen Zinkatoms im Enzym
- Mindestens eine der Zinkkoordinationen durch ein internes Heteroatom

Von dort an wurde das Molekül gezielt zur Ausbildung von Wechselwirkungen mit umliegenden Aminosäuren modifiziert, bis ein Molekül erhalten wurde, welches einen Hyde-Score von  $-35 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$  und einer LE von  $0.35 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$  besitzt (vgl. Swainsonin im Redocking:  $\Delta G_{\text{HYDE}} = -32 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ ,  $\text{LE} = 0.64$ ) liegt. Dies entspricht gemäß Gleichung 3 einem  $K_d$  von  $8 \mu\text{M}$ . Im Vergleich dazu entspräche nach Hopkins *et al.*<sup>122</sup> eine LE von  $0.29 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$  einem  $K_d$  von  $10 \text{ nM}$  für einen Inhibitor mit einem Molekulargewicht von  $500 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  (Gleichung 2).

$$\Delta G = RT \ln K_d \rightarrow K_d = e^{\frac{\Delta G}{RT}}$$

Gleichung 3: Zusammenhang zwischen  $\Delta G$  und der Gleichgewichtskonstante  $K_d$

###### 3.1.1.1.1 Docking

Die Parameter für das Docking zu dem Strukturdesign zu L039 wurden auf den in Tabelle 1 aufgeführten Standardeinstellungen belassen:

## Ergebnisse

Tabelle 1: Parameter für das Docking mit FlexX für das De-Novo-Design von L039

- Als Bindetasche für das Docking wurden alle Aminosäure-Reste innerhalb eines Radius von 8 Å um Swainsonin in der Kristallstruktur (pdb: 1HWW) definiert.
- Als Docking-Strategie wurde ein Hybrid-Ansatz gewählt, welcher Enthalpie und Entropie berücksichtigt.
- Das maximal erlaubte Überlappungsvolumen betrug 2.9 Å<sup>3</sup>.
- Der interne Kollisionsfaktor (Clash-factor) wurde zu 0.6 definiert.
- Die Koordination des zentralen Zinkions durch mindestens ein Heteroatom wurde als essentielles Pharmakophor in LeadIT vorgeschrieben.
- Die Aspartate wurden in deprotonierter Form definiert

Diese Parameter wurden durch Redocking des Referenzliganden aus der Kristallstruktur verifiziert. Dabei wird ein RMSD-Wert von 0.6995 erreicht. Die überlagerten Strukturen des Referenzliganden sowie des gedockten Swainsonins sind in Abbildung 25 dargestellt.

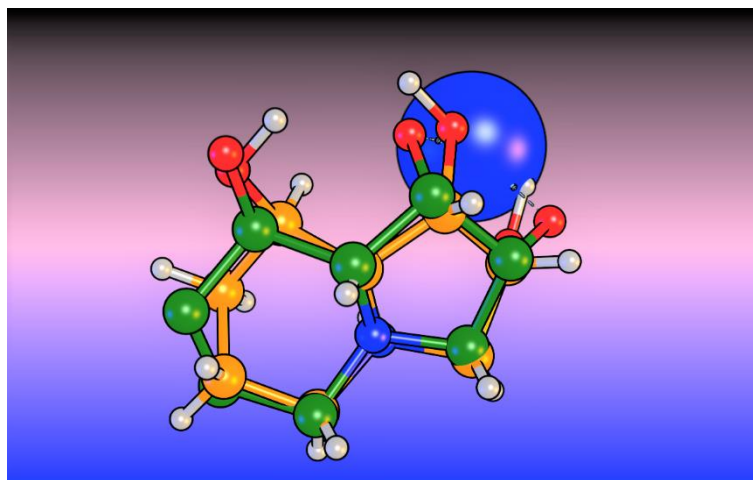


Abbildung 25: Überlagerte Strukturen von Swainsonin im Redocking (gelbe Struktur) sowie des Referenzliganden in der Kristallstruktur der GM II mit dem PDB-Code 1HWW. Das zentrale Zinkion ist in blau dargestellt.

### 3.1.1.1.2 Design von L039

Durch De-Novo-Desing und Docking konnte eine vielversprechende Struktur **L039** vorgeschlagen werden, die allen, bis dahin postulierten Anforderungen, (vgl. Kapitel 3.1.1.1) genügte.

Ausgehend von der minimalen bicyclischen Verbindung **L002** wurden sukzessive Modifikationen eingebaut. Angefangen von verschiedenen Ringgrößen über unterschiedliche



## Ergebnisse

Substitutionsmuster sowie verschiedenen Stereokonfigurationen wurde als beste Grundstruktur zunächst **L022** identifiziert. Ausgehend von der räumlichen Ausrichtung dieser Struktur wurden weitere Substituenten eingeführt, um umliegende Aminosäuren zu adressieren. Einige essenzielle Stationen des Designprozesses sind im folgenden Schema (Abbildung 26) dargestellt und in Tabelle 2 näher erläutert.

# Ergebnisse

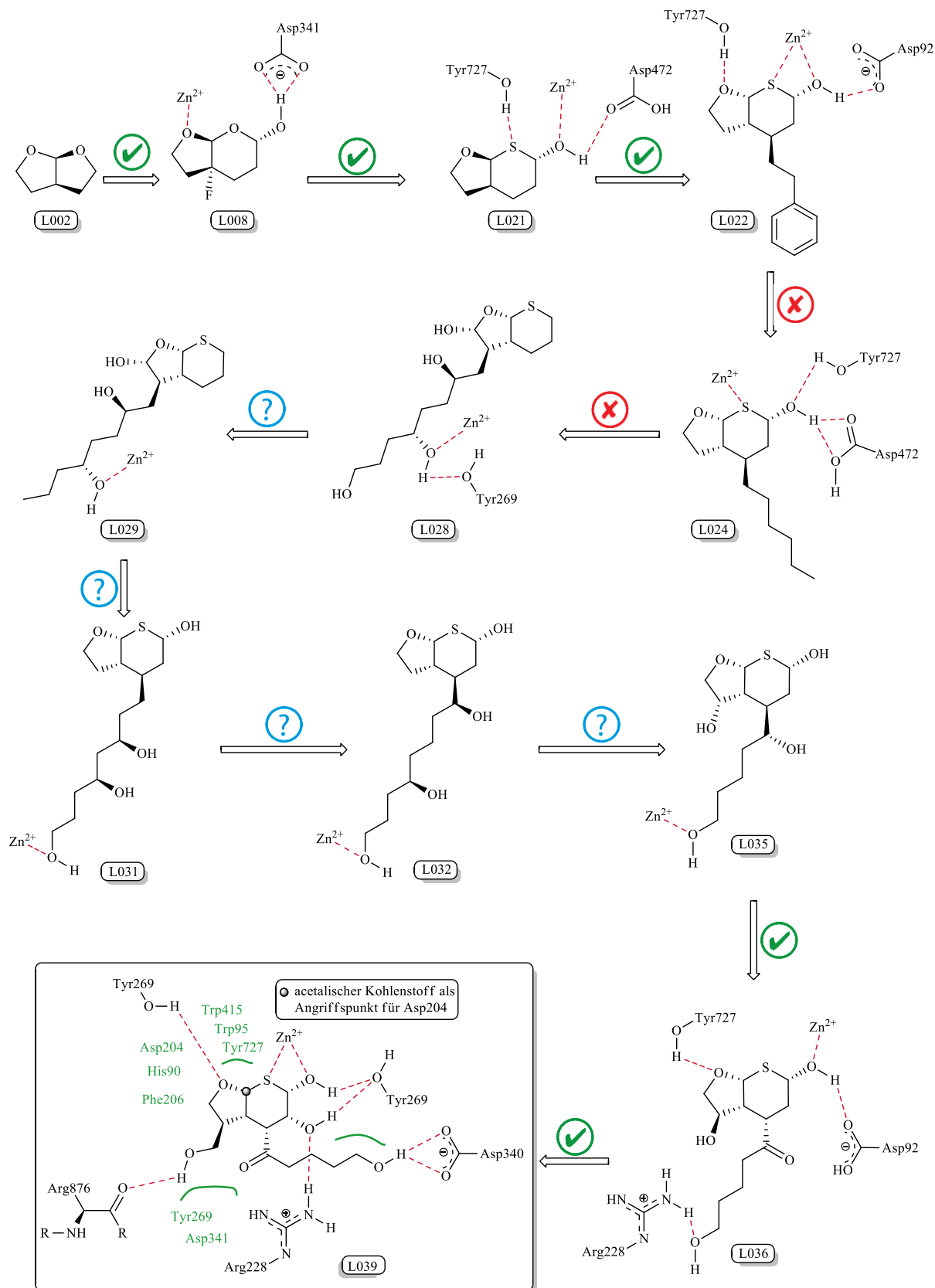
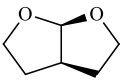
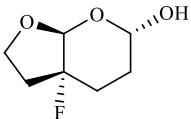
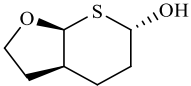
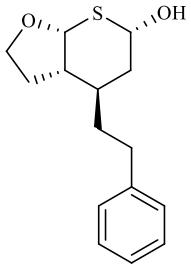


Abbildung 26: Fließschema des Designprozesses zu **L039**. Dargestellt sind ausgewählte Verbindungen aus dem Strukturfindungsprozess, welche auch in Tabelle 2 beschrieben sind. Bis auf die Endverbindung sind nicht immer alle von FlexX berechneten Wechselwirkungen dargestellt. Grüne Haken zeigen eine Verbesserung des Dockingergebnisses, rote

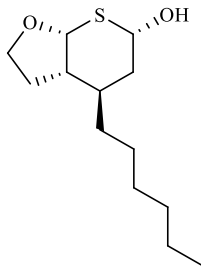
## Ergebnisse

Kreuze eine Verschlechterung und Fragezeichen Indifferenz bezüglich der Erfüllung der notwendigen Parameter (vgl. Kapitel 3.1.1.1).

Tabelle 2: Übersicht und Erläuterungen zu ausgewählten Verbindungen im Designprozess von **L039**

Struktur	Modifikation	$\Delta G_{HYDE}^*$	Effekt	LE**
 <p>L002</p>	Startpunkt	-3		0.08
 <p>L008</p>	Einführung-OH/F Substituen	-6	+ Adressierung von Asp341	0.12
 <p>L021</p>	Entfernung des Fluor- Substituenten	-8	+ Adressierung von Asp472 und Zn - WW Ringschwefel nur noch mit Tyr727	0.19
 <p>L022</p>	Einführung eines Ethylphenylrestes	-24	+ Zweifache Koordination des Zn + Ringsauerstoff adressiert Tyr727 + $\pi$ -Stacking des Phenylrings - Entfernung Acetal-C - Asp204 zu groß (5.5 Å)	0.31

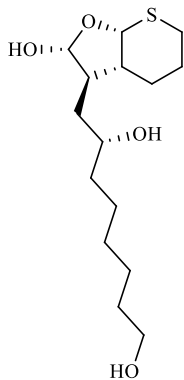
## Ergebnisse



L024

Austausch des Phenylrings -4  
durch reine aliphatische  
Kette

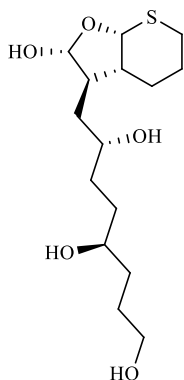
+ Entfernung 0.06  
Acetal-C -  
Asp204 zu groß  
(3.2 Å)  
– Einfachkoordinati  
on des Zn  
– Falsche Geometrie  
für Asp204-  
Angriff



L028

- Einführung von -OH am -22  
Fünfring
- Einführung eines  
Polyalkohols am  
Fünfring

Völlig falsche 0.24  
räumliche Lage der  
ersten  
Dockingposen,  
Koordination des Zn  
durch externe OH-  
Gruppen

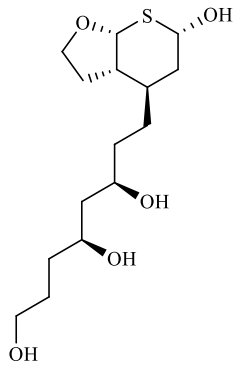


L029

Entfernung des -15  
Endständigen OH-Gruppe

Siehe L028 0.17

## Ergebnisse



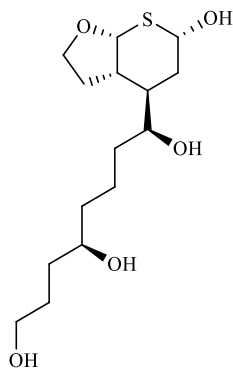
L031

Verlegung der  
Polyalkoholgruppe an den  
Sechsring

+1

Siehe L028

0.00



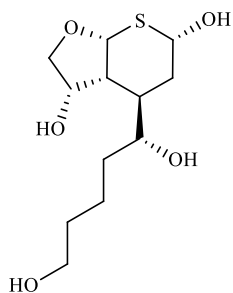
L032

Verlegung einer der OH-  
Gruppen des  
Polyalkoholrestes näher  
zum Ring

-33

Siehe L028

0.37



L035

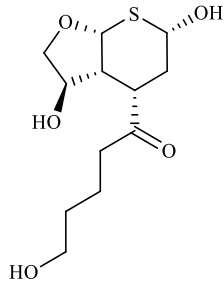
Einführung einer weiteren  
Hydroxylgruppe am  
Fünfring

-26

Siehe L028

0.34

## Ergebnisse



L036

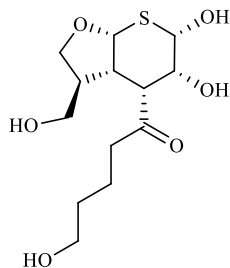
- Entfernung von einer Hydroxidgruppe am Polyalkohol
- Ersetzen der OH-Gruppe an 1-Position der Alkylkette durch Carbonylfunktion

-9

- + Koordination des Zn durch die dem Ringschwefel benachbarten OH-Gruppe
- + Korrekte Ausrichtung des Acetalkohlenstoffs für Angriff
- zu großer Abstand (5.5 Å)

0.12

## Ergebnisse



L039

- Modifizierung der OH-Gruppe am Fünfring hin zu einer Hydroxymethylen-gruppe -29
- Einführung einer weiteren OH-Gruppe am Sechsring

Die gesamte Struktur wird durch neue WW der Hydroxymethylen-Gruppe verschoben. 0.35

- + Neue WW von 5-Ring OH zu Arg876
- + Doppelte Koordination des Zn durch Schwefel und benachbarte OH-Gruppe
- + Korrekte räumliche Lage des acetalischen Kohlenstoffs
- + Realistischer Abstand zu Asp204 (3.8 Å) für nucleophilen Angriff

\*in  $\frac{kJ}{mol}$ , berechnet durch das HYDE-Assessment<sup>112</sup> in FlexX

\*\* in  $\frac{kcal}{Mol \cdot Anzahl\ Schweratome}$

Zugehörige Dockingposen einer Auswahl von Verbindungen aus dem Designprozess sind in Abbildung 27 gezeigt.

## Ergebnisse

Ausgehend von **L002** (Fünfring-Fünfring-Acetal, vgl. Abbildung 26) wurden zu Beginn verschiedene Substitutionsmuster mit Hydroxygruppen und Halogenatomen hinsichtlich ihrer Dockingergebnisse evaluiert. Auch wurden die Ringgrößen variiert. Dabei stellte sich heraus, dass Kombinationen aus Fünf- und Sechsring die günstigsten Positionen in der Bindetasche einnahmen. Um eine Koordination des Zinkions mit einem Heteroatom zu erreichen, musste dieser im Sechsring und nicht im Fünfring integriert sein. Wechselwirkungen von einem Phenylstrukturelement in **L022** zu Trp415 und dem Enzymrückgrat von Gly877 am Eingangsbereich der Bindetasche führten zu ungünstigen Entfernungen zum Asp204. Der Versuch, diese durch eine längere Kohlenstoffkette als Spacer zu verringern, schlug fehl. Auch die Adressierung des  $\pi$ -Systems von Tyr267 durch ein Proton einer endständigen Methylgruppe (um die bicyclische Struktur weiter in Richtung des Asp204 zu drängen), welches sich ebenfalls am äußersten Rand der Bindetasche befindet, führte zu keiner diesbezüglichen Verbesserung. Die Einführung von Hydroxygruppen an der aliphatischen Kette führte über mehrere Optimierungsversuche immer zur Koordination des Zinks durch eine dieser externen Sauerstoffatome, was zu einer völlig ungeeigneten Lage der Verbindungen in der Bindetasche führte (**L028-L035**), in der sich der elektrophile Kohlenstoff nicht mehr in der Nähe von Asp204 befand und auch keine Koordination des Zinkions mehr auftrat. Erst die Einführung einer Carbonylfunktion in direkter Nachbarschaft zum Sechsring (**L036**) in der Kohlenstoffkette führte zu einer Umorientierung der Struktur, wodurch das zentrale Zink-Atom wieder in die räumliche Nähe des ringinternen Schwefels kommt.



## Ergebnisse

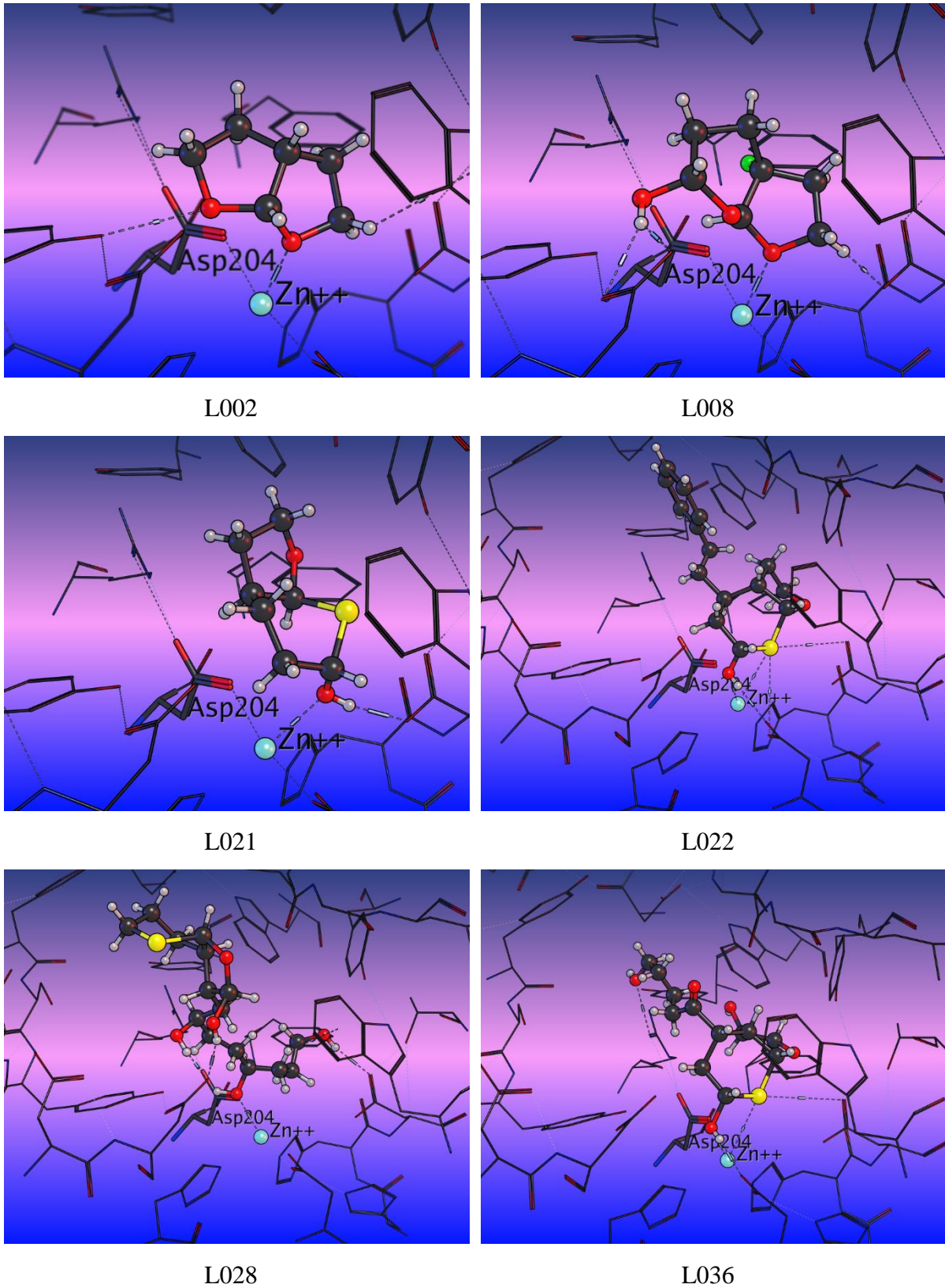


Abbildung 27: Dockingposen ausgesuchter Verbindungen im Designprozess zu L039

Da der ringinterne Sauerstoff jedoch eine Wechselwirkung mit dem Proton der Hydroxygruppe von Tyr727 eingeht, liegt der acetalische Kohlenstoff zu weit von Asp204 entfernt, um davon

## Ergebnisse

nucleophil angegriffen werden zu können. Versuche, eine weitere Wechselwirkung mit einer zweiten Hydroxygruppe am Fünfring (**L037**) oder am Sechsring zu erzeugen, schlugen fehl (**L037**, **L038**). Durch die Änderung der Stereokonfiguration des dem Schwefelatom gegenüberliegenden Kohlenstoffs von *S* zu *R*, sowie der Verlängerung durch Transformation zur Hydroxymethylgruppe (welche dann formal wieder *S*-konfiguriert ist), konnte eine weitere polare Wechselwirkung zum Peptidrückgrad von Arg876 erzeugt werden. Die endständige Hydroxygruppe wechselwirkt dann mit der Seitenkette von Asp340, welches ebenfalls am äußeren Rand der Bindetasche lokalisiert ist. Somit füllt diese Struktur die Bindetasche fast vollständig aus und adressiert weitestgehend konstruktiv die umliegenden Aminosäurereste. Das zentrale Zink ist zweifach koordiniert, davon einfach durch das ringinterne Schwefelatom (vgl. Abbildung 28). Die berechnete Affinität liegt mit  $-29 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$  im Bereich der berechneten Affinität von Swainsonin im Redocking ( $-32 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ ). Das in Kapitel 3.1.1.1.1 (Design von L039 durch molekulares Docking\De-Novo-Design) beschriebene Pharmakophor zur Erzwingung der Zink-Koordination ist dabei nicht mehr notwendig. Die erhaltene Dockingpose ist die energetisch günstigste.

## Ergebnisse

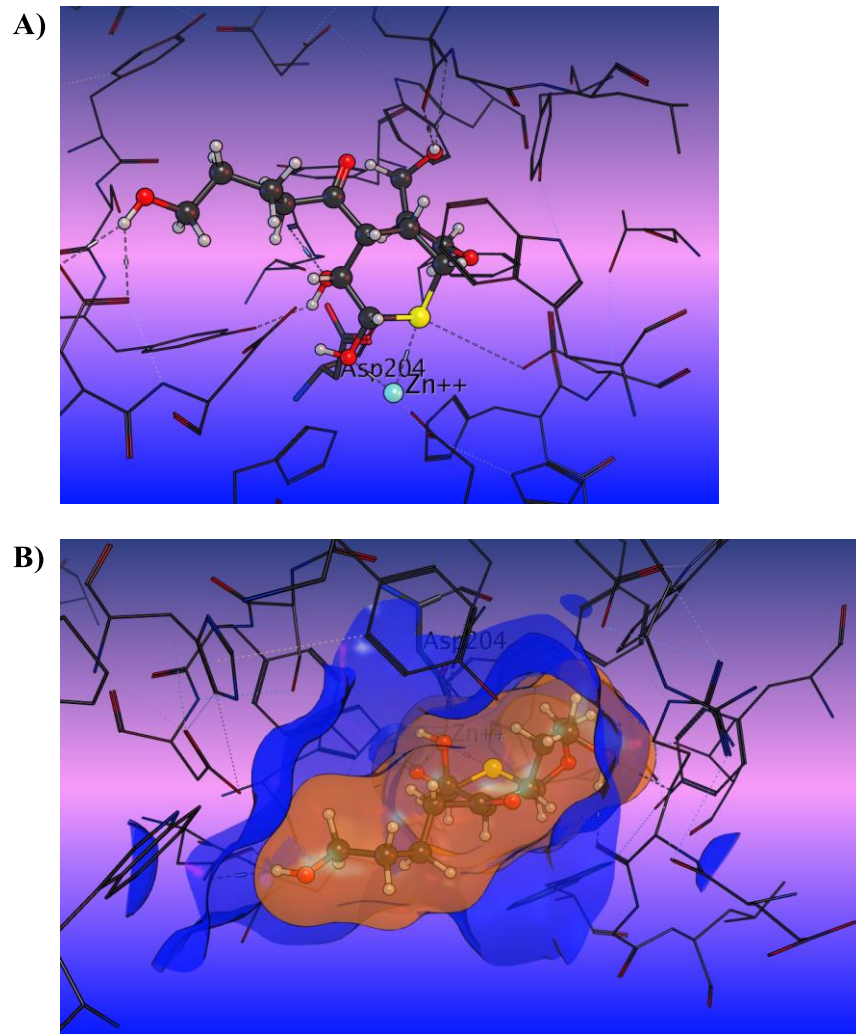


Abbildung 28: Berechnete Bindepose von **L039** in der Bindetasche der GMII (pdb: 1HWW), **A**) zur Veranschaulichung der Wechselwirkungen und der räumlichen Lage, **B**) zur Veranschaulichung der Raumfüllung der Bindetasche. Dabei ist die Oberfläche der Bindetasche in blau, die von **L039** in orange dargestellt.

## Ergebnisse

### 3.1.1.1.3 Synthese von L039

Nach der Identifizierung der Struktur **L039** im strukturbasierten Docking wurde das Molekül retrosynthetisch zunächst in zwei Bausteine zerlegt (Abbildung 29).

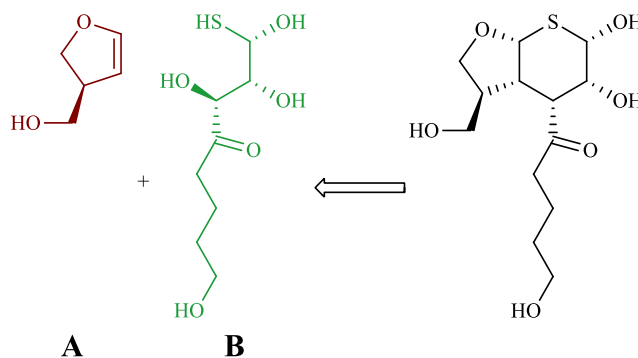


Abbildung 29: Retrosynthetische Zerlegung von L039 in zwei Bausteine **A** und **B**

In der Literatur waren bicyclische Acetale mit Sauerstoff und Schwefel lediglich von *Ergunes* und *Talinli*<sup>123</sup> in einer simplen Kondensationsreaktion von Diolen an Dihydropyran beschrieben (vgl. Abbildung 30).

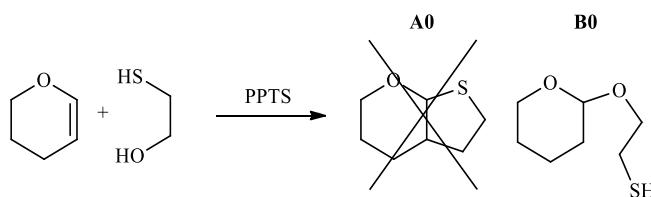


Abbildung 30: Beschriebene Kondensationsreaktion als Modellreaktion zur Kombination der Blöcke **A** und **B** nach *Talinli*<sup>123</sup>

Laut Literatur<sup>123</sup> soll sich dabei der Bicyclus **A0** bilden. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die offenkettige Verbindung **B0** als Produkt identifiziert.

# Ergebnisse

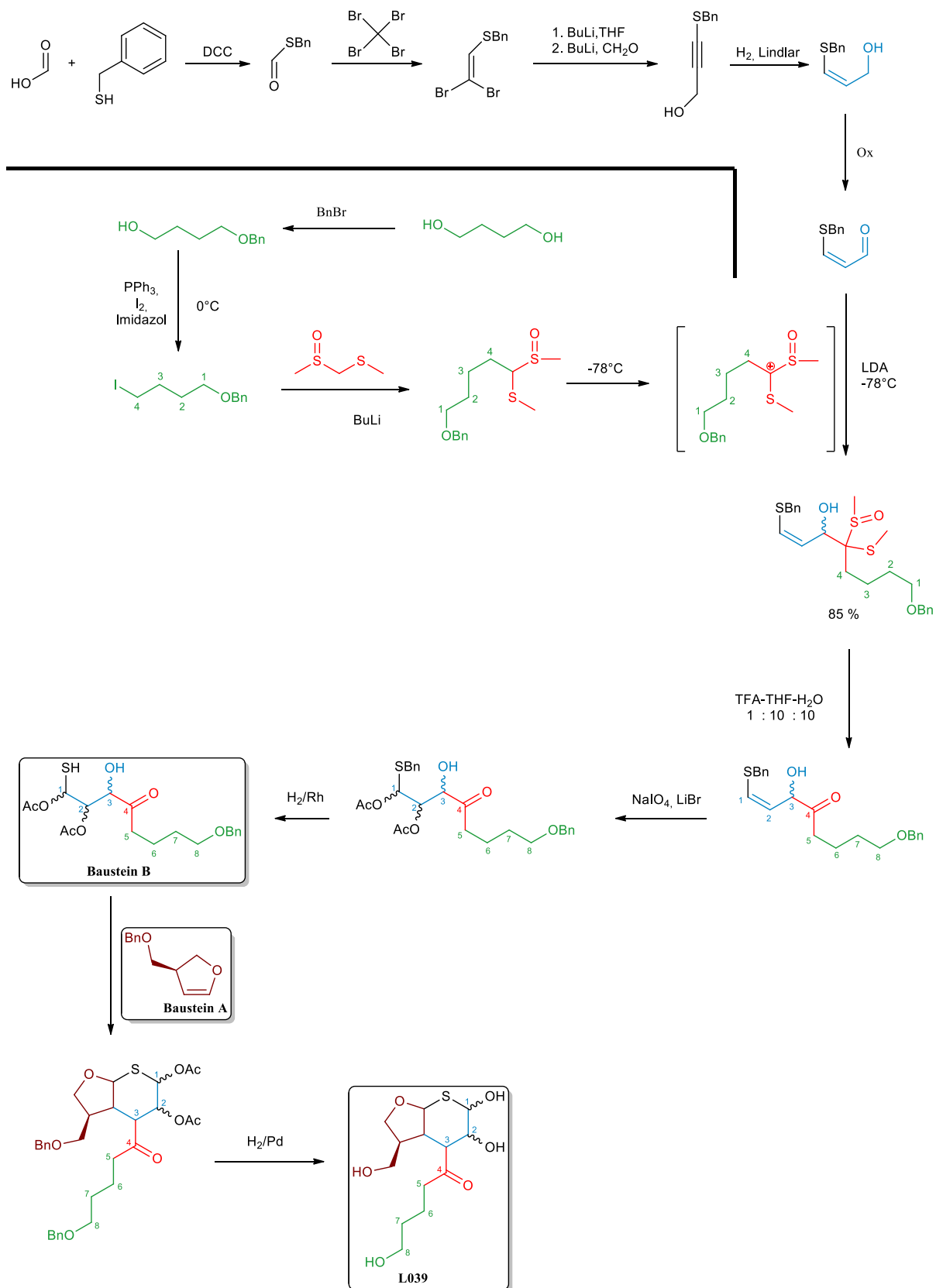


Abbildung 31: Geplante Syntheseroute von Baustein B sowie die Verknüpfung von Baustein A und B zu L039

## Ergebnisse

Die essentielle Kombination der beiden Bausteine **A** und **B** zur Bildung des Bicyclus war in der Literatur kaum beschrieben. Deshalb wurde sie im Vorfeld untersucht. Da die entsprechenden Edukte zunächst jedoch nicht zur Verfügung standen, im Gegensatz zu den benötigten Chemikalien für die Synthese von Baustein **A**, wurde dessen Synthese nach dem in Abbildung 32 gezeigten Schema bis zur Stufe **A4** nach *Pelter* und *Ward*<sup>124</sup> vorgezogen. **A4** konnte in 19%iger Aubeute über fünf Stufen dargestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt waren die Edukte für die Untersuchung der Möglichkeiten für die Bildung des Bicyclus verfügbar.

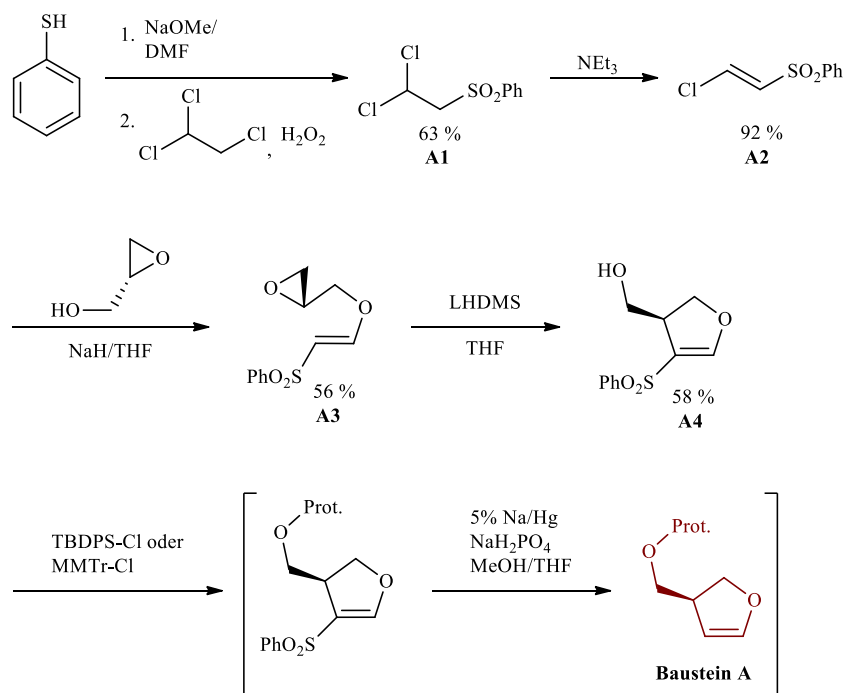


Abbildung 32: Syntheseroute zum Baustein **A** von L039 (rot, vgl. Abbildung 31)

Um die Realisierbarkeit der Verknüpfung der Bausteine **A** und **B** in Abbildung 29 zu untersuchen, wurde diese Reaktion zunächst am stark vereinfachten Testsystem aus 3,4-Dihydro-2*H*-pyran und 2-Mercaptoethanol mit PPTS versucht. Diese Synthese war als einzige zur Bildung von bicyclischen *S,O*-Acetalen in der Literatur beschrieben<sup>123</sup>. Anstelle der gewünschten und in der Literatur beschriebenen Verbindung **A0** konnte allerdings ausschließlich die offenkettige Verbindung **B0** (Abbildung 30) gebildet werden. Dies zeigt sich in folgenden Analyseergebnissen:

1. Das <sup>1</sup>H-NMR zeigt 14 Protonen für **B0** anstelle von 12 für **A0**
2. Die chemische Verschiebung des acetalischen Kohlenstoffs ist mit  $\delta = 97.6$  ppm zu hoch für ein *O,S*-Acetal (ca. 80-85 ppm), und entspricht der eines *O,O*-Acetals

## Ergebnisse

3. Das DEPT135- $^{13}\text{C}$ -Spektrum zeigt einen tertiären Kohlenstoff (den acetalischen) sowie sechs sekundäre Kohlenstoffe für die übrigen  $\text{CH}_2$ -Gruppen, was die Anzahl der gefundenen Protonen ( $1 \times \text{SH} + 1 \times \text{CH} + 6 \times \text{CH}_2 = 14$  Protonen) bestätigt

Ein Vergleich des gemessenen DEPT135- $^{13}\text{C}$ -Spektrums mit berechneten Spektren sowohl für **A0**, **B0** als auch das zu **B0** analoge *S,O*-Acetal ist in Abbildung 33 gezeigt.

Da die gefundenen NMR-Daten deckungsgleich mit den in der Literatur beschriebenen sind, handelt es sich in der Literatur offensichtlich um einen Fehler. Dort wurde auf Korrelationsspektren verzichtet, welche belegen, dass es sich bei der gebildeten Spezies nur um die gezeigte Verbindung **B0** handeln kann.

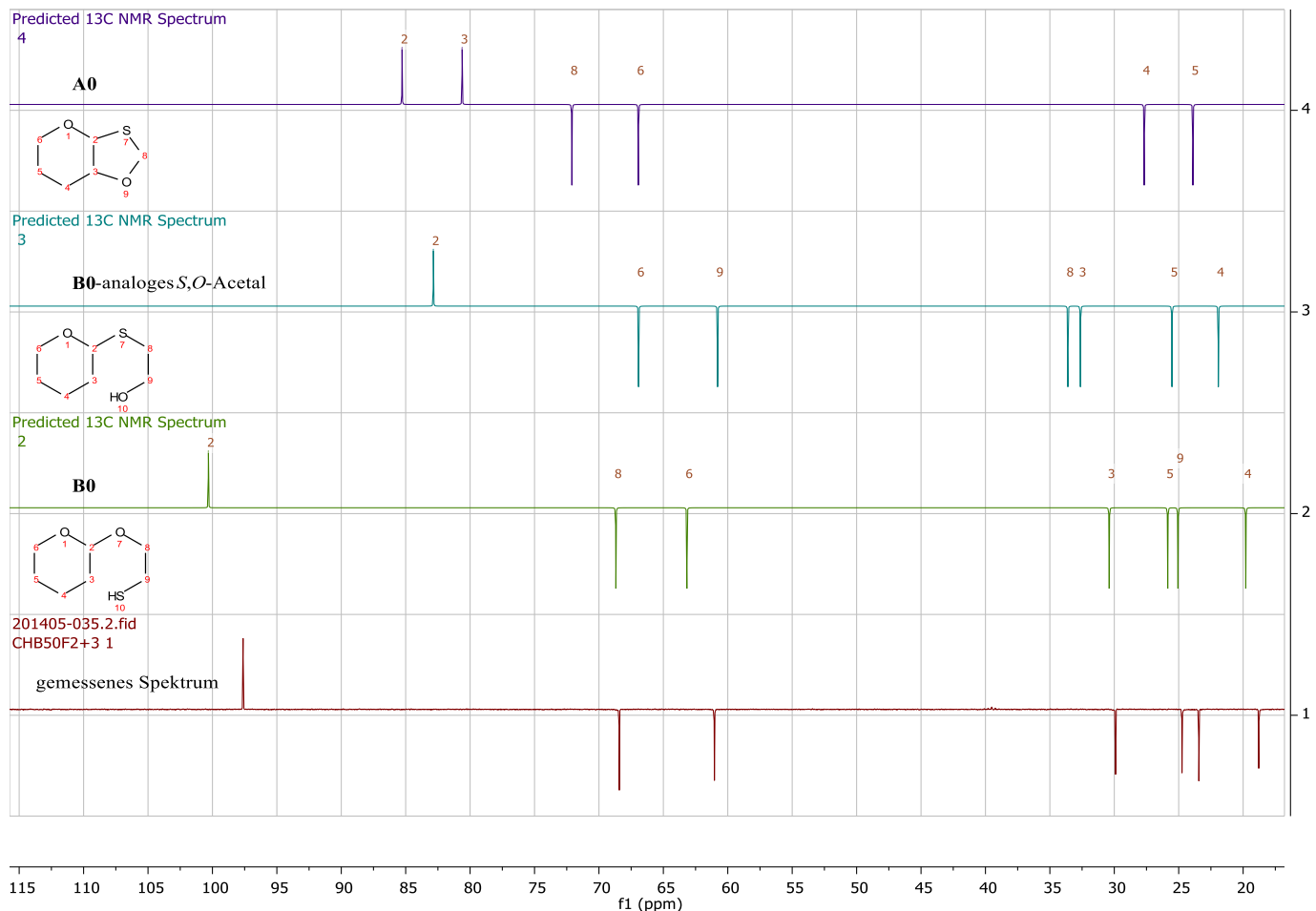


Abbildung 33: Vergleich von berechneten  $^{13}\text{C}$ -Spektren (4, in lila): der Verbindung **A0**, (3, in türkis): dem zu **B0** analogem *S,O*-Acetal, (2, in grün) der Verbindung **B0** sowie dem gemessenen Spektrum (1, in rot). Die Berechnung der Spektren erfolgte durch den *Mnova Best*-Algorithmus für eine Frequenz von 75 MHz, wie er in *MestReNova* 12.0.4 implementiert ist.

## Ergebnisse

Als alternativer Weg wurde deshalb versucht, Mercaptoacetaldehyd an ein 1,2-dihalogeniertes Pyran anzubringen, um im Anschluss über eine *Barbier*-Reaktion<sup>125</sup>, bei der es sich um eine intramolekulare *Grignard*-Reaktion handelt, den Ring zu schließen (Abbildung 34).

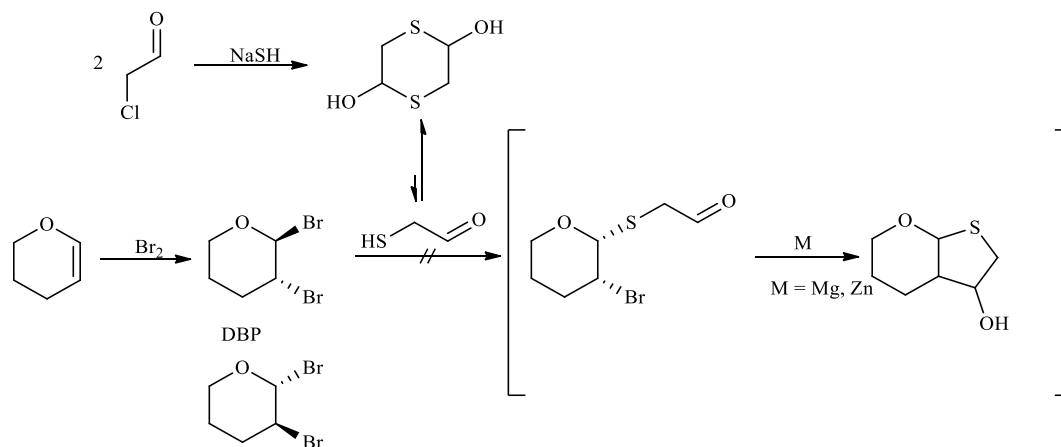


Abbildung 34: Alternative Ringschlussreaktion im Sinne einer *Barbier*-Reaktion<sup>125</sup>

Die Bromierung von 3,4-Dihydro-2*H*-pyran mit elementarem Brom zur racemischen Mischung der beiden *trans*-Isomere<sup>126</sup> (DBP) war erfolgreich. Eine direkte Umsetzung mit 2-Mercaptoacetaldehyd, welches aus Chloracetaldehyd und Natriumhydrogensulfid gewonnen wurde<sup>127</sup>, konnte nicht erreicht werden, was auf eine ungünstige Gleichgewichtslage der Dimerisierung des Mercaptoacetaldehyds zurückzuführen ist. Deshalb wurde der Umweg über die analoge, acetalgeschützte Komponente versucht. Hierzu musste zunächst ein 2,2-Dialkoxyethanthiol synthetisiert werden. Als prinzipiell herstellbar erwies sich diese Verbindung (Abbildung 35) durch die Umsetzung von 2-Bromo-1,1-diethoxyethan mit Natriumhydrogensulfid. Da diese Komponente jedoch schon bei der Herstellung zum Disulfid dimerisierte, das Produkt nicht abgetrennt werden konnte und diese Dimere nicht unter den notwendigen Bedingungen für eine Kopplung an das Dibromopyran gespalten werden konnten, wurde diese Syntheseroute verworfen. Hiernach wurde versucht, die Kopplung über das entsprechende Xanthogenat **AMA** durch *in situ* Entschützung mit Ethylendiamin<sup>128</sup> zu bewerkstelligen, was allerdings ebenfalls fehlschlug (siehe Abbildung 35).



## Ergebnisse

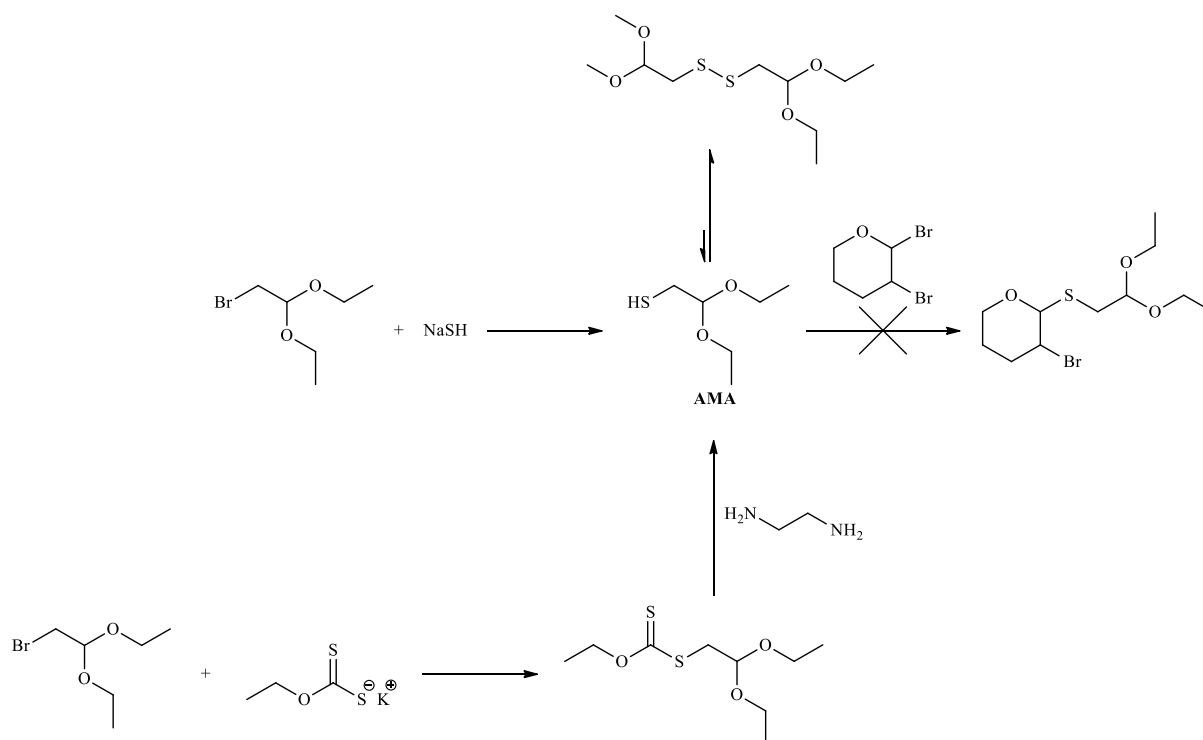


Abbildung 35: Versuche der Darstellung des Precursors für die *Barbier*-Reaktion

In allen Versuchen der direkten Umsetzung von Rohprodukt mit Dibrompyran konnte kein Kupplungsprodukt gebildet werden.

Abschließend wurde versucht, ein einfaches bicyclisches Gerüst mit  $\alpha$ -Mannosekonfiguration (**C4** vgl. Abbildung 36) zu synthetisieren.

Hierzu wurde zunächst peracetylierte Mannose in 1-Position bromiert und dann mit Thioharnstoff zum entsprechenden Thiopseudourea-Hydrobromid umgesetzt, aus welchem durch Reduktion mit Kaliumpyrosulfit das 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-thio- $\alpha$ -*D*-mannopyranosid gebildet wurde (siehe Abbildung 36).

## Ergebnisse

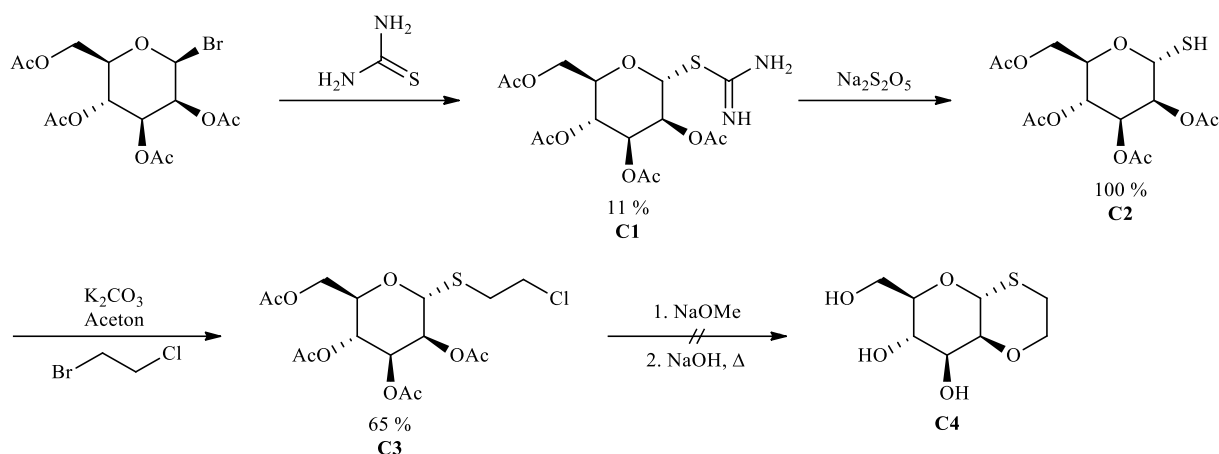


Abbildung 36: Syntheseroute zur *S*, *O*-acetalischen, bicyclischen Verbindung **C4**

Der Drehwert der peracetylierten,  $\alpha$ -konfigurierten Vorstufe **C3** sollte laut Wang *et al.*<sup>129</sup> für das analoge Bromderivat  $+65^\circ$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) betragen. Gefunden wurden  $+84^\circ$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), was erfahrungsgemäß für die angenommene  $\alpha$ -Konfiguration spricht. Der Vergleich des Drehwerts von  $\alpha$ - und  $\beta$ - Anomeren zeigt durchweg Inversion des Drehsinns (wohlgermerkt nicht des Absolutwerts (vgl. Tabelle 3)). Das entsprechende Chlorid ist nicht literaturbekannt. Die Kopplungskonstante des Protons an C1 im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zum Proton an C2 von 1.5 Hz unterstützt diese Annahme. Nach der Karplus-Beziehung<sup>130</sup> ist für vicinale Kopplungen mit dieser Stärke ein Dihedralwinkel von  $60^\circ - 75^\circ$  bzw.  $100^\circ - 115^\circ$  notwendig. Die MMFF94<sup>131</sup>-energieminimierte Struktur hat einen dihedralen Winkel zwischen H1 und H2 von  $71^\circ$  und ist somit in guter Übereinstimmung mit den Messergebnissen.

## Ergebnisse

Tabelle 3: Vergleich der Drehwerte von verschiedenen  $\alpha$ - und  $\beta$ - Anomeren von *Bott* und *Harworth*<sup>132</sup>

Verbindung	$[\alpha]_D$	$[\alpha]_D$	Lösemittel
	$\alpha$ -Anomer	$\beta$ -Anomer	
Tetraacetyl- methylmannopyranosid	+49°	-46.8°	Chloroform
Tetramethyl- methylmannopyranosid	+43°	-80°	Wasser
	+57°	-87°	Chloroform
	+75.5°	-82.5°	Ethanol
	+77°	-72°	Benzen
Methylmannopyranosid	+79°	-66°	Wasser

Demnach wäre der Ringschluss nach der vielfach erprobten Methode von *Helferich* und *Werner*<sup>133–135</sup> durch Verseifung der Chloridfunktion und anschließender nucleophiler Substitution sterisch günstig und von der räumlichen Lage her möglich. Vor der Ringschlussreaktion wurden zunächst alle Acetylschutzgruppen mit Natriummethanolat abgespalten. Der anschließende Ringschluss im Sinne einer intramolekularen *Williamson*-Ethersynthese durch Kochen mit verdünnter Natronlauge konnte jedoch nicht realisiert werden. Das Produkt wurde (laut LC/MS) nicht einmal in Spuren gebildet. Der Einfluss der Größe von Schwefel gegenüber Sauerstoff könnte allerdings dazu führen, dass die Sechsringbildung gehemmt ist, wie in Abbildung 37 dargestellt. Der Atomradius des Schwefels führt zu einer Ringgeometrie, die mit der eines Siebenrings vergleichbar ist. Gegebenenfalls könnte die Verkürzung der Ethylenbrücke zu einer Methylenbrücke hier Abhilfe schaffen.

## Ergebnisse

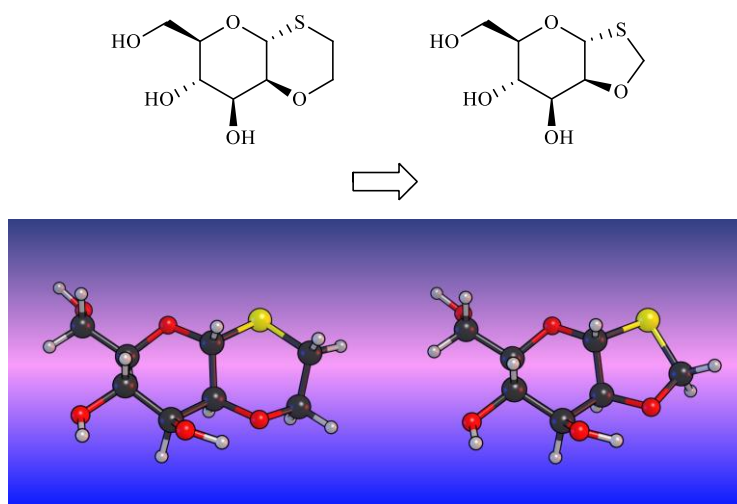


Abbildung 37: Vergleich der theoretischen Ringformen für das *O,S*-Acetal mit zwei Sechsringen (links) und der Kombination Sechsring/Fünfring (rechts)

Nach mehrfachen erfolglosen Versuchen den Ring zu schließen und das gewünschte bicyclische Acetal zu erhalten, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt, so dass die Synthesversuche zu Verbindung **L039** abgebrochen wurden.

### 3.1.1.2 Docking des Spiroacetals

Die Modellverbindung **pMSP** wurde mit folgenden Parametern in FlexX in das aktive Zentrum der dGM in 1HWW gedockt:

- Als Bindetasche für das Docking wurden alle Aminosäure-Reste innerhalb eines Radius von 8 Å um Swainsonin in der Kristallstruktur definiert.
- Als Docking Strategie wurde ein Hybrid-Ansatz gewählt, welcher Enthalpie und Entropie berücksichtigt.
- Das maximal erlaubte Überlappungsvolumen beträgt 2.9 Å<sup>3</sup>.
- Der interne Kollisionsfaktor (Clash-factor) wurde zu 0.6 definiert.

Diese Parameter wurden bereits für das strukturbasierte Docking zu dem Design von **L039** im Redocking genutzt (siehe Kapitel 3.1.1.1.1: Strukturbasiertes Docking)

Das Docking des exemplarisch untersuchten Spiroacetals **pMSP** legt mit einem Score von -6.4 kJ/mol und der durch das HYDE-Assessment errechneten  $\Delta G$  von -1 kJ/mol keine hohe Affinität zum Rezeptor nahe. Die Einzelbeiträge zur Gesamtenergie durch das HYDE-Assessment verdeutlichen dies. Der Verbindung fehlen geeignete Substituenten zur Kompensation der hohen Desolvatationsenergien, insbesondere der acetalischen

## Ergebnisse

Sauerstoffatome. Die übrigen Kohlenstoffatome ergeben in der Summe aus Desolvatations- und Interaktionsenergie schwache bis leicht positive Energiebeiträge, bis auf einen dem Schwefel benachbarten Kohlenstoff, welcher insbesondere eine ungünstige Desolvatation des Rezeptors bewirkt. Die einzige berechnete Interaktion besteht in der Koordination des Zinkions durch das Schwefelatom. Die einzelnen Gesamtbeiträge zur Affinität sind in Abbildung 38 dargestellt. Der acetalische Kohlenstoff befindet sich jedoch für einen nucleophilen Angriff in passender räumlicher Nähe zu Asp204 (vgl. Abbildung 38).

## Ergebnisse

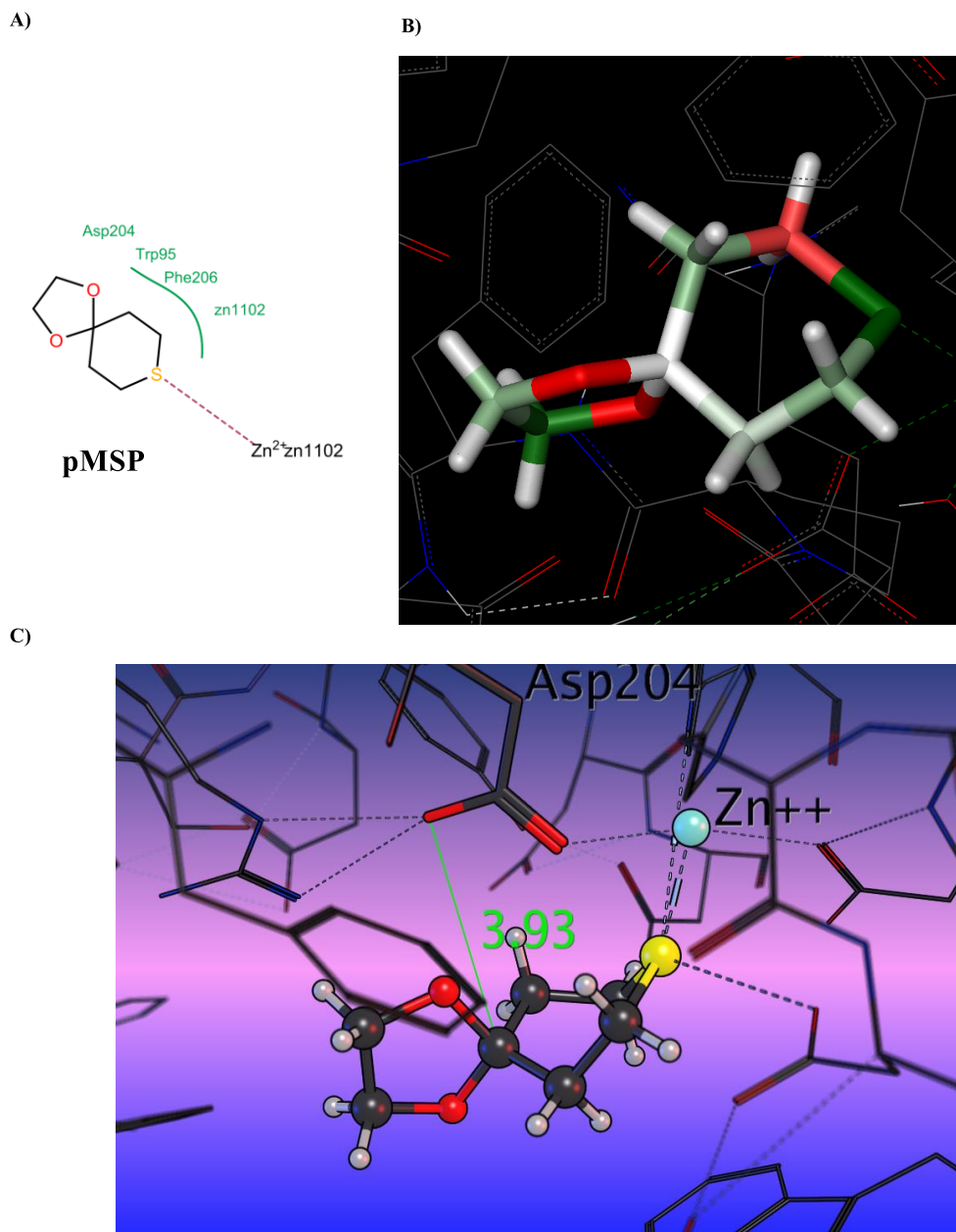


Abbildung 38: A) Berechnete Wechselwirkungen von **pMSP** in der aktiven Tasche der dGMII in der Kristallstruktur 1HWW; B) Beiträge der einzelnen Atome zur Gesamtenergie, berechnet durch das HYDE-Assessment in LeadIT. Dabei spiegeln grüne Bereiche günstige Wechselwirkungen und rote Bereiche ungünstige Wechselwirkungen wieder. C) Dockingpose der Verbindung **pMSP** im aktiven Zentrum der GM II mit angegebenem Abstand des acetalischen Kohlenstoffs zum Asp204.

Im Docking von **pMSP** wurden kaum relevante Wechselwirkungen außer der Zink-Koordination durch Schwefel berechnet. Der L-Score<sup>136</sup> beträgt -6.4 kJ/mol, das HYDE Assessment errechnet ein  $\Delta G$  von -1 kJ/mol. Der acetalische Kohlenstoff befindet sich jedoch in passender räumlicher Nähe zu Asp204 für einen nucleophilen Angriff. Das Zinkion der Bindetasche wird durch den ringinternen Schwefel koordiniert (vgl. Abbildung 39).

## Ergebnisse

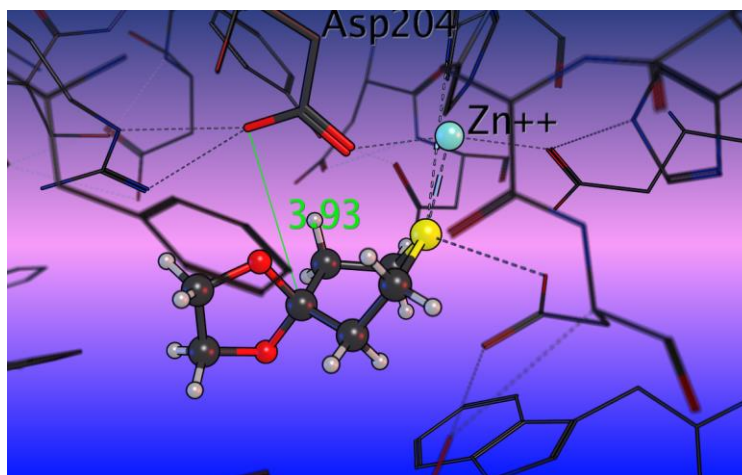
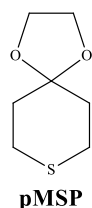


Abbildung 39: Dockingpose der Verbindung pMSP im aktiven Zentrum der GM II mit angegebenem Abstand des acetalischen Kohlenstoffs zum Asp204.

### 3.1.1.2.1 Synthese des Spiroacetals pMSP

Die Synthese des Spiroacetals **pMSP** war durch die Kondensation von *p*-Mercaptocyclohexanon mit Ethylenglycol laut Abbildung 40 geplant und konnte in 67%iger Ausbeute durchgeführt werden.

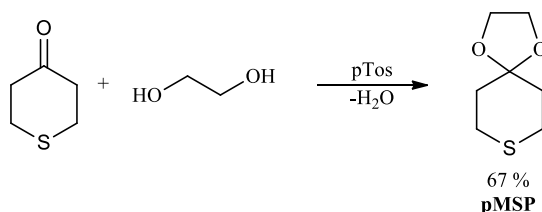


Abbildung 40: Syntheseroute zu **pMSP**

### 3.1.1.3 Monocyclische *N,O*-Acetale

#### 3.1.1.3.1 Dockingstudien mit monocyclischen *N,O*-Acetalen

Zur Identifizierung affiner Verbindungen wurde zunächst im Rahmen der Bachelorarbeit von Daniel Jonas<sup>137</sup>, unter Anleitung von Dr. Christian Kersten, eine Dockingstudie mit monocyclischen *N,O*-Acetalen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit detailliert analysiert. Bei der Dockingstudie sollten sowohl der Einfluss der Stereokonfiguration am anomeren Zentrum als auch die Anwesenheit der Hydroxy-Gruppe an C2 auf die Affinität zur GMII untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine virtuelle Bibliothek aus vier Serien von Aminaethern mit jeweils 96 im Arbeitskreis verfügbaren Aminen erstellt, welche in folgender Übersicht (Abbildung 41) dargestellt sind.

## Ergebnisse

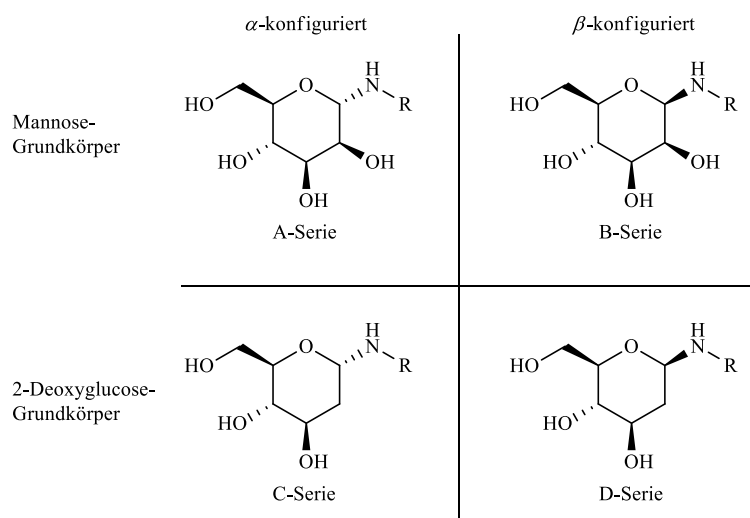


Abbildung 41: Verbindungsserien der *N,O*-Acetale für die Docking Studie

Demnach wurden  $4 \times 94 = 376$  Verbindungen (siehe Kapitel 7.2 im Anhang) generiert und in einer Dockingstudie verglichen. Zur Evaluierung der Wechselwirkungen zwischen Enzym und Acetal vor und nach einer kovalenten Anbindung an Asp204 wurden alle Verbindungen sowohl nicht-kovalent als auch kovalent gedockt.

### 3.1.1.3.1 Programme und Parameter

Sämtliche Strukturen wurden zur Geometriefindung durch MOE (Version 2015.1001) mit dem Kraftfeld MMFF94x<sup>131,138</sup> energieminiert. Für das Docking wurde mit den beiden Programmen MOE (Version 2015.1001) sowie LeadIT (Version 2.1.6) und dessen FlexX-Scoring-Funktion (L-Score) gearbeitet. Zudem wurden mit dem HYDE-Algorithmus<sup>112</sup> die energetischen Beiträge der einzelnen Atome für ausgewählte Verbindungen berechnet. Als Kristallstruktur wurde die GMII aus *Drosophila melanogaster* im Komplex mit Swainsonin (PDB code 1HWV<sup>53</sup>) gewählt. Zur Optimierung und Validierung der Parameter wurde zunächst Swainsonin in das katalytische Zentrum gedockt. Die (im Vergleich zum Redocking von Swainsonin in Kapitel 3.1.1.1.1) angepassten Parameter sind in Tabelle 4 zusammengefasst.



## Ergebnisse

Tabelle 4: Optimierte Parameter für Dockingstudien der *N,O*-Acetale

### Parameter für LeadIT

- Aufgrund des physiologischen pH-Werts und von Nachbargruppeneffekten wurden alle Aspartat-Reste im aktiven Zentrum über das Protoss-Modul von LeadIT deprotoniert
- Das zentrale Zink-Ion ist oktaedrisch koordiniert (gemäß Abbildung 42).

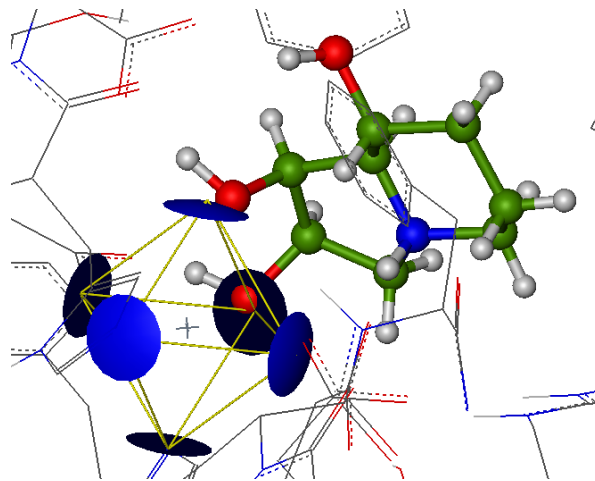


Abbildung 42: Oktaedrische Koordination des  $\text{Zn}^{2+}$  in der GM- Bindetasche im Komplex mit Swainsonin

- Als Bindetasche für das Docking wurden alle Aminosäure-Reste innerhalb eines Radius von  $8 \text{ \AA}$  um Swainsonin in der Kristallstruktur definiert.
- Alle Wassermoleküle innerhalb der Bindetasche wurden entfernt, da keines mehr als zwei Wechselwirkungen mit dem Enzym ausübt.
- Als Docking-Strategie wurde ein Hybrid-Ansatz gewählt, welcher Enthalpie und Entropie berücksichtigt.
- Das maximal erlaubte Überlappungsvolumen wurde von voreingestellten  $2.9 \text{ \AA}^3$  auf  $5.8 \text{ \AA}^3$  erhöht, um die relativ kleinen Bindetasche der GM II<sup>53</sup> optimal zu besetzen. Weiterhin konnten dadurch die Ergebnisse des Redockings zu RMSD-Werten unter  $2 \text{ \AA}$  verbessert werden.
- Der interne Kollisionsfaktor (Clash-factor) wurde zu 0.6 definiert

## Ergebnisse

Parameter für MOE

- Als Methode für die Platzierung: Triangle Matcher
- Als Methode für das Refinement: Rigid Receptor (use Reaction Field; Use GB/VI)
- Scoring-Funktion GBVI/WSA dG

### 3.1.1.3.1.2 Kovalentes Docking in MOE

Zur Abschätzung der Wechselwirkungen der monocyclischen *N,O*-Acetale nach einer hypothetischen Reaktion mit Asp204 im Falle von kovalenter Inhibition und der damit eingenommen Position im aktiven Zentrum wurden alle Strukturen ebenfalls kovalent gedockt (*Docktite workflow*<sup>139</sup>). Insbesondere wurden die Dockingposen vor und nach der erzwungenen Reaktion miteinander verglichen. Dazu wurde die Reaktion zwischen Asp204 und dem anomeren Kohlenstoff des Zuckergerüsts gemäß Abbildung 43 erzwungen.

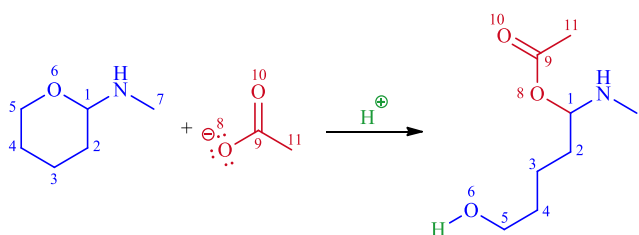


Abbildung 43: Schematischer Reaktionsbefehl für das kovalente Docking der monocyclischen *N,O*-Acetale in MOE. Dabei sind die individuellen Reste der Zuckerstruktur (blau) nicht gezeigt. Das Acetat-Ion (rot) stellt das Asp204 dar. Das Proton (grün) wird benötigt, um der Vorgabe Rechnung zu tragen, dass Sauerstoff 6 nach der Reaktion direkt protoniert vorliegen soll.

In Anbetracht des pH-Werts von 5.75, welcher im Assay eingestellt ist und auch dem des Golgi-Apparates entspricht, wird der Aspartatrest als deprotoniert, das durch die Ringöffnung entstehende Alkoholat jedoch als direkt durch die Lösemittelumgebung protoniert angenommen.

### 3.1.1.3.1.3 Redocking von Swainsonin

Mit den in 3.1.1.3.1.1 (Programme und Parameter) beschriebenen Parametern wurde Swainsonin gedockt und mit der Position in der Kristallstruktur verglichen. Dabei wurde in LeadIT ein RMSD-Werte von 0.5868, ein Score (L-Score) von  $-30.196 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$  und ein HYDE-Score (Hy-Score) von  $-32 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$  berechnet, was den  $\text{IC}_{50}$  von Swainsonin im unteren nanomolaren

## Ergebnisse

Bereich sehr gut widerspiegelt (Literaturwerte des  $IC_{50}$  für Swainsonin mit der dGMII liegen bei  $40 \text{ nM}^{59}$  bzw.  $12\text{-}20 \text{ nM}^{54}$ ). In MOE wurde ein nicht-kovalenter Score von  $-35.664 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$  und ein RMSD-Wert von  $0.4205 \text{ \AA}$  erhalten.

### 3.1.1.3.1.4 Vergleich der Dockingstudien mit monocyclischen *N,O*-Acetale

Als potentielle kovalent reversible Inhibitoren wurden monocyclische *N,O*-Acetale (vgl. Kapitel 3.1.1.3.1.4) untersucht. Durch konventionelles Docking und kovalentes Docking konnte deren generelle Eignung als Inhibitoren der GMII bestätigt werden. Zudem ergab ein Vergleich der Verbindungen mit gleichem Rest R aber unterschiedlicher Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom sowie mit Mannose oder 2-Deoxyglucose, dass die 2-Deoxyglucosederivate oftmals zu höheren berechneten Affinitäten führten. Die Konfiguration an C1 hingegen lässt keinen signifikanten Trend erkennen (siehe Abbildung 44).

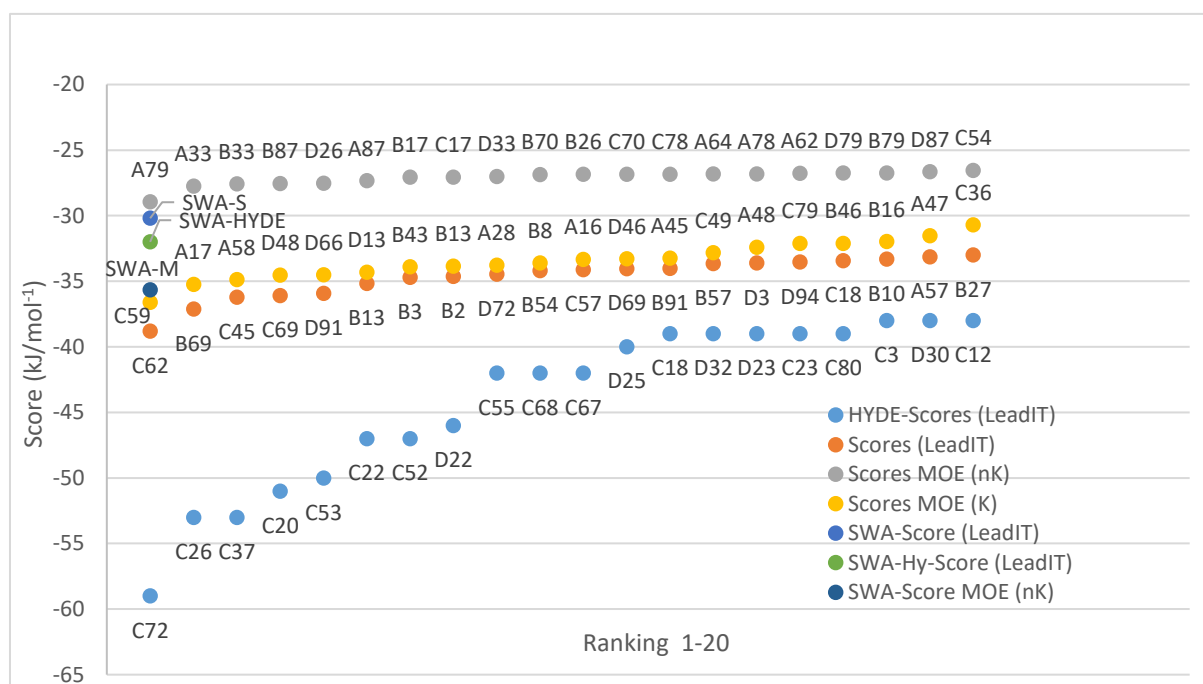


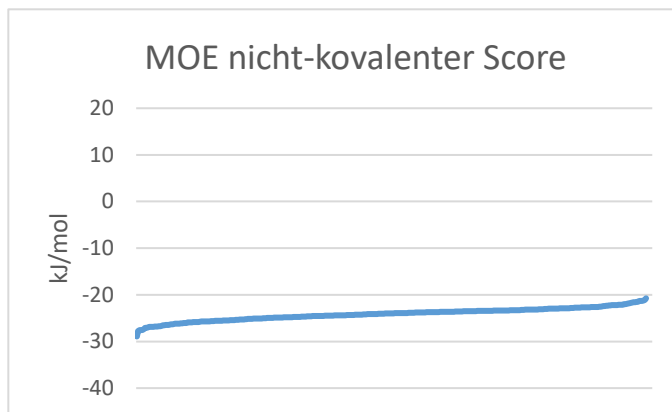
Abbildung 44: Auftragung der jeweils 20 besten Scores der monocyclischen *N,O*-Acetale (LeadIT: (L-Scores) und HYDE-Scores, MOE: kovalent = M-K-Scores; nicht-kovalent = M-nK-Scores sowie die Scores von Swainsonin (SWA) in MOE und LeadIT. Die Strukturen sind im Anhang in Kapitel 7.2 aufgeführt.

Der negative Einfluss der Hydroxygruppe an C2 lässt sich aus den HYDE-Assessments und den Dockingposen erklären. Diese stark hydrophile Gruppe ist vorwiegend zwischen Tyr727 und Trp95 positioniert. Diese beiden Aminosäurereste können keine Wechselwirkungen zu der Hydroxylgruppe aufbauen, die die negative Desolvatationsenergie aufwiegen würde. Nach

## Ergebnisse

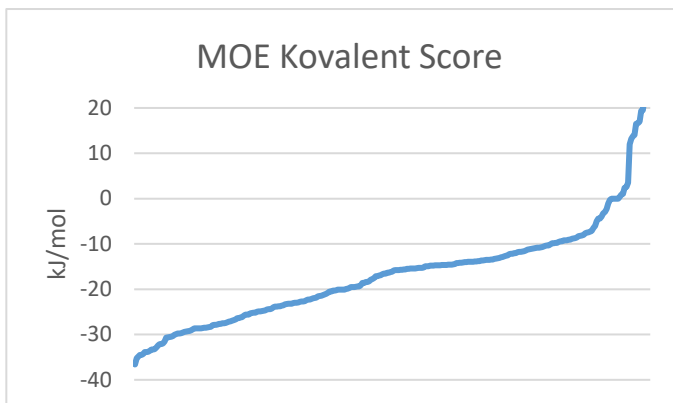
Sichtung und Vergleich der Dockingposen für als affin berechnete Verbindungen im kovalenten und nicht-kovalenten Docking wurden hinsichtlich der Ähnlichkeit der Positionen mehrere Verbindungen ausgewählt, die als potentielle kovalent reversible Inhibitoren fungieren könnten.

Das nicht-kovalente Docking in MOE lieferte durchweg unplausible Scoring-Ergebnisse als Wertekontinuum von -20.75 bis  $-28.93 \frac{kJ}{mol}$ , was aufgrund fehlender Diskriminierung der Moleküle kein aussagekräftiges Ranking darstellt und deshalb nicht weiter betrachtet wird.

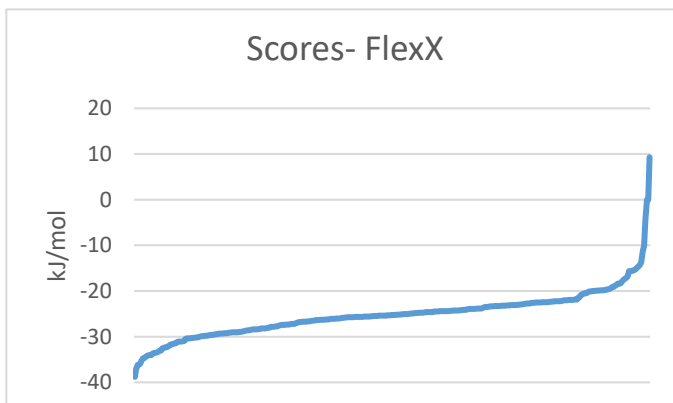


Scoring-Werte des nicht-kovalenten Dockings. Die Werte für die 376 Verbindungen unterscheiden sich untereinander kaum, was auf einen systematischen Fehler in der Berechnungsgrundlage hindeutet. Die Ergebnisse dieser Dockingstudie wurden deshalb vernachlässigt.

## Ergebnisse



Die Scoring-Werte des kovalenten Dockings decken einen sehr großen Wertebereich ab. Übersichtshalber sind in dem Diagramm Werte über  $+20.93 \frac{kJ}{mol}$  nicht dargestellt. Das Spektrum zeigt jedoch deutlich, dass eine klare Diskriminierung von denkbaren Verbindungen für eine kovalente Anbindung gegenüber solchen, mit quasi undenkbareren Wechselwirkungen vorliegt.



Die FlexX-Scoringwerte zeigen ebenfalls eine glaubwürdige Diskriminierung von geeigneten Inhibitoren gegenüber solchen mit ungünstigen Wechselwirkungen.

Die anderen Dockingreihen zeigen in sich schlüssige Ergebnisse. Im Vergleich der Rankings untereinander sind jedoch keine allgemeinen Trends erkennbar. Da die HYDE-Scoringfunktion zusätzlich zu den Wechselwirkungen zwischen Liganden und Rezeptor die Desolvation mitberücksichtigt, wird diese in der relativ polaren Bindetasche der GMII als sehr aussagekräftig angesehen. Deshalb wurde der HYDE-Score der 20 potentesten Verbindungen detaillierter betrachtet und mit den jeweiligen Derivaten (*R*, *S* Mannose ↔ 2-Deoxyglucose) verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Derivate der C- und D-Reihe (mit 2-Deoxyglucose als Grundgerüst, siehe Abbildung 41) energetisch bevorzugt erscheinen. Bei dem Vergleich der Posen derjenigen Verbindungen, deren räumliche Lage potentiell einen Angriff von Asp204

## Ergebnisse

ermöglichen, liegt C2 vorwiegend zwischen Tyr727 und Trp95. Dabei werden die positiven Desolvatationsenergien der entsprechenden OH-Gruppe und des Rezeptors nicht durch entsprechende Wechselwirkungen kompensiert. Im Falle der 2-Deoxy-Verbindungen stehen dem jeweils negative Desolvatationsenergien für C2 gegenüber. Zwar werden hier keine Wechselwirkungen ausgebildet, was aber dementsprechend nicht nötig ist, um für diese Strukturposition insgesamt ein negatives  $\Delta G$  zu erhalten. Dieser Sachverhalt ist exemplarisch durch die Gegenüberstellung der HYDE-Score Beiträge von **B66** und **D66** in Abbildung 45 dargestellt.

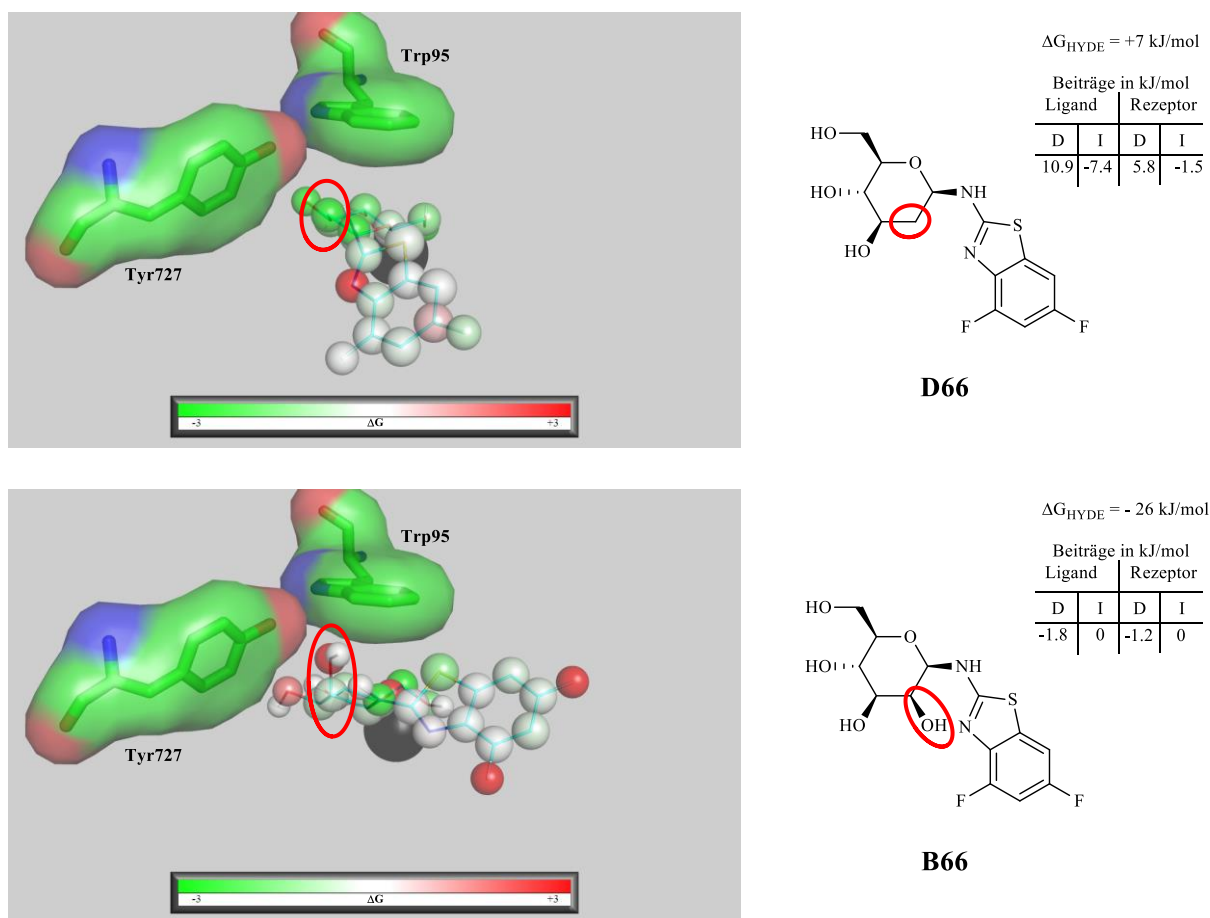


Abbildung 45: Darstellung der Beiträge zum HYDE-Score der einzelnen Atome in der Bindetasche der GMII. Dabei sind wünschenswerte Beiträge mit negativem  $\Delta G$  in grün, positive Beiträge in rot dargestellt. Die Beiträge des jeweils markierten Bereichs sind zusätzlich jeweils aus Sicht des Liganden und des Rezeptors hinsichtlich Desolvatation (D) und Interaktionen (I) aufgeführt. Die einzelnen energetischen Beiträge sind teilweise außerhalb der Skala, welche der Übersicht halber von -3 bis +3 gewählt wurde.

In der Überlagerung der Verbindungen **B22** und **B66** im Vergleich mit den entsprechenden 2-Deoxy-Verbindungen **D22** und **D66** in der Bindetasche der GMII in Abbildung 46 wird deutlich, dass die freien Elektronenpaare der Hydroxygruppen (gelbe Markierungen in



## Ergebnisse

Abbildung 46) ungünstig auf Bereiche mit hohem elektrostatischen Potenzial des Rezeptors treffen. Dementsprechend ist eine Desolvatisierung dieses Bereichs gleichsam ungünstig wie die Desolvatisierung der Hydroxygruppe. Im Falle einer Methylengruppe ergeben sich an dieser Stelle jeweils günstige negative Desolvatationsenergien

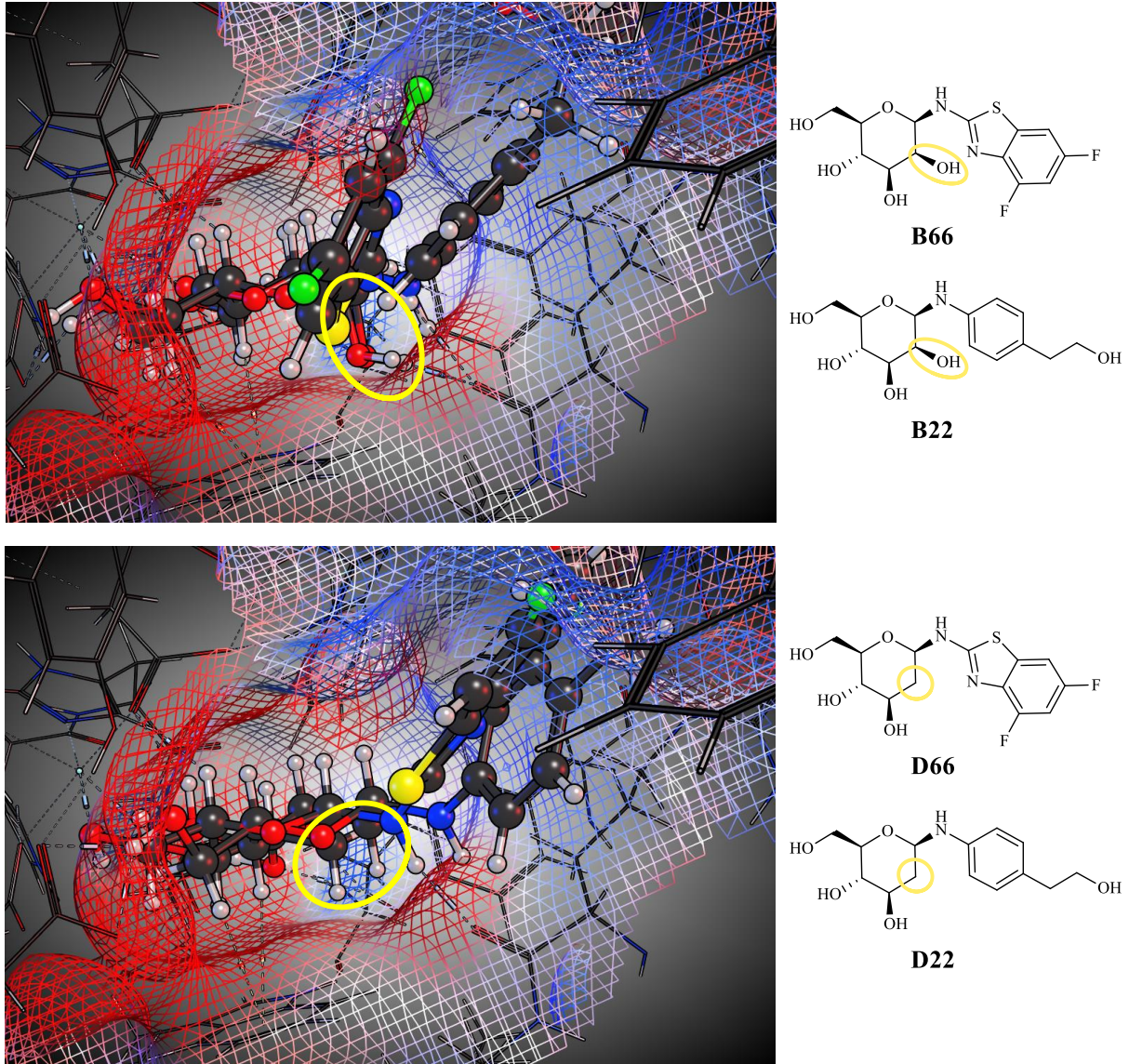


Abbildung 46: Darstellung der prinzipiellen Unterschiede in den Wechselwirkungen von Mannose-*N,O*-acetalen und 2-Deoxy-*N,O*-acetalen in der Bindetasche der GMII (1HWW). Die Gitteroberfläche der aktiven Tasche ist farblich nach elektrostatischem Potenzial eingefärbt. Dabei kennzeichnen rote Bereiche hohe elektrostatische Potenziale. Die Bereiche von Interesse für diese Betrachtung sind in gelb markiert.

## Ergebnisse

### 3.1.1.3.1.5 Auswahl der vielversprechendsten *N,O*-Acetale

Die Auswahl der vielversprechendsten Verbindungen erfolgte einerseits nach Kriterien für die errechneten Bindungsenergien aller drei in Betracht gezogenen Scoringfunktionen (L-Score, MOE-Kovalent-Score (M-K-Score) und HYDE-Score), andererseits auch nach Ähnlichkeit der nicht-kovalenten räumlichen Anordnung verglichen mit der kovalent erzwungenen. Als Kriterien bezogen auf die Scoringfunktionen wurden als Voraussetzungen folgende Energiewerte festgelegt:

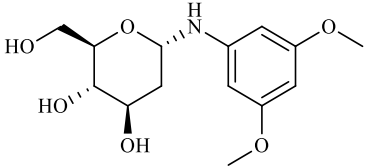
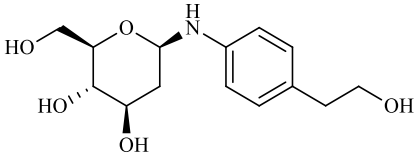
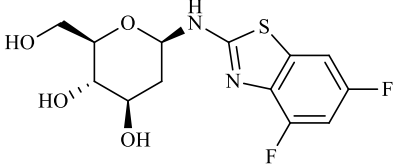
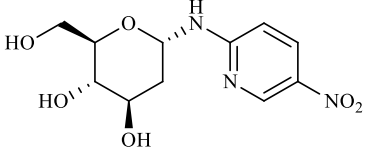
$$\text{L-Score} \leq -20 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}; \text{M-K-Score} \leq -15 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}; \text{Hy-Score} \leq -10 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

Dies schränkte die Anzahl der potentiellen Verbindungen auf 12 ein. In Bezug auf die Orientierung in der Bindetasche wurde auf eine möglichst ähnliche Positionierung, verglichen mit Swainsonin, geachtet, um weiterhin essenzielle Interaktionen mit  $\text{Zn}^{2+}$  beizubehalten. Zusätzlich muss sich das anomere Kohlenstoffzentrum im nicht-kovalenten Docking mit FlexX in geeigneter räumlicher Nähe und Geometrie zu Asp204 befinden, um einen kovalenten Angriff zu ermöglichen. Als optimal wurde ein Abstand von kleiner oder gleich 4.2 Å angesehen. Nach diesen Kriterien wurden folgende vier Moleküle als die vielversprechendsten Verbindungen (Tabelle 5) identifiziert:



## Ergebnisse

Tabelle 5: Selektion der vier Substanzen als potentielle Inhibitoren der GMII

Name	L-Score $\frac{kJ}{mol}$	HYDE-Score $\frac{kJ}{mol}$	M-K-Score $\frac{kJ}{mol}$	Distanz zu Asp204 (Å)	Molekülstruktur
HAdG-C37	-24,473	-53	-28,261	4,2	
HAdG-D22	-22,296	-46	-29,236	4,2	
HAdG-D66	-26,082	-26	-34,504	4,1	
HAdG-C45	-36,219	-17	-28,589	4,2	

## Ergebnisse

### 3.1.1.3.2 Synthese der monocyclischen *N,O*-Acetale

Die Synthese der monocyclischen *N,O*-Acetale war in einstufigen Synthesen gemäß Abbildung 47 geplant.

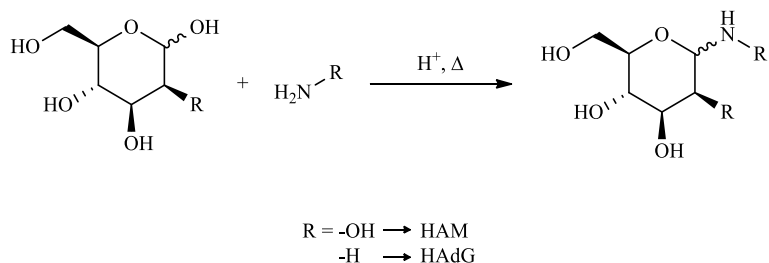


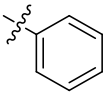
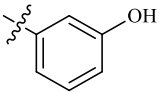
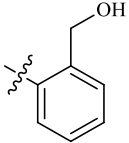
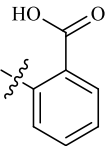
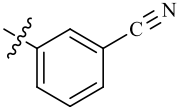
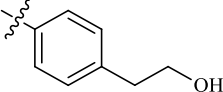
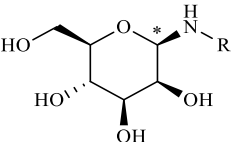
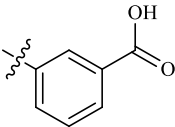
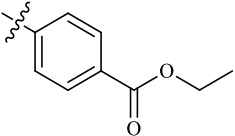
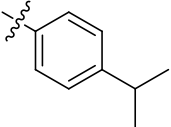
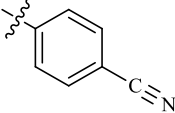
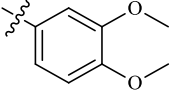
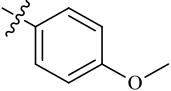
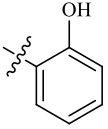
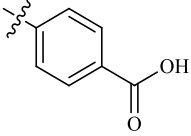
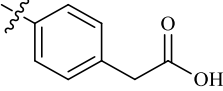
Abbildung 47: Syntheseroute für die monocyclischen *N,O*-Acetale der Reihen HAM und HAdG

Die Synthese der *N,O*-Acetale in Anlehnung an Wang *et al.*<sup>140</sup> verlief unkompliziert durch Kondensation der entsprechenden Zuckerkomponente mit den entsprechenden Aminen in Ethanol bzw. Isopropanol und Wasser in Anwesenheit von Essigsäure. Die entstandenen Verbindungen konnten entweder direkt aus der Reaktionslösung abgetrennt und gewaschen, oder nach Umkristallisation in großer Reinheit (auch anomerrein) erhalten werden (siehe Kapitel 3.1.1.3.2). Auf diesem Weg wurden die folgenden, in Tabelle 6 und Tabelle 7 aufgeführten 25 Verbindungen synthetisiert. Die Ausbeuten variierten zwischen 15 % und 98 % (größtenteils im Bereich von 45-65 %).

## Ergebnisse

Auf Mannosebasis (HAM):

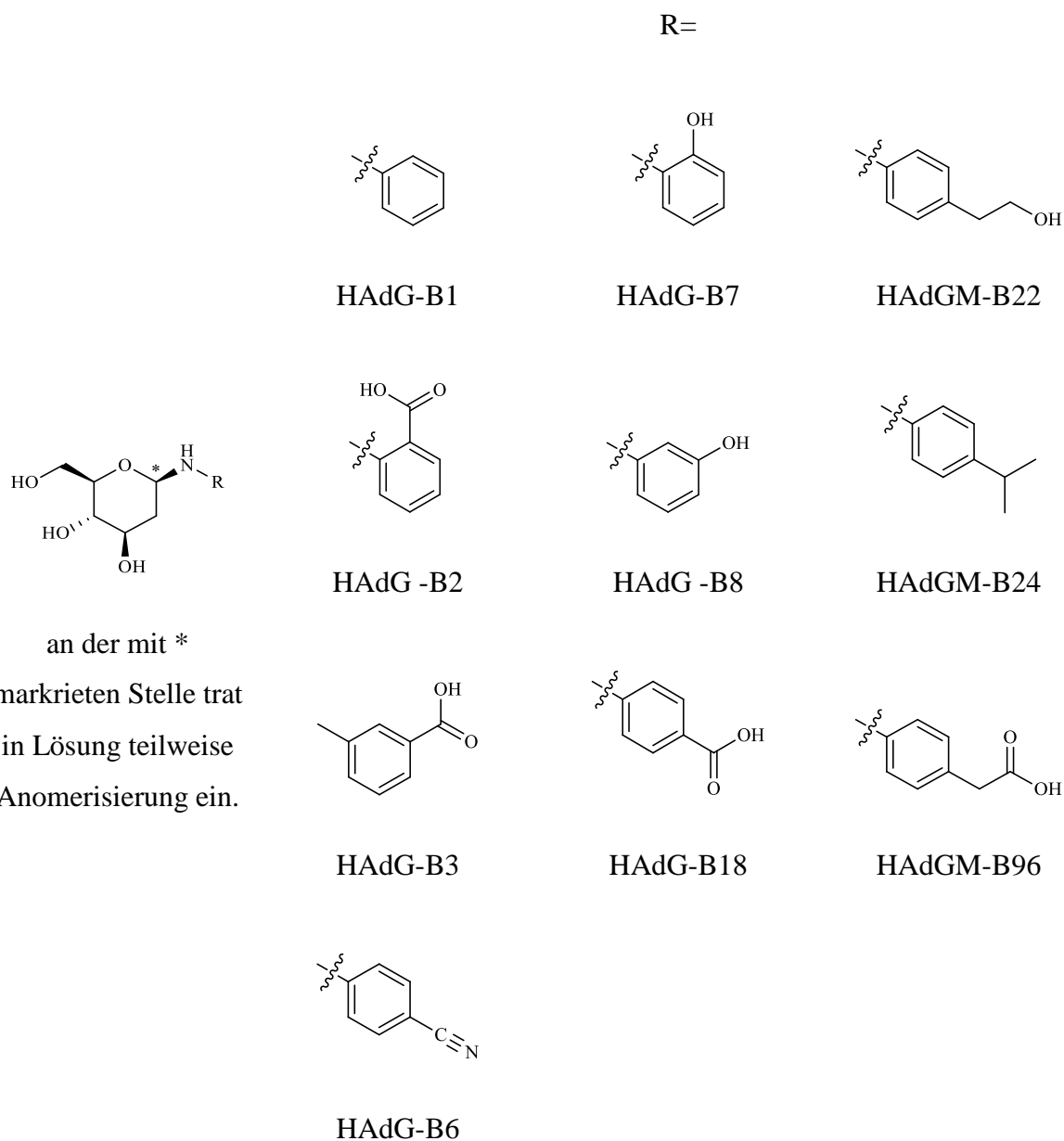
Tabelle 6: Übersicht der synthetisierten monocyclischen *N,O*-Acetale auf Mannose-Basis

	R=		
			
	HAM-B1	HAM-B8	HAM-B21
			
	HAM-B2	HAM-B9	HAM-B22
			
An der mit * markierten Stelle trat in Lösung teilweise Anomerisierung ein	HAM-B3	HAM-B11	HAM-B24
			
	HAM-B6	HAM-B16	HAM-B95
			
	HAM-B7	HAM-B18	HAM-B96

## Ergebnisse

### Auf 2-Deoxyglucosebasis (HAdG)

Tabelle 7: Übersicht der synthetisierten monocyclischen *N,O*-Acetale auf 2-Deoxyglucose-Basis



an der mit \*  
markierten Stelle trat  
in Lösung teilweise  
Anomerisierung ein.

Da die Konfiguration am anomeren Zentrum zunächst nicht zweifelsfrei feststand, wurden an allen Verbindungen NMR-NOE-Messungen<sup>141,142</sup> durchgeführt. Der NOE-Effekt sollte zwischen H1 und H5 nur bei Verbindungen in  $\beta$ -Konfiguration zu beobachten sein (vgl. Abbildung 48: Veranschaulichung des NOE-Effekts in den monocyclischen *N,O*-Acetalen zur Bestimmung der Konfiguration an C1).

## Ergebnisse

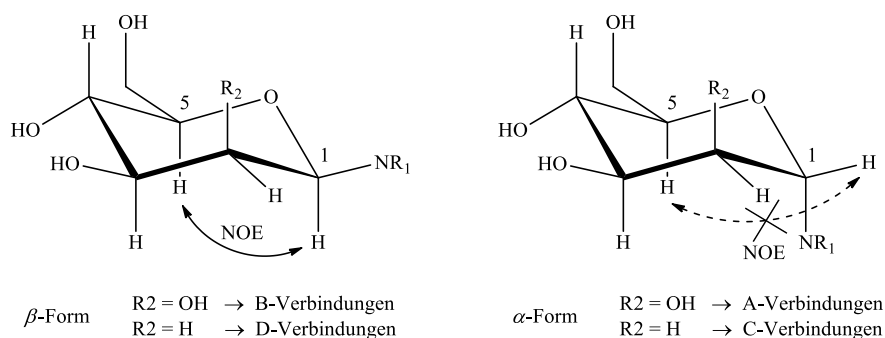


Abbildung 48: Veranschaulichung des NOE-Effekts in den monocyclischen *N,O*-Acetalen zur Bestimmung der Konfiguration an C1. Die Übertragung des magnetischen Moments von dem Wasserstoff an C1 auf den Wasserstoff an C5 ist aus geometrischen Gründen nur in  $\beta$ -konfigurierten Verbindungen möglich.

Alle Verbindungen, die dieses Kreuzsignal zeigten, wurden demnach als  $\beta$ -konfiguriert angesehen. Parallel dazu wurden Kristallstrukturen von HAM-B1 und HAM-B9 in der Arbeitsgruppe *Grabowsky* der Universität Bremen aus ebenfalls dort durchgeführten Röntgendiffraktionsmessung berechnet, welche diesen Befund bestätigten (vgl. Abbildung 49).

## Ergebnisse

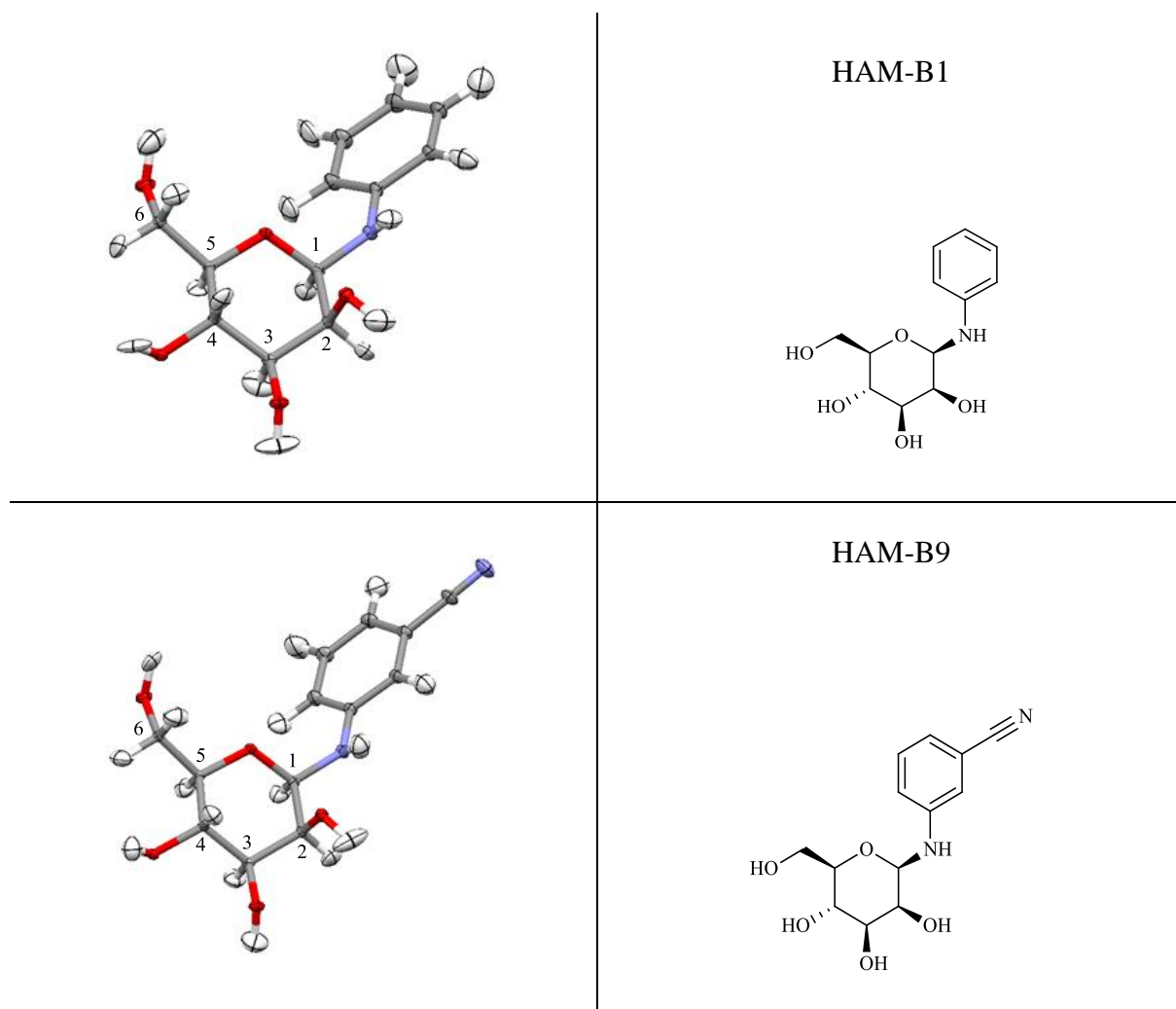


Abbildung 49: XRD-Kristallstrukturen der Verbindungen HAM-B1 und HAM-B9 inklusive Wasserstoffe nach Hirshfeld Atom Refinements (HAR)<sup>143</sup> mit einer Auflösung von 0.64/0.65 Å sowie R-Werten nach HAR von 3.07/2.82 %. Die Elektronenrestdichten betragen in beiden Strukturen unter  $\pm 0.3 \text{ e}/\text{Å}^3$ .

Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome in den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren verdeutlicht zudem die Ähnlichkeit aller Kohlenstoffe in den Verbindungen und legitimiert die Zuordnung (vgl. Tabelle 8). Da einige Verbindungen in Lösung anomerisierten, liegen für diese Verbindungen ebenfalls Daten für das entsprechende  $\alpha$ -Anomer vor. Es wird davon ausgegangen, dass alle Verbindungen in der energetisch günstigeren  $\beta$ -Form (mit dem Rest an C1 in äquatorialer Stellung) gebildet wurden. Die Abwesenheit von ausgeprägten doppelten Signalsätzen in schnell erhältlichen Protonen-NMR-Spektren aller Verbindungen stützt diese Annahme. Zur Untersuchung der Zeitskala, auf der die Anomerisierung stattfindet, wurde für **HAM-B1** die zeitabhängige Zusammensetzung des Verbindungsgemisches per  $^1\text{H}$ -NMR gemessen. Dabei zeigt sich, dass bereits nach 10 Minuten ein merklicher Anteil an  $\alpha$ -Anomer vorliegt. Für diese Verbindung wurde das Gleichgewicht von 31 %  $\alpha$  : 69 %  $\beta$  nach ca.

## Ergebnisse

20 h erreicht. Die Gleichgewichtsverhältnisse der anderen anomerisierenden Verbindungen (**HAM 3**, **HAM 21** sowie **HAdG 2**) liegen ebenfalls in diesem Bereich. Die  $\alpha$ -Anomere der HAM-Reihe zeigen dabei alle größere Tieffeldverschiebungen für C1 im NMR, das einzige beobachtete  $\alpha$ -Anomer der **HAdG**-Reihe hingegen eine niedrigere Tieffeldverschiebung.

Tabelle 8: Vergleich der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffe der *N,O*-Acetale sowie deren Drehwerte. Die Einträge für in Lösung anomerisierende Verbindungen sind farblich hinterlegt. Die zugehörigen Strukturen sind in Tabelle 13 und Abbildung 41 wiedergegeben.

Verb.	$\delta$ C1	$\delta$ C2	$\delta$ C3	$\delta$ C4	$\delta$ C5	$\delta$ C6	NOE	$[\alpha]_{589}^{24}$
HAM	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	H1-5	$\alpha : \beta$
A1	83.81					61.36	✗	-46.94°
B1	81.40	67.14	74.53	71.23	78.28	61.28	✓	3.1:6.9
B2	80.23	66.90	74.33	70.88	77.89	61.18	✓	-65.01°
A3	83.51					61.18	✗	-97,35°
B3	81.41	67.06	74.40	71.13	74.40	61.23	✓	2.5 : 7.5
B6	80.80	66.97	74.28	70.84	78.07	61.24	✓	-142.84°
B7	80.30	66.83	74.27	70.90	77.52	60.92	✓	-119.42°
B8	81.49	67.08	74.49	71.22	77.87	61.25	✓	-121.47°
B9	80.94	67.04	74.36	70.96	77.94	61.27	✓	-114.26°
B11	80.89	66.96	74.29	70.87	78.04	61.20	✓	-123.06°
B16	82.11	67.26	74.60	71.25	77.94	61.29	✓	-112.71°

## Ergebnisse

B18	80.94	66.98	74.32	70.91	78.02	61.22	✓	-121.87°
A21	84.98	71.10				64.35	✗	-78.56°
B21	81.58	67.57	74.97	71.73	78.23	61.74	✓	2.5 : 7.5
B22	81.52	67.14	74.53	71.22	77.53	61.26	✓	-112.19°
B24	81.56	67.16	74.55	71.24	77.88	61.28	✓	-108.09°
B95	81.81	66.90	74.28	70.99	77.53	60.99	✓	-116.00°
B96*	81.15	66.86	74.58	70.89	77.58	60.39	?	/

\*Die Datenlage zu B96 erlaubt keine gesicherte Zuordnung der Kohlenstoffe und erfolgt demnach nur auf Grundlage der Ähnlichkeit in der Verschiebung zu den anderen Verbindungen.

## HAdG

D1	80.11	39.27	71.63	71.70	77.46	61.09	✓	-166.76°
C2	77.21	37.68	68.39	72.54/71.25		61.01	✗	-39.8°
D2	78.71	39.63	71.25	71.44	71.25	60.96	✓	3.0 : 7.0
D3	80.01	39.20	71.52	71.62	77.52	61.03	✓	-69.96°
D6	79.17	38.84	71.30	71.46	77.65	60.94	✓	-133.45°
D7	80.00	39.49	71.63	71.63	77.60	61.08	✓	-99.50°
D8	80.20	39.27	71.63	71.63	77.43	61.06	✓	-82.51°



## Ergebnisse

D18	79.44	39.47	71.42	71.54	77.62	61.01	✓	-121.87°
D22	80.26	39.30	71.64	71.72	77.44	61.10	✓	-75.93
D24	80.30	39.31	71.66	71.74	77.46	61.13	✓	-83.48°
D96	80.14	39.31	71.67	71.70	77.50	61.06	✓	-74.23

Ebenfalls haben die Verbindungen vergleichbare spezifische Drehwerte. Die Drehwerte der anomerisierenden Verbindungen konnten nur als Mischung gemessen werden, wobei nicht sichergestellt ist, dass tatsächlich jeweils die Gleichgewichtslage erreicht wurde. Sie sind demnach unter Vorbehalt angegeben. Der zeitliche Verlauf der Anomerisierung ist in Abbildung 50: Zeitlicher Verlauf der Anomerisierung von **HAM-B1** anhand von NMR-Daten) dargestellt. Dazu wurden nach definierten Zeitspannen Protonenspektren gemessen, und die Integrale des Signals für H1 zusammen auf eins normiert und in Relation zueinander gesetzt.

T [in min]	Anteil $\alpha$ -Anomer	Anteil $\beta$ -Anomer
0	0	100
10	7	93
20	10	90
30	12	88
40	15	85
60	19	81
80	22	78
100	24	76
130	27	73
1250	31	69
2000	31	69

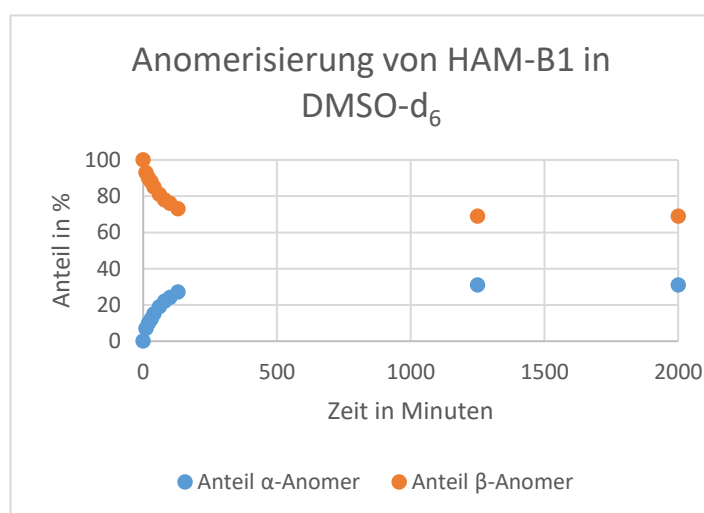


Abbildung 50: Zeitlicher Verlauf der Anomerisierung von **HAM-B1** anhand von NMR-Daten

## Ergebnisse

### 3.1.2 Allosterische Inhibitoren

#### 3.1.2.1 Identifizierung einer potentiellen allosterischen Bindetasche in der GMII

In Untersuchungen von Lina Irsheid<sup>121</sup> an der GMII wurde mittels der *Site Finder* Anwendung in MOE v2014.10 (Chemical Computing Group, Montreal, QC, Canada)<sup>144</sup> eine allosterische Bindetasche identifiziert. Die Basis der Identifizierungsmethode beruht auf sogenannten *alpha spheres*, welche von den Rezeptoratomen abgeleitet werden und die Form des Proteins hinsichtlich Hydrophilie und Hydrophobie beschreiben. Diese werden zu Clustern zusammengefasst und erzeugen dadurch eine Reihe von Taschen, die wiederum nach der Anzahl hydrophober Kontakte mit dem Rezeptor geordnet und hinsichtlich der

- Anzahl an Rezeptoratomen (also nach Größe),
- Anzahl hydrophober Kontakte,
- Anzahl der Seitenkettenkontakte und der
- PLB („Propensity for Ligand Binding“ – Neigung zur Ligandenbindung)<sup>145</sup>

bewertet werden. Im Vergleich dieser Bindetasche mit der aktiven Bindetasche der GMII durch des webbasierten DoGSite Scorer (<http://dogsite.zbh.uni-hamburg.de>) werden folgende Parameter miteinander verglichen: Taschenvolumen, Oberflächengröße, Tiefe, Arzneistofftauglichkeitswert (druggability score) und das Verhältnis unpolarer Aminosäuren<sup>146</sup>. Gegenüber der aktiven Bindetasche ergibt sich auf der Grundlage folgender Werte (Tabelle 9) eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Arzneistofftauglichkeit für diese allosterische Bindetasche.

Tabelle 9: Vorhersage der Arzneistofftauglichkeit der aktiven Tasche und der potentiellen allosterischen Tasche der GMII durch den DoGSiteScorer (anhand von pdb: 1HWW)

	Volumen [Å <sup>3</sup> ]	Oberfläche [Å <sup>2</sup> ]	Tiefe[Å]	Druggability score	Verhältnis unpolarer Aminosäuren
Aktive Tasche	194.65	229.38	8.97	0.28	0.21
Potentielle allosterische Tasche	879.26	820.14	22.46	0.83	0.46

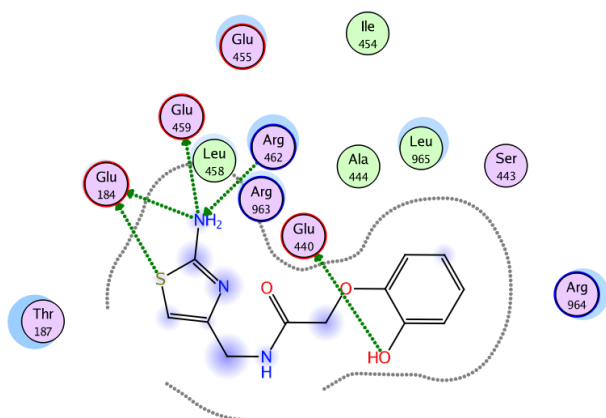
## Ergebnisse

Dabei weisen Druggability-Scores über 0.5 auf Arzneistofftauglichkeit hin<sup>146</sup>. Zudem unterscheidet sich die potentielle allosterische Bindetasche signifikant von der aktiven Tasche.

### 3.1.2.2 Verbindungen als potentielle allosterischen Inhibitoren

In Virtuellen-Screening-Studien von Lina Irsheid<sup>121</sup> wurden dabei Verbindungen mit unterschiedlichen Strukturelementen wie z. B. Aminothiazolstrukturen (Compound **11**) oder Benzolthiophen und Pyrazolbausteinen (Compound **12**) als potentielle Inhibitoren identifiziert:

Compound 11



Compound 12

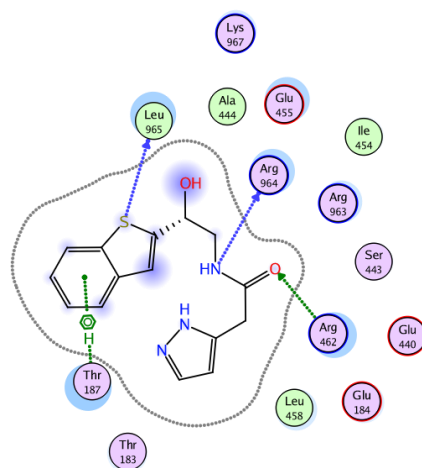
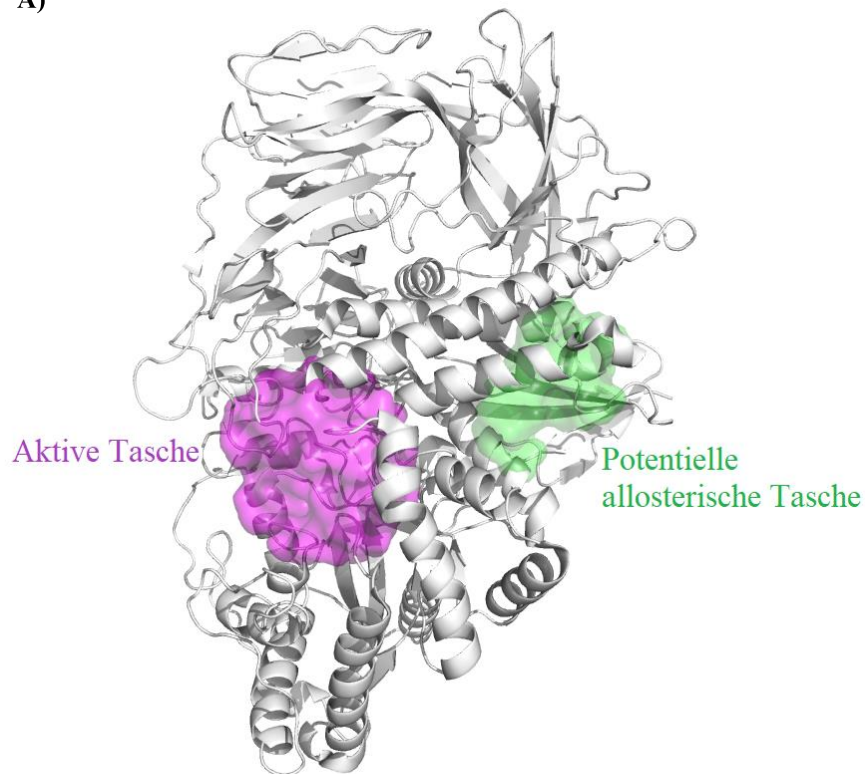


Abbildung 51: Beispiele für Screening-Treffer in der Dockingstudie von Lina Irsheid an der potentiellen allosterischen Bindetasche der GKII (mit freundlicher Genehmigung entnommen aus: L. Irsheid, New inhibitors of Golgi- $\alpha$ -mannosidase II<sup>121</sup>)

Die Lage der potentiellen allosterischen Bindetasche im Enzym sowie deren Form sind in Abbildung 52 dargestellt.

## Ergebnisse

A)



B)

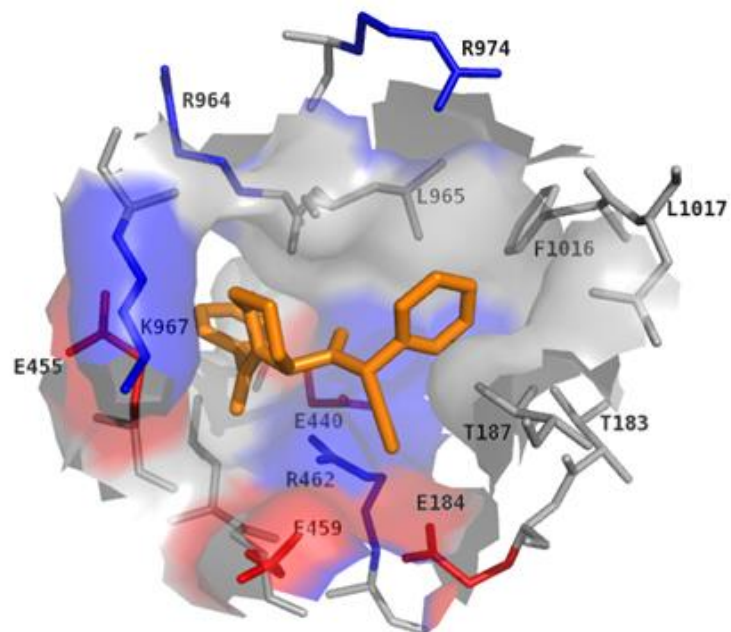


Abbildung 52: **A)** Lage der potentiellen allosteischen Bindetasche (grün) sowie der aktiven Tasche (magenta) in der GMII, **B)** Compound **12** in der allosterischen Bindetasche mit farbcodierter Oberfläche des Rezeptors (rot: saure Reste blau: basische Reste grau: polare und unpolare Reste sowie Rückgrat) (mit freundlicher Genehmigung entnommen aus: L. Irsheid, New inhibitors of Golgi- $\alpha$ -mannosidase II<sup>121</sup>)

## Ergebnisse

Da aufgrund der Identifizierung potentieller Inhibitoren der allosterischen Tasche großes Interesse insbesondere an den Aminothiazolstrukturen bestand, wurde eine kleine Bibliothek von vier Verbindungen dieses Strukturtyps synthetisiert (vgl. Abbildung 53).

### 3.1.2.3 Synthese der potentiellen allosterischen Inhibitoren

Die Synthese der potentiellen allosterischen Inhibitoren war gemäß Abbildung 53: Syntheschema der potentiellen allosterischen Inhibitoren **AS7-AS10** geplant.

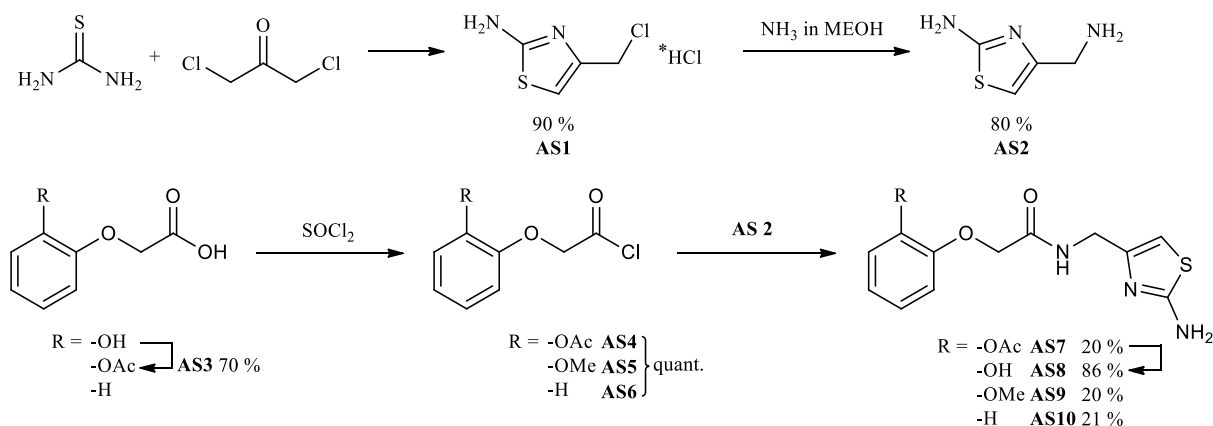


Abbildung 53: Syntheschema der potentiellen allosterischen Inhibitoren **AS7-AS10**

Die Synthese beginnt mit der Kondensation von Thioharnstoff und 1,3-Dichloraceton zum Aminothiazol **AS1** als Hydrochlorid-Salz in 90%iger Ausbeute. Die Umsetzung zu der entsprechenden Aminomethylverbindung durch Reaktion mit Ammoniak im Überschuss lieferte das Produkt in Form eines ockerfarbenen Feststoffs, der das Produkt laut NMR-Spektren zu ca. 80 % enthielt und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wurde. Die entsprechenden Phenylessigsäurederivate wurden im Falle der Hydroxyphenoxyessigsäure zunächst an der phenolischen Hydroxylgruppe mit 70%iger Ausbeute acetyliert (**AS3**), die Derivate mit Methoxygruppe und die Phenoxyessigsäure wurden direkt erworben. Alle Phenoxyessigsäurederivate wurden zur Kopplung mit Thionylchlorid zu den entsprechenden Säurechloriden (**AS4-6**) quantitativ umgesetzt und direkt gekoppelt. Diese Kopplungen verliefen jeweils mit schlechten Ausbeuten von lediglich 20 %, was jedoch genügte um die entsprechenden Verbindungen gut aufzureinigen, zu analysieren und zu testen. Die Deacetylierung von **AS7** zu **AS8** mit Natriummethanolat verlief wie zu erwarten in guter Ausbeute von 70 %.

## Ergebnisse

### 3.1.3 Sonstige Synthesen

#### 3.1.3.1 Substratsynthesen

Die Substrate für die Fluoreszenzassays sollten gemäß folgendem Schema (Abbildung 54) synthetisiert werden.

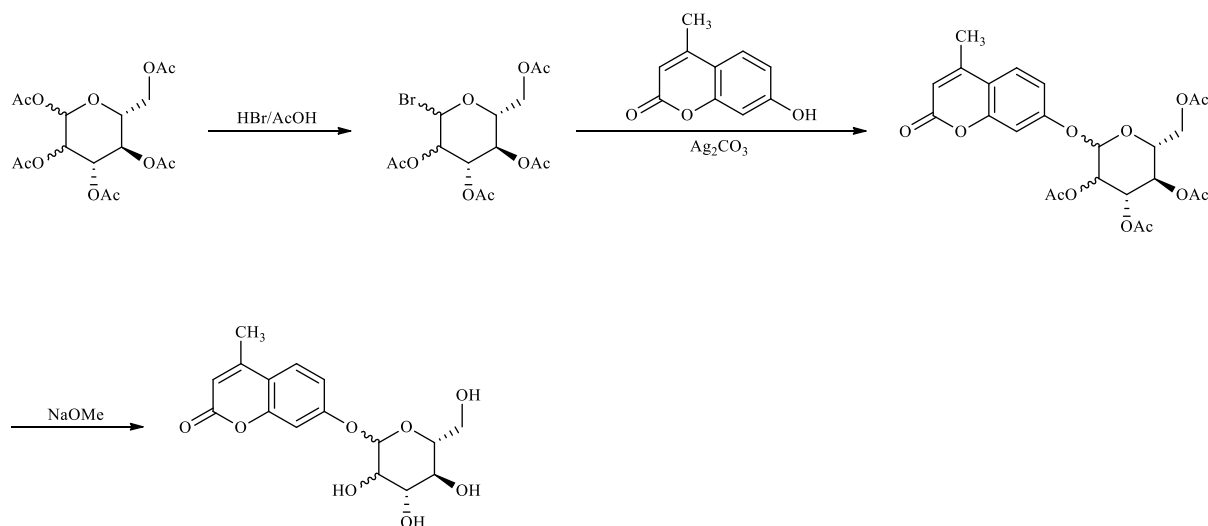


Abbildung 54: Syntheseroute für die Darstellung der Fluoreszenzsubstrate

Die Synthese sollte nach *Koenigs-Knorr* erfolgen. Dabei wird zunächst der peracetylierte Zucker in Position 1 bromiert und im Anschluss mit 4-Methylumbelliferon gekoppelt.

##### 3.1.3.1.1 Synthese des Glucosidase-Substrats 4-MU-Glc (GS)

Das Substrat für den fluorometrischen Assay mit  $\beta$ -Glucosidasen konnte analog der geplanten Syntheseroute in Abbildung 54 mit guten Ausbeuten (33 % über vier Stufen) dargestellt werden (vgl. Abbildung 55). Die Synthese von **GS3** (siehe Kapitel 3.1.3.1.1, Abbildung 55) im Sinne der *Koenigs-Knorr*-Glycosylierung<sup>147</sup> nach *Rodebaugh*<sup>148</sup> geht von dem peracetylierten Zucker aus, welcher durch Reaktion von Glucose mit Acetanhydrid und Iod als Katalysator in quantitativen Ausbeuten erhalten wurde. Die darauffolgende Bromierung an C1 lieferte aufgrund des Nachbargruppeneffekts ausschließlich das  $\alpha$ -Anomer<sup>148</sup> in 65%iger Ausbeute. Die anschließende Kupplung mit 4-Methylumbelliferon mittels Silbercarbonat verlief ebenfalls in guten Ausbeuten von 90 %. Die abschließende Entschützung mit Natriummethanolat erforderte säulenchromatographische Aufreinigung des Produktes, welches mit 56 % Ausbeute erhalten wurde. Damit betrug die Gesamtausbeute 33 % über vier Stufen.

## Ergebnisse

Die Synthese diente als Testsystem zur Übertragung auf die Synthese des entsprechenden Mannosidase-Substrats.

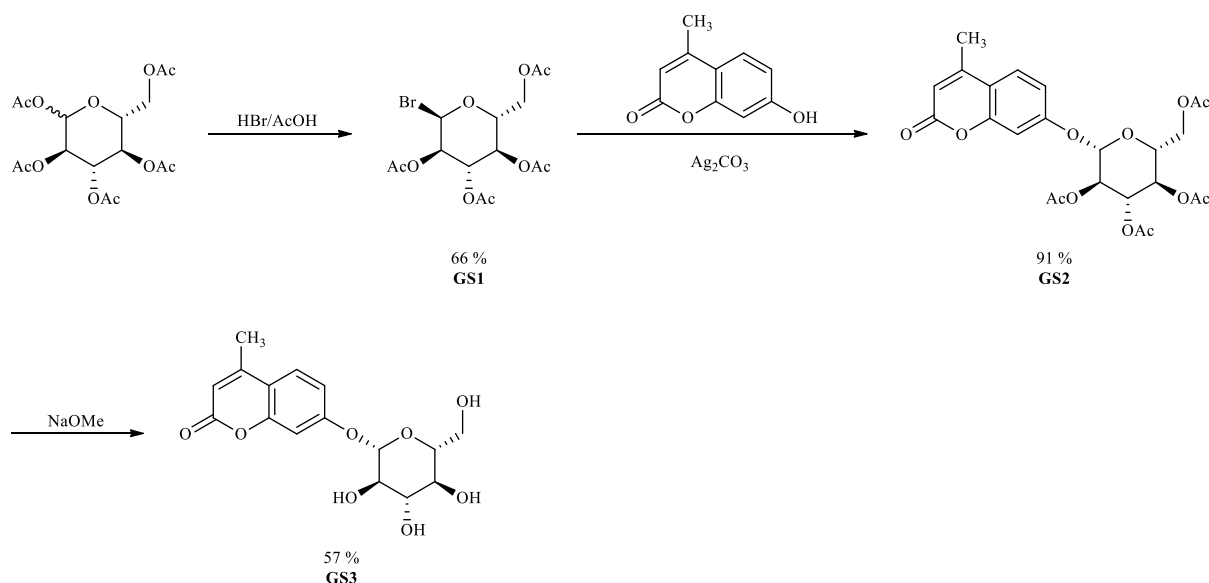


Abbildung 55: Syntheseroute für das Substrat des Fluoreszenzassays für  $\beta$ -Glucosidasen

### 3.1.3.1.2 Synthese des Mannosidase-Substrats 4-Mu-Man (MS)

Die Übertragung der Erkenntnisse aus der zuvor beschriebenen Synthese für das entsprechende  $\beta$ -Glucosidasesubstrat **MS5** (siehe Abbildung 56) war nur bedingt möglich. Die Synthese wurde zunächst analog zur Synthese des Glucosederivats (siehe Kapitel: 3.1.3.1.1) über die *Koenigs-Knorr*-Glycosylierung bestritten. Aufgrund von sehr geringen Ausbeuten der Kopplung mit 4-Methylumbelliferon von unter 10 % wurde eine alternative Route über das Trichloracetimidat<sup>149</sup> **MS3** als gute Abgangsgruppe gewählt. Dazu wurde zunächst die peracetylierte Mannose (durch Acetylierung mit Acetanhydrid und katalytischem Iod) an C1 durch Morpholin geschützt. Dies gelang in guten Ausbeuten von 90 %. Die darauffolgende Kopplung mit Trifluoracetimidat mit DBU als Base im leichten Überschuss lieferte das Produkt immerhin in 56%iger Ausbeute. Die darauffolgende Entschützung mittels Natriummethanolat erforderte (wie auch bei der Synthese von **GS3**) ebenfalls Aufreinigung durch Säulenchromatographie und lieferte das Produkt in 76%iger Ausbeute. Insgesamt wurde das Produkt mit einer Ausbeute von 31 % über fünf Stufen gewonnen. Damit ist diese Syntheseroute für das Mannoseanalogon der Synthese des Glucosids trotz einer zusätzlichen Reaktionsstufe ebenbürtig (**GS** wurde mit 33 % Ausbeute über vier Stufen gebildet).

## Ergebnisse

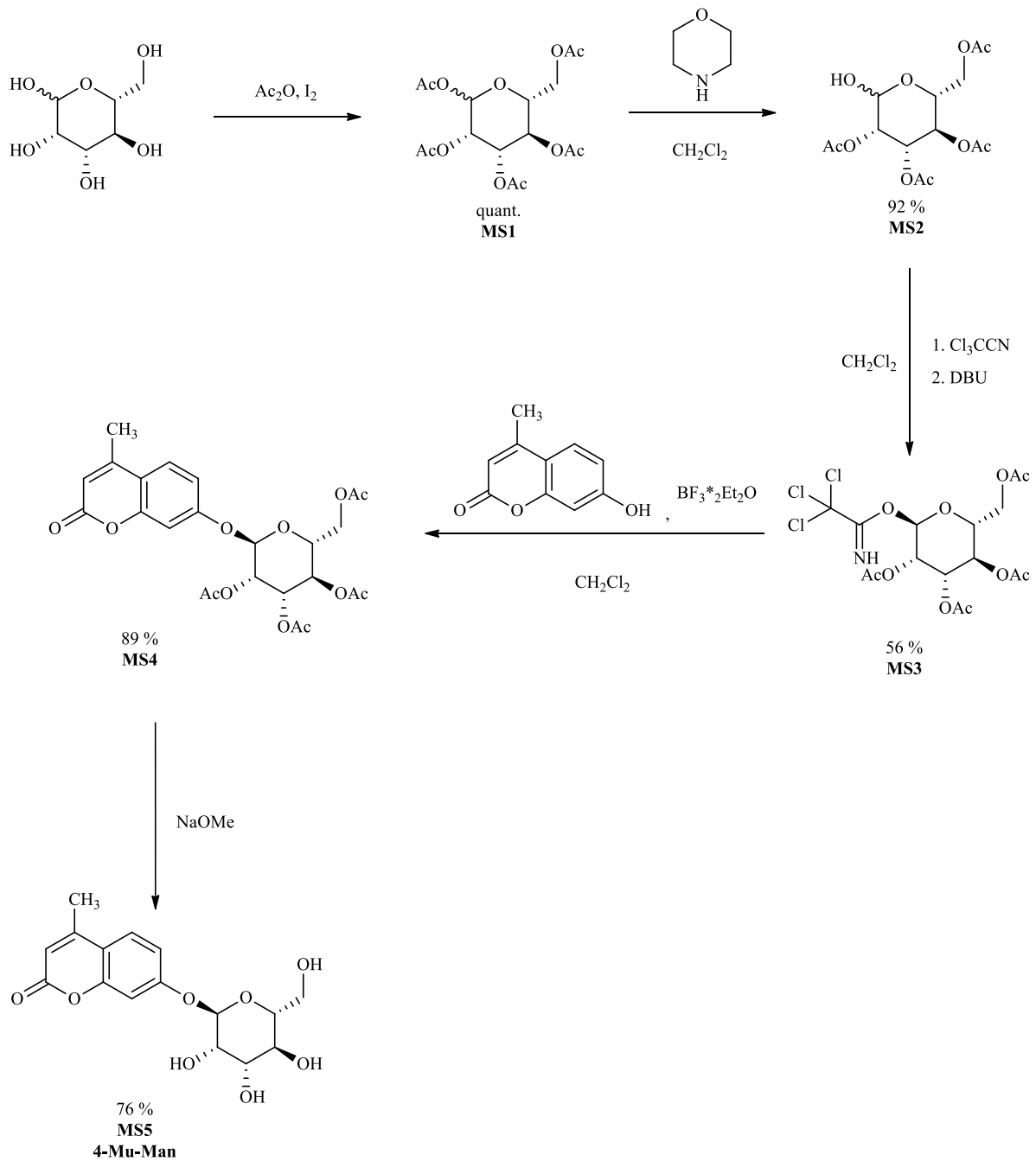


Abbildung 56: Syntheseroute zu dem Substrat für Fluoreszenzassays mit  $\alpha$ -Mannosidasen

### 3.1.3.2 Isofagomin

Die Syntheseroute von Isofagomin nach *Andersch* und *Bols*<sup>150</sup> (Abbildung 57) beginnt mit der Monobenzilylierung von *D*-Arabinose<sup>151</sup> mittels *in situ* Erzeugung von Benzylacetat aus Benzylalkohol und Acetylchlorid. Das Produkt (**Iso1**) konnte in 78%iger Ausbeute erhalten werden. Das für den nächsten Schritt notwendige  $\beta$ -Anomer konnte durch Kristallisation abgetrennt werden. Die folgende regioselektive Monooxidation am axialen C4 nach *Tsuda*<sup>152</sup>



## Ergebnisse

(**Iso2**) lieferte zwar ein komplexes isomeres Gemisch aus mindestens drei Verbindungen, dies jedoch in hohen Ausbeuten von 98 %. Zudem ließ es sich in der darauffolgenden *Henry*-Reaktion zum Nitromethan-Addukt umsetzen (**Iso3**). Diese ist nicht stereoselektiv und lieferte erwartungsgemäß ein Gemisch aus beiden Stereoisomeren (51 %). Zur besseren Trennung der Isomere erfolgte zunächst die Acetylierung aller noch freien OH-Gruppen mit 80 % Ausbeute (**Iso4**). Die reduktive Eliminierung mit Natriumborhydrid im nächsten Schritt lieferte erwartungsgemäß die beiden 4*R*- und 4*S*-Epimere (99 %, **Iso5**), welche aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Polarität verglichen mit den Endprodukten vor der letztendlichen katalytischen Hydrierung zum Isofagomin und dessen 5-Epimer chromatographisch getrennt wurden. Dabei konnte das 5-*S*-Isomer zu 46 %, das 5-*R*-Isomer zu 35 % sauber abgetrennt werden. Es verblieb eine Restfraktion als racemisches Gemisch, welche die übrigen 18 % Produkt enthielt. Die abschließende katalytische Hydrierung zur Entschützung lieferte Isofagomin (**Iso6**) in 75%iger Ausbeute (23 % über sechs Stufen) und 5-*epi*-Isfagomin (**Iso7**) in 44%iger Ausbeute (14 % über sechs Stufen).

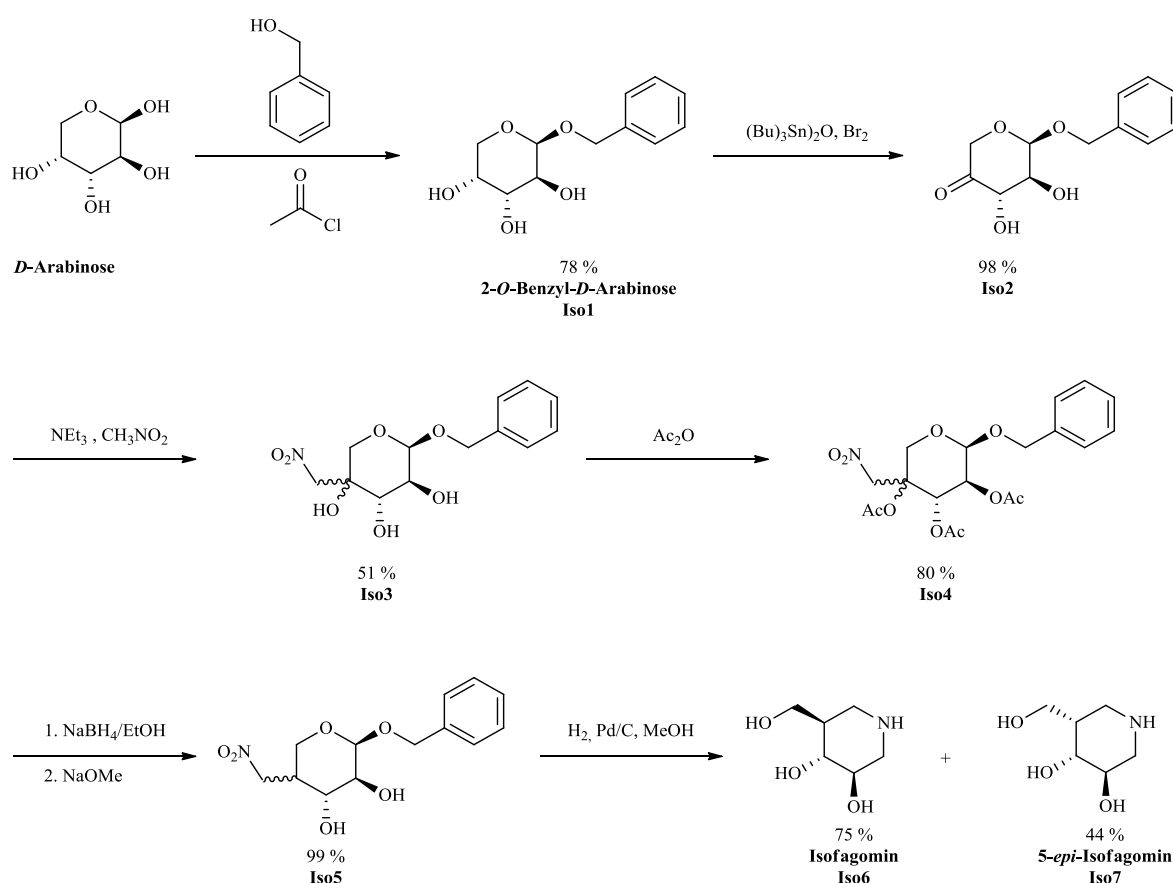


Abbildung 57: Syntheseroute zu Isfagomin nach *Andersch* und *Bols*<sup>150</sup>.

## Ergebnisse

### 3.1.3.3 Azamannose

Die geplante Syntheseroute für die Azamannose nach *Overkleeft et al.*<sup>127</sup> sowie geplante Derivatisierungen zu bicyclischen *N,O*-Acetalen ist in Abbildung 58 gezeigt.

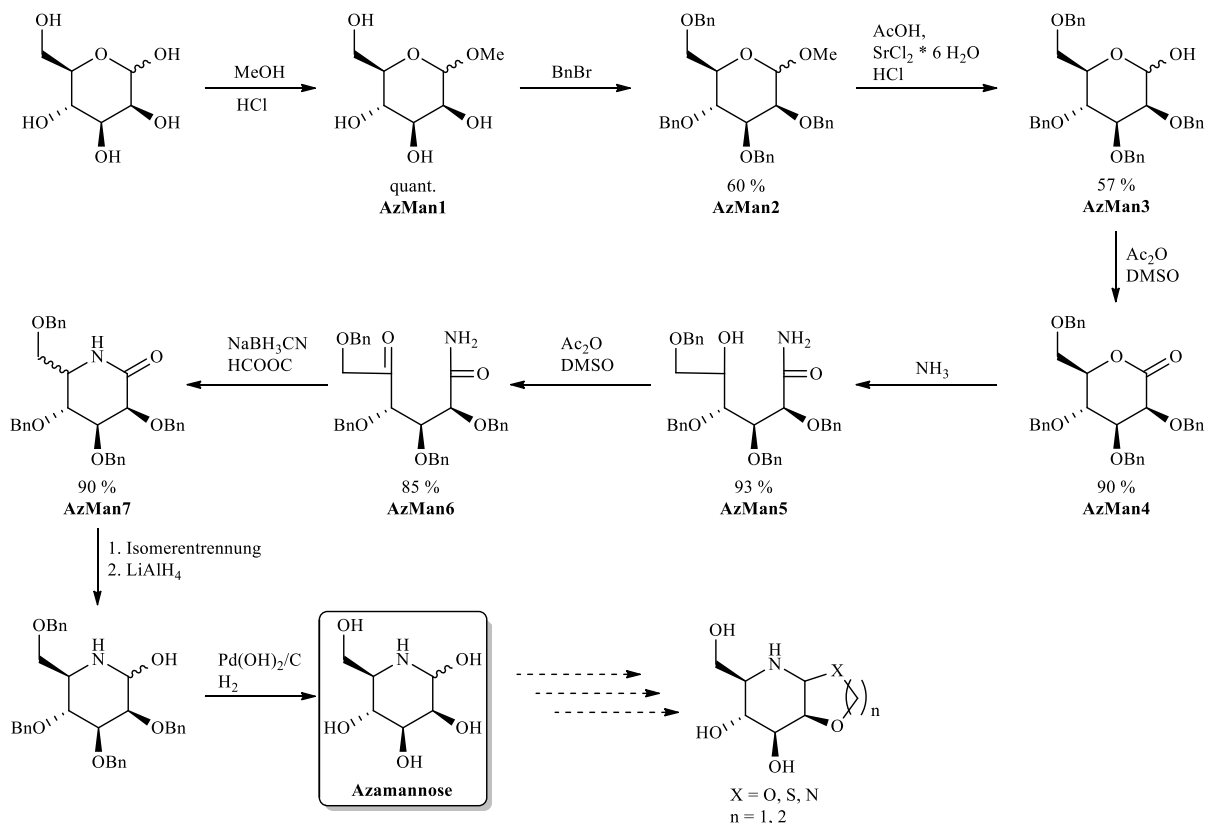


Abbildung 58: Geplante Syntheseroute für die Azamannose nach *Overkleeft et al.*<sup>153</sup> und *Rajanikanth*<sup>154</sup> sowie Derivatisierungen

Die Synthese beginnt mit der Methylierung an Position 1 (**AzMan1**) und der Benzylierung aller übrigen Hydroxy-Gruppen (**AzMan2**), gefolgt von selektiver Entschützung von Position 1 (**AzMan3**). Dieser Kohlenstoff wird im Anschluss oxidiert (**AzMan4**) und daraufhin, unter Ringöffnung die Aminogruppe eingeführt (**AzMan5**). Nach der Oxidation der dabei entstandenen Hydroxy-Gruppe (**AzMan6**) erfolgt der Ringschluss zur Iminstruktur durch reduktive Aminierung (**AzMan7**). Daraufhin werden die Isomere (an Position 5) getrennt. In der Literatur ist die Reduktion des Lactams zum Lactol (dem geschützten Azazucker) von *Rajanikanth*<sup>154</sup> beschrieben. Ausgehend von der Azamannose war danach die Synthese von bicyclischen *N,O*-Acetalen geplant.

Die Methylierung nach *Harworth* und *Bott*<sup>132</sup> (**AzMan1**) in Methanol mit katalytischen Mengen Schwefelsäure verlief mit guten Ausbeuten (quantitativ). Obwohl sie nicht stereoselektiv ist, ließen sich die beiden Anomere durch Kristallisation direkt aus der Reaktionslösung trennen.

## Ergebnisse

Dies wurde in Vorversuchen zur Darstellung des geschützten Lactons (**AzMan4**) untersucht, welche die Oxidation von **AzMan2** (mit Acetyl- anstelle von Benzylschutzgruppen) durch Chrom(VI)oxid zu **AzMan4** vorsah. Diese setzt ein axiales Wasserstoffatom an C1, also  $\alpha$ -Konfiguration voraus. Spätestens nach Acetylierung der übrigen Hydroxylgruppen und erneuter Kristallisation aus Methanol sind so die beiden Anomere in hoher optischer Reinheit, welche sich nach Gleichung 4 berechnet ( $op = 100\%$  für Tetra-O-acetylmethyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid sowie  $op = 94\%$  für Tetra-O-acetylmethyl- $\beta$ -D-mannopyranosid  $\cong 97\%$  Reinheit) erhältlich.

$$op = \frac{[\alpha]_{gemessen}}{[\alpha]_{maximal}} * 100\%$$

Gleichung 4: Berechnung der optischen Reinheit  $op$

Aufgrund der hohen Toxizität von Chrom(VI)oxid und dem Umstand, dass die Konfiguration am anomeren Zentrum für die letztendlich im größeren Umfang genutzte Oxidation mit DMSO und Essigyanhydrid nach *Rajanikanth*<sup>154</sup> im Sinne einer *Albright-Goldmann*-Oxidation unerheblich ist, wurde letztere Variante gewählt. Die vorangegangene Benzylierung konnte nur mit Benzylbromid und 18-Krone-6-Ether als Phasentransferkatalysator in THF mit Kaliumhydroxid als Base in hinnehmbaren Ausbeuten von 60 % durchgeführt werden. Andere Methoden wie beispielsweise die Verwendung von Benzylchlorid, anderen Basen und ohne Phasentransferkatalysator in anderen Lösemitteln führten zu wesentlich schlechteren Umsetzungen, meist zu Gemischen nicht vollständig benzylierter Spezies. Die darauffolgende Demethylierung an C1 verlief mit 57 % Ausbeute. Die Oxidation zu dem entsprechenden Lacton konnte wiederum mit guten Ausbeuten (90 %) durchgeführt werden. Die weiteren Umsetzungen bis zum Lactam **AzMan7** verliefen ebenfalls mit guten Ausbeuten (90 % für **AzMan5**, 85 % für die erneute Oxidation zu **AzMan6** sowie 90 % für die reduktive Aminierung zu **AzMan7**). Die säulenchromatographischen Abtrennung des 5-*epi*-Isomers (5*S*-konfiguriert) gelang durch gut angepasste Laufmittelverhältnisse.

Die Darstellung der Azamannose scheiterte allerdings an der partiellen Reduktion der Carbonylverbindung (**AzMan7**), da keine Bedingungen gefunden wurden, unter denen eine partielle Reduktion zum Lactol stattfand. Die Reduktion verlief entweder vollständig zur deoxidierten Verbindung (**AzMan8**) oder fand gar nicht statt (siehe Abbildung 59).

## Ergebnisse

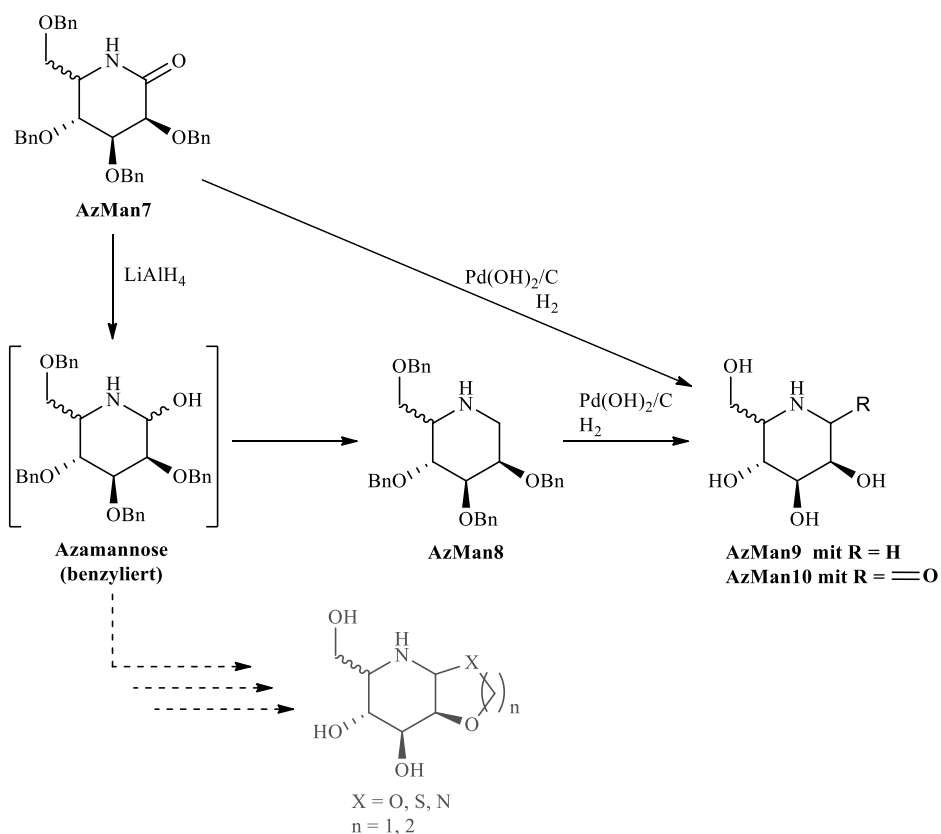


Abbildung 59: Synthetisierte Verbindungen im Rahmen der geplanten Synthese von Azamannose und deren geplanten Derivatisierungen zu bicyclischen Acetalen (in grau)

Zudem erforderte die Entschützung der Verbindungen mit Wasserstoff und Palladium(II)hydroxid recht harsche Bedingungen von mindestens 20 bar Wasserstoff-Druck, die im Arbeitskreis selbst nicht erzeugt werden konnten. Die Entschützung zu **AzMan9** (*L*-1-Deoxygulonojirimycin) aus der 5-epimeren Form **AzMan8** (82 %, 13 % über acht Stufen) und **AzMan10** (*D*-Manno- $\delta$ -lactam 55 %, 12 % über sieben Stufen) wurde nur noch der Vollständigkeit halber mit freundlicher Unterstützung des AK Opatz (Institut für Chemie der JGU) durchgeführt.

## Ergebnisse

### 3.2 Enzymassays

### 3.3 Allgemeine Vorbemerkungen

Die Etablierung der im Folgenden beschriebenen fluorometrischen Assays sowie die Testungen (mit Ausnahme der Testung der monocyclischen *N,O*-Acetale) wurden von Lina Irsheid unter Mithilfe von Bachelor- und Diplomstudentinnen im Arbeitskreis Schirmeister (JGU Mainz) durchgeführt.

#### 3.3.1 Zur Etablierung fluorometrischer Assays-Systeme

Um die Sensitivität der bisher zur Verfügung stehenden Testsysteme zu erhöhen und die Anfälligkeit für Mess- und Pipettierfehler zu verringern, wurden fluorometrische Assays etabliert. Im Vergleich zu der Messung von Absorptionen sind Fluoreszenzmessungen ca. hundertfach sensibler<sup>155</sup>. Zudem erlauben sie die kontinuierliche Verfolgung der Enzymaktivität durch Messung der Fluoreszenz des durch das Enzym kontinuierlich freigesetzten Fluoreszenzfarbstoffs, im Gegensatz zu dem bis dato zur Verfügung stehenden photometrischen Assay, bei dem die Auswertung nach vorangegangener Stoppreaktion (wie in dem folgenden Kapitel 3.3.2 Assayaufbau beschrieben. Somit handelt es sich dabei um eine Zweipunktmessung, wobei einer der Messpunkte der Nullwert ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit muss aus der Steigung der so erhaltenen Reaktionsgeraden errechnet werden. Nun zeigen typische Enzymreaktionen keinen linearen Verlauf der Produktbildung mit der Zeit. Vielmehr besitzen sie einen linearen Bereich zu Beginn der Reaktion, welcher sich dann asymptotisch dem maximalen Umsatz nähert<sup>155</sup>. Somit muss für photometrische Assays-Systeme sichergestellt sein, dass der Messpunkt innerhalb des linearen Bereichs liegt, da es ansonsten zu erheblichen Abweichungen kommen kann. In fluorometrischen Assays wird dagegen die Umsatzkurve bis zum Erreichen von  $v_{\max}$ , der Sättigung, aufgenommen und die Reaktionsgeschwindigkeit aus dem linearen Teil bestimmt.

## Ergebnisse

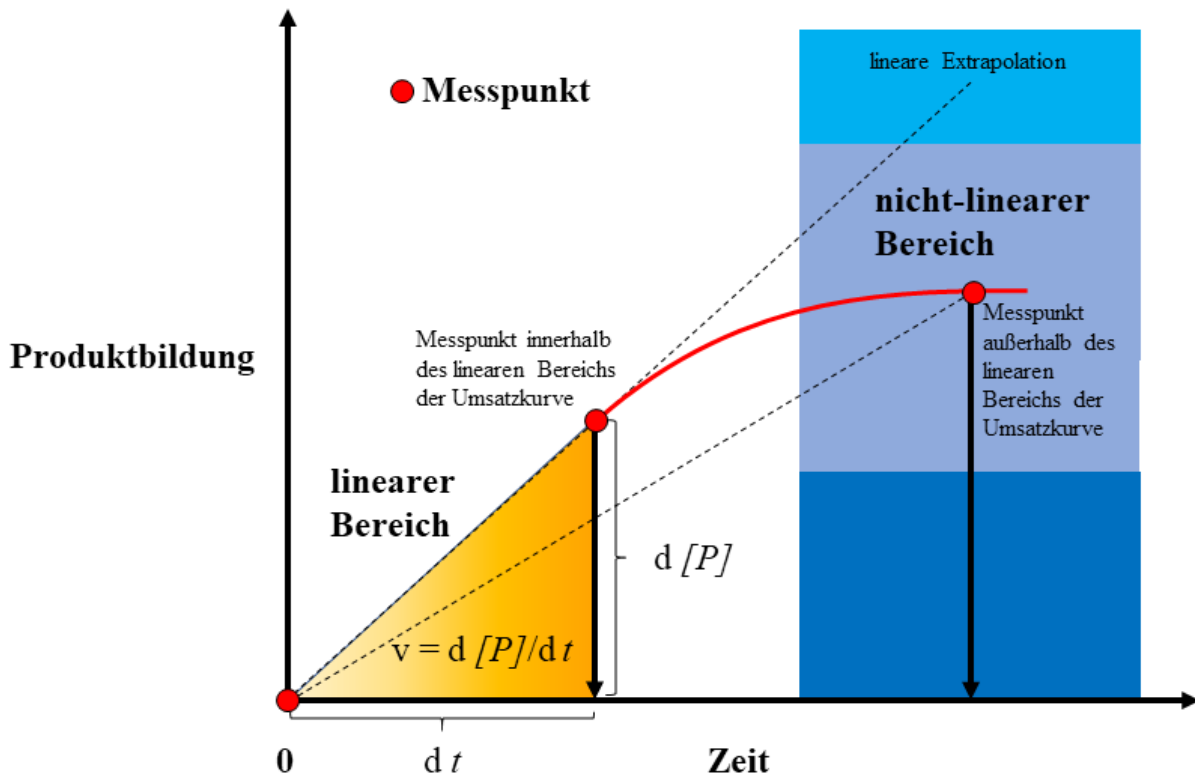


Abbildung 60: Umsatzkurve einer typischen Enzymreaktion nach Bisswanger<sup>155</sup>

### 3.3.2 Assayaufbau

Die kommerziell erhältliche JBM war das erste dem Arbeitskreis Schirmeister zur Verfügung stehende Modellenzym für die GMII, bis die Arbeitsgruppe von Professor Dr. Seibel (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) die dGMII aus *Drosophila melanogaster* zur Verfügung stellte. Für die JBM wurde von Michael Juchum 2012 während seiner Diplomarbeit im Arbeitskreis Schirmeister ein photometrischer Assay etabliert<sup>134</sup>. Als Substrat fungiert dabei 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-mannopyranose, welches durch das Enzym gespalten wird. Nach einer definierten Zeit wird die Reaktion durch Zugabe von Natriumcarbonat gequencht und das freigesetzte Nitrophenol zum Phenolat deprotoniert und dessen Absorption bei 405 nm gemessen (siehe Abbildung 61).

## Ergebnisse

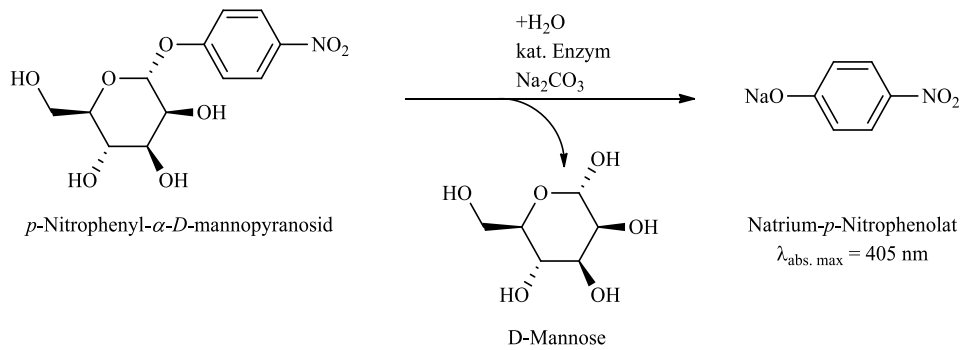


Abbildung 61: Bildung der photometrisch detektierbaren Spezies Natrium-*p*-Nitrophenolat im photometrischen Essayssystem

Zur effektiveren Messung und Erhöhung der Sensitivität durch kontinuierlich Verfolgung des Umsatzes wurde ein fluorometrischer Assay auf Grundlage von 4-Methylumbelliferyl-glycosiden als Substrat etabliert. Diese Substrate spalten durch das Enzym die fluoreszierende Umbelliferon-Einheit ab, wodurch die Umsetzung durch das Enzym kontinuierlich beobachtet werden kann (siehe Abbildung 62). Zu diesem Zweck wurden die beiden Substrate 4-Methylumbellifer-7-yl- $\beta$ -*D*-glucopyranosid (**GS**) und 4-Methylumbellifer-7-yl- $\alpha$ -*D*-mannopyranosid (**MS**) synthetisiert (siehe Kapitel 3.1.3.1).

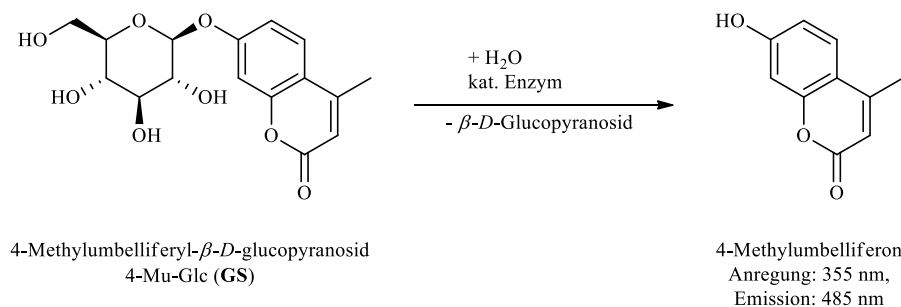


Abbildung 62: Konversion der Fluoreszenz-Substrate durch Glycosidasen, hier beispielhaft anhand der Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs 4-Methylumbelliferon aus 4-MU-Glc durch  $\beta$ -Glucosidasen

### 3.4 Enzymkinetik

Im Folgenden sollen die theoretischen Grundlagen der Enzymkinetik erläutert werden. Diese beschäftigt sich generell mit der enzymatisch katalysierten Umsetzung chemischer und biologischer Reaktionen. Dabei wird der zeitliche Umsatz eines definierten Substrats durch ein Enzym betrachtet. Die Auftragung der Umsatzgeschwindigkeiten eines Substrats ( $d[S]/dt$ ) gegen die jeweiligen Substratkonzentrationen  $[S]$  führen zu einer typischen Sättigungskurve, die sich durch die *Michaelis-Menten-Gleichung*<sup>156</sup> für das in Abbildung 63 gezeigte Reaktionsschema beschreiben lässt.

## Ergebnisse

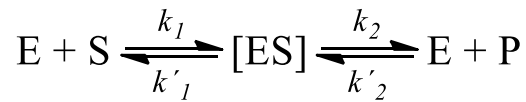


Abbildung 63: Umsetzung eines Substrats S durch ein Enzym E zu einem Produkt P über den Enzym-Substrat-Komplex [ES] und die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten k.

Als Voraussetzungen für die Gültigkeit der *Michaelis-Menten*-Gleichung (Gleichung 5) wird davon ausgegangen, dass folgende Annahmen gelten:

- Die Rückreaktion von Enzym und Produkt zum Enzym-Substrat-Komplex kann vernachlässigt werden, da ein hoher Substratüberschuss gegenüber der vernachlässigbaren Produktkonzentration von nahe 0 zu Beginn der Reaktion die Gleichgewichtslage praktisch vollständig auf die Produktseite verschiebt ( $k'_2 \approx 0$ ).
- Es stellt sich ein Fließgleichgewicht zwischen den Konzentrationen von Enzym und Substrat S und dem sich daraus bildenden ES-Komplex ein. Daraus folgt, dass der ES-Komplex so schnell gebildet wird, wie er abgebaut wird ( $k_1 = k'_1$ ) und seine Konzentration während der Reaktion konstant ist
- Die enzymatisch katalysierte Reaktion ist demnach langsam im Vergleich zum Abbau des Enzym-Substrat-Komplexes im Gleichgewicht ( $k_2 \ll k'_1$ )

Unter diesen Voraussetzungen definierten Michaelis und Menten 1913 die Geschwindigkeit der Enzymreaktion in Gleichung 5

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

Gleichung 5: Michaeli-Menten Gleichung mit:  $v_{\max}$  = maximale Geschwindigkeit bei vollständiger Sättigung des Enzyms; [S] = Substratkonzentration;  $K_M$  = Michaelis Menten Konstante

Darin steht  $K_M$  für die Michaelis Konstante, welche die Substratkonzentration widerspiegelt, bei welcher die Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}$  halbmaximal ist. Sie ist somit ein Maß für die Affinität des Substrats zum Enzym. Zur graphischen Darstellung der *Michaelis-Menten*-Gleichung wird die Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration aufgetragen (Abbildung 64).



## Ergebnisse

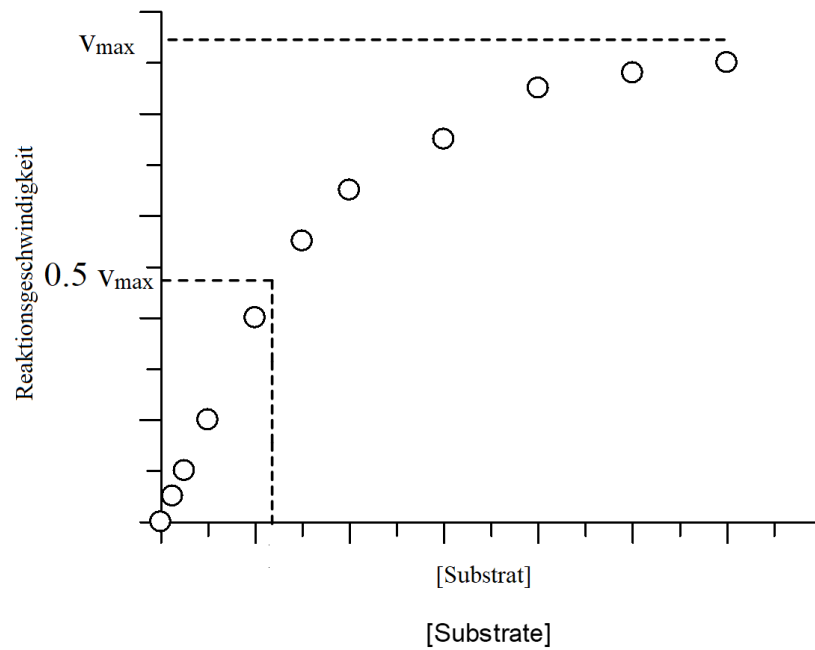


Abbildung 64: Michaelis-Menten Sättigungskurve

Die hyperbolische *Michaelis-Menten*-Sättigungskurve kann linearisiert werden, indem die reziproken Geschwindigkeitswerte ( $1/v$ ) gegen die reziproken Substratkonzentrationen ( $1/[S]$ ) aufgetragen werden, was in der sogenannten Lineweaver-Burk-Auftragung resultiert. Dabei können  $K_M$  und  $v_{\max}$  aus der Steigung und dem x-Achsenabschnitt erhalten werden.

## Ergebnisse

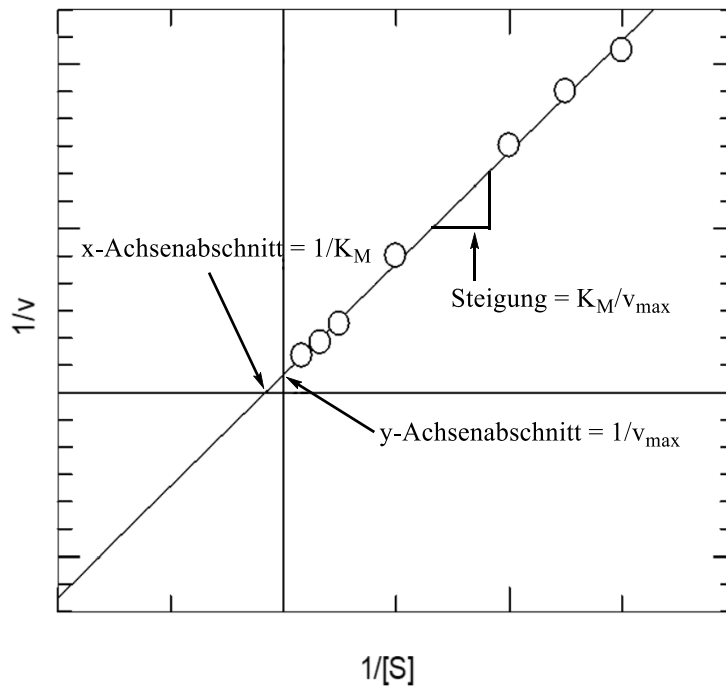


Abbildung 65: Lineweaver-Burk Auftrgaug der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit über der reziproken Substratkonzentration mit den daraus erhältlichen Kenngrößen  $1/K_M$  aus dem x-Achsenabschnitt,  $1/v_{\max}$  aus dem y-Achsenabschnitt sowie dem Verhältnis von  $K_M/v_{\max}$  aus der Steigung

Ein allgemeines Maß für die Bindungsaffinität eines Liganden ist die Dissoziationskonstante  $K_d$ . Sie beschreibt das Verhältnis von Bindungsspaltung zu Bindungsbildung.

$$K_d = \frac{[E] * [S]}{[ES]} = \frac{k'_1}{k_1}$$

### 3.5 Enzyminhibition

Generell können Inhibitoren in reversible und nicht reversible Wirkmechanismen eingeteilt werden. Dabei bilden irreversible Inhibitoren eine kovalente Bindung zum Rezeptor aus. Im Gegensatz dazu bilden nicht-kovalente Inhibitoren Wechselwirkungen zum Rezeptor auf Grundlage von elektrostatischen Kräften, Wasserstoffbrückenbindung und hydrophoben van der Waals Kräften aus. Nicht-kovalente Inhibition kann in drei weitere Mechanismen unterteilt werden, welche in Abbildung 66 dargestellt sind.

## Ergebnisse

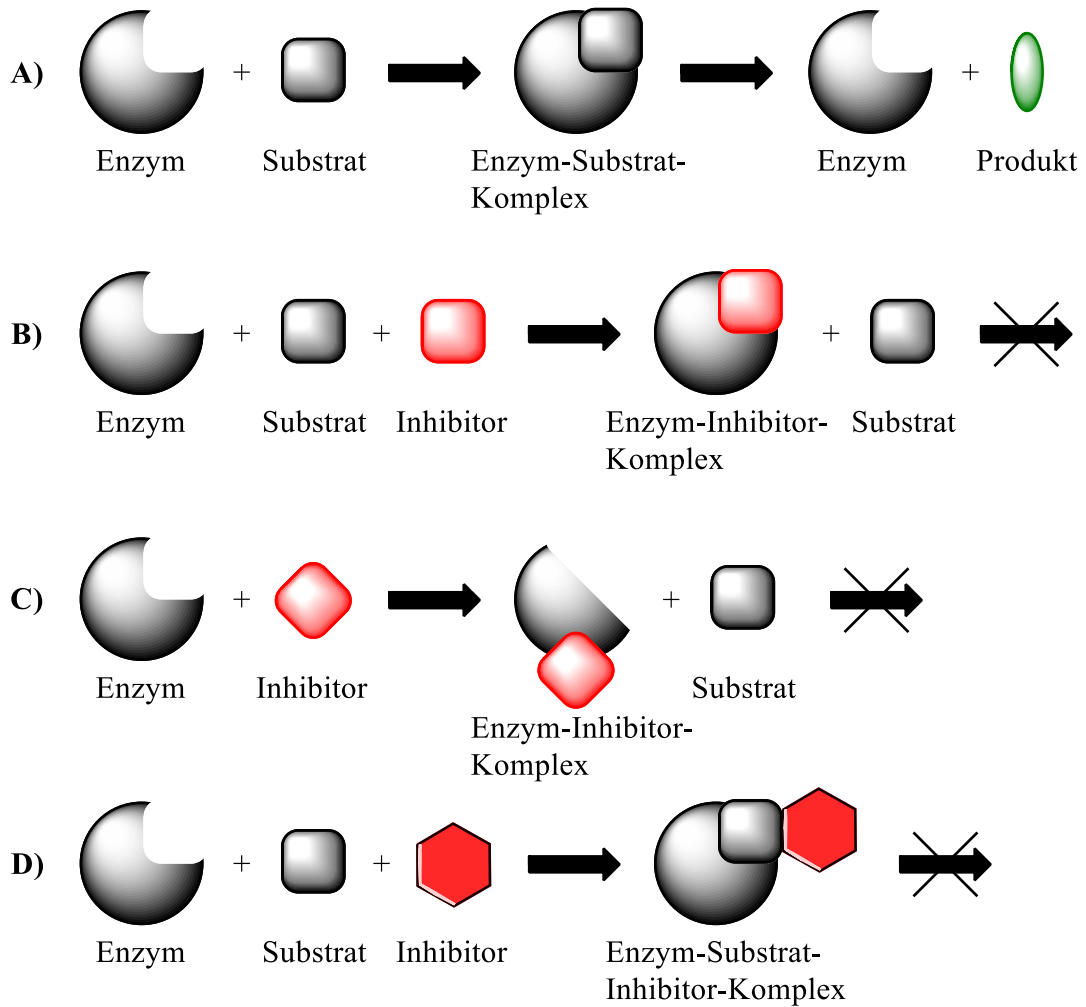


Abbildung 66: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Hemmtypen: A) keine Hemmung; B) kompetitive Hemmung; C) nicht-kompetitive Hemmung; D) unkompetitive Hemmung

### 3.5.1 Kompetitive Inhibitoren

Als Substrat-Mimetikum konkurriert der Inhibitor mit dem Substrat um das aktive Zentrum des Enzyms. Somit bildet sich neben dem Enzym-Substrat-Komplex zusätzlich ein Enzym-Inhibitor-Komplex aus. In der kinetischen Betrachtung erscheint also ein weiteres Gleichgewicht:

## Ergebnisse

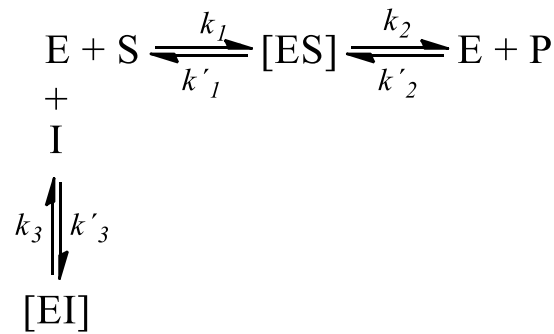


Abbildung 67: Kinetische Betrachtung kompetitiver Inhibitoren

In der *Michaelis-Menten*-Gleichung macht sich dies in Form einer scheinbaren Erhöhung des  $K_M$ -Wertes bei gleichbleibendem  $v_{\max}$  bemerkbar. Der Grund dafür liegt in der Möglichkeit der Verdrängung des Inhibitors aus dem aktiven Zentrum des Enzyms durch das Substrat bei hohen Substratkonzentrationen. Damit lautet die *Michaelis-Menten*-Gleichung für kompetitiv gehemmte Enzymsysteme:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

Gleichung 6: *Michaelis-Menten* Gleichung für kompetitive Inhibition

Für Inhibitorkonzentrationen gegen Null geht diese Gleichung in die bereits oben erläuterte *Michaelis-Menten*-Gleichung für ungehemmte Reaktionen über. In der reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk schneiden sich die Geraden für ungehemmte und für kompetitiv gehemmte Reaktionen auf der y-Achse (Abbildung 68). Auch hier ist die Rückreaktion des Produkts mit dem Enzym zum Enzym-Substrat-Komplex bei Betrachtung kurzer Zeiträume bei hoher Substratkonzentration vernachlässigbar.

## Ergebnisse

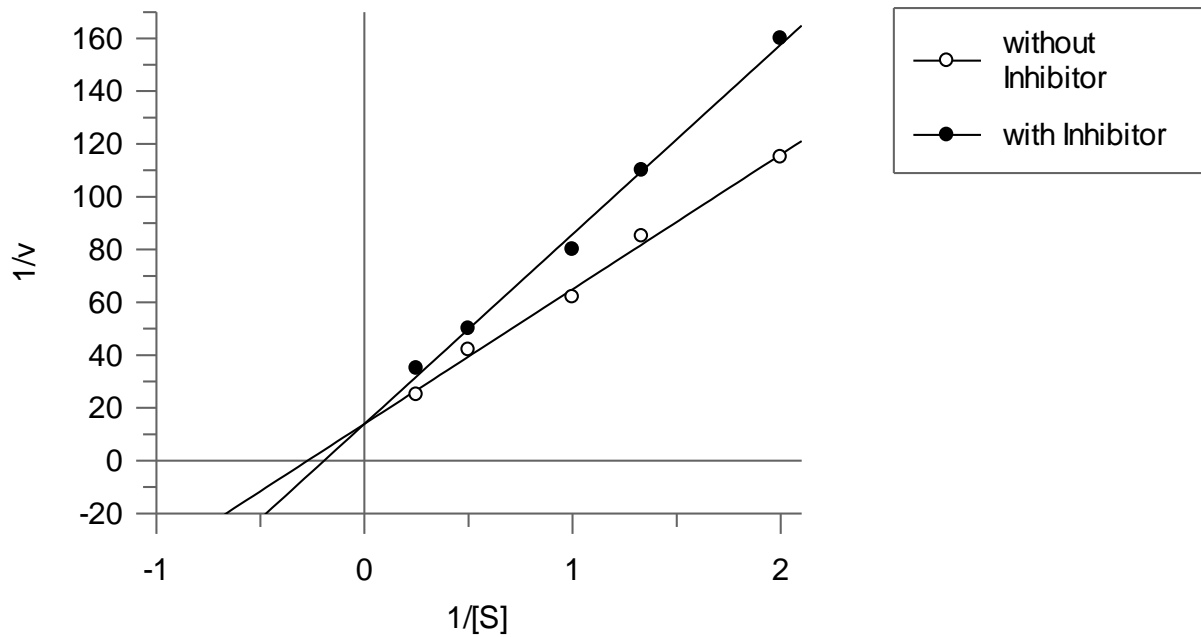


Abbildung 68: Lineweaver-Burk Auftragung für kompetitive Inhibitoren

### 3.5.2 Nicht-kompetitive Inhibitoren

Nicht-kompetitive und allosterische (von griech. ἄλλως *allos* (anders) und στερεός *stereós* (Ort)) Inhibitoren binden nicht an derselben Stelle wie das Substrat. Nicht-kompetitive Inhibitoren binden dabei sowohl an das freie Enzym wie auch an den Enzym-Substrat-Komplex. Allosterische Inhibitoren binden hingegen nur an das freie Enzym und bewirken eine Strukturveränderung, welche die Substrataffinität herabsetzt und den  $K_M$ -Wert damit erhöht. Da keine Konkurrenz zwischen Inhibitor und Substrat um das aktive Zentrum des Enzyms besteht, bleibt der  $K_M$ -Wert des Enzyms bei nicht-kompetitiver Hemmung unverändert. Im Vergleich zur ungehemmten Reaktion steht jedoch weniger funktionales Enzym zur Verfügung, wodurch  $v_{max}$  herabgesetzt wird. In der schematischen Betrachtung der Enzymkinetik liegen damit folgende Gleichgewichte vor (wobei formal die Rückreaktion des Produkts mit dem Enzym zum Enzym-Substrat-Komplex bei Betrachtung kurzer Zeiträume mit hoher Substratkonzentration wiederum vernachlässigbar ist):

## Ergebnisse

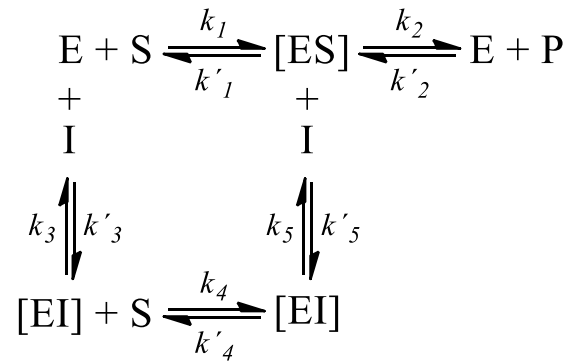


Abbildung 69: Kinetische Betrachtung nicht-kompetitiver Inhibitoren

Die *Michaelis-Menten*-Gleichung verändert sich dadurch zu:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{i,1}}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{i,2}}\right)}$$

Gleichung 7: *Michaelis-Menten* Gleichung für nicht-kompetitive Inhibition

Mit der Näherung:

$$K_i \approx K_{i,1} \approx K_{i,2}$$

vereinfacht sich diese Gleichung zu:

$$v = \frac{1}{\frac{[I]}{K_i}} \cdot \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Gleichung 8: Genäherte *Michaelis-Menten* Gleichung für nicht-kompetitive Inhibition

Für Inhibitorkonzentrationen gegen Null geht diese Gleichung ebenfalls in die bereits oben erläuterte *Michaelis-Menten*-Gleichung für ungehemmte Reaktionen über. In der reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk schneiden sich die Geraden für ungehemmte und für nicht-kompetitiv gehemmte Reaktionen (im Gegensatz zu kompetitiv gehemmten Reaktionen) auf der x-Achse (Abbildung 70).

## Ergebnisse

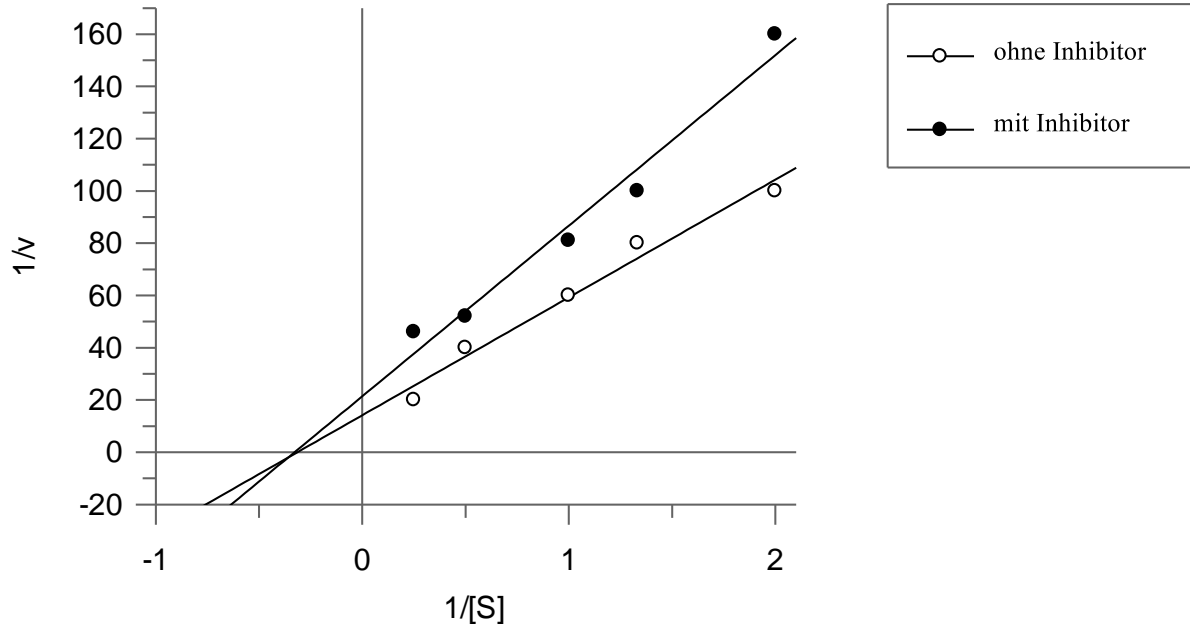


Abbildung 70: Lineweaver-Burk Auftragung für nicht-kompetitive Inhibitoren

### 3.5.3 Unkompetitive Inhibitoren

Der Fall einer unkompetitiven Hemmung liegt selten vor. Bei ihm bindet der Inhibitor nur unter der Voraussetzung an eine Stelle außerhalb des aktiven Zentrums des Enzyms, wenn bereits ein Substratmolekül im aktiven Zentrum gebunden ist. Dies verhindert eine Umsetzung des Substrats zum Produkt. Auch hier ist die Rückreaktion von Produkt und Enzym zum Enzym-Substrat-Komplex aus den o. g. Gründen vernachlässigbar.

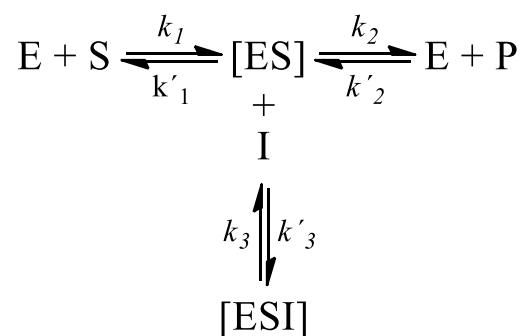


Abbildung 71: Kinetische Betrachtung unkompetitiver Inhibitoren

## Ergebnisse

In der *Michaelis-Menten*-Kinetik äußert sich dies sowohl in einer Erniedrigung von  $K_M$  als auch von  $v_{max}$ , wobei deren Verhältnis zueinander unverändert bleibt. Die *Michaelis-Menten*-Gleichung für unkompetitive Hemmung lautet:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Gleichung 9: *Michaelis-Menten* Gleichung für unkompetitive Inhibition

Durch Lineweaver-Burk-Auftragung erhält man eine Gerade, die parallel zu der einer ungehemmten Reaktion verläuft (Abbildung 72).

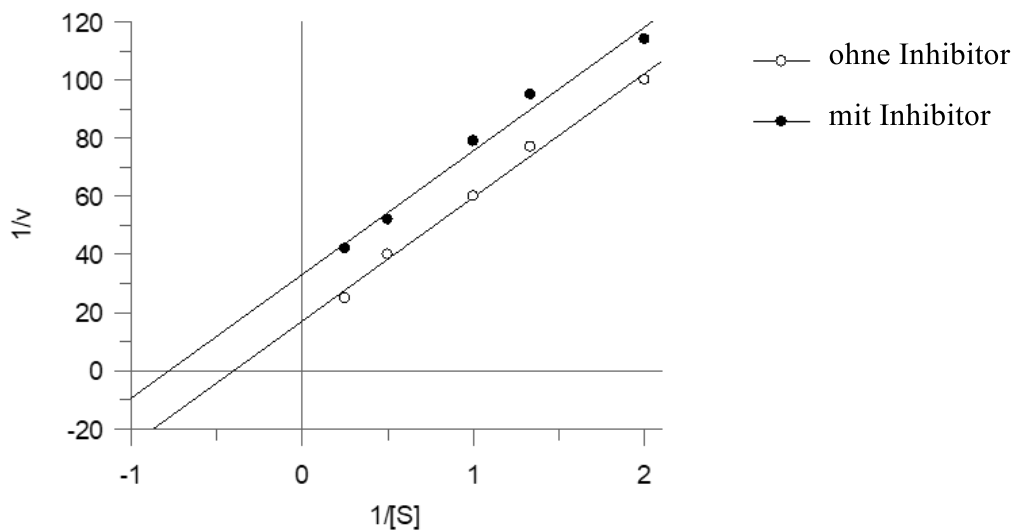


Abbildung 72: Lineweaver-Burk Auftragung für unkompetitive Inhibition

### 3.5.4 Slow-binder

Die meisten Inhibitoren stellen das Bindungsgleichgewicht mit dem Enzym sehr schnell ein. Sogenannte *slow, tight-binder* hingegen bauen dieses Gleichgewicht auf einer viel langsameren Zeitskala auf und werden daher als zeitabhängige Inhibitoren bezeichnet. Diese langsam an das Enzym bindenden Inhibitoren verändern dadurch die Umsatzrate mit der Zeit. Die Umsatz-Zeit-Kurven sind somit nicht mehr linear. Aus ihnen lassen sich zwei Steigungen,  $v_i$  (initiale Geschwindigkeit) und  $v_s$  (Gleichgewichtssteigung) ableiten (Abbildung 73). Zu Beginn der Reaktion besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Produktbildung und Zeit. Diese



## Ergebnisse

anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit ändert sich dann zu einer langsameren Gleichgewichtsgeschwindigkeit. Durch diesen zeitlich verzögerten Beginn der Inhibition sollten sich unterschiedliche Inhibitionswerte vor und nach Inkubation von Enzym und Inhibitor beobachten lassen.

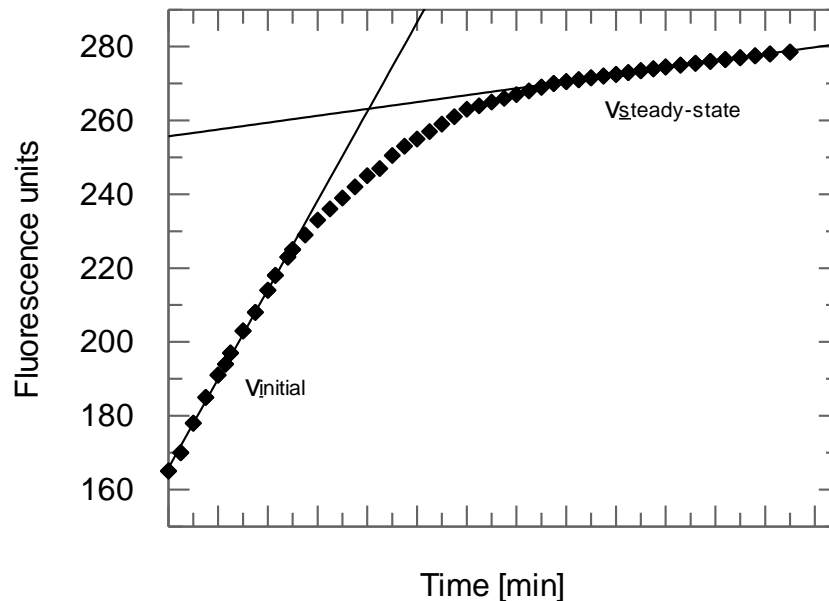


Abbildung 73: Umsatzkurve für einen langsam bindenden Inhibitor

Formal können nach *Copeland*<sup>157</sup> vier verschiedene Arten von Interaktionen unterschieden werden, welche die Kinetik von Inhibitoren verlangsamen können, nämlich:

1. Es bindet gar kein Inhibitor an das Enzym.
2. Die Gleichgewichtskonstanten der Enzym-Inhibitor-Interaktion sind sehr klein im Vergleich zur Umsatzrate des Enzyms, wenn der Inhibitor reversibel hemmt.
3. Der Inhibitor erzeugt durch die Bindung an das Enzym einen EI-Komplex, welcher dann zu einem neuen Komplex  $E^*I$  isomerisiert.
4. Ein irreversibler Inhibitor fungiert als *affinity-label* für das Enzym und verlangsamt so dessen Reaktion.

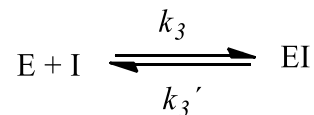
Die Interaktionen der Punkte 2 und 3 sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

## Ergebnisse

### Zu 2.:

In einem simplen einstufigen Mechanismus (Abbildung 74), Schema **A**) sind die Geschwindigkeitskonstanten  $k_3$  und  $k_3'$  sehr klein im Vergleich zu nicht langsam bindenden reversiblen Inhibitoren. Dadurch schreitet die Inhibition lediglich langsam voran. Der entsprechende  $K_i$ -Wert errechnet sich nach Gleichung 10.

**A)**



**B)**

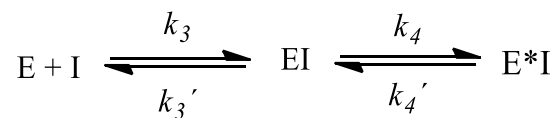


Abbildung 74: A) Simple reversibler slow binder; B) Enzymisomerisierung

$$K_i = \frac{k_3'}{k_3} = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Gleichung 10:  $K_i$  = Inhibitionskonstante;  $[E]$  = Enzymkonzentration;  $[I]$  = Inhibitorkonzentration,  $[EI]$  = Konzentration des Enzym-Inhibitor Komplexes;  $k_n$  = Geschwindigkeitskonstanten

### Zu 3.:

Nach Schema **B**) in Abbildung 74 findet ein zweistufiger Bindungsprozess statt, in dem Enzym und Inhibitor zunächst einen EI-Komplex bilden, aus welchem dann ein hochaffiner, isomerer Enzym-Inhibitor-Komplex  $E^*I$  gebildet wird. Mit  $K_i$  als Dissoziationskonstante des zuerst gebildeten EI-Komplexes errechnet sich  $K_i^*$ , die Dissoziationskonstante des daraus gebildeten  $E^*I$ -Komplexes nach Gleichung 11

$$K_i^* = \frac{K_i k_4'}{k_4 + k_4'} = \frac{[E][I]}{[EI] + [E^*I]}$$

Gleichung 11:  $K_i$  = Inhibitionskonstante;  $[E]$  = Enzymkonzentration;  $[I]$  = Inhibitorkonzentration,  $[EI]$  = Konzentration des Enzym-Inhibitor Komplexes;  $[E^*I]$  = Konzentration des isomeren Enzym-Inhibitor Komplexes;  $k_n$  = Geschwindigkeitskonstanten

## Ergebnisse

### 3.5.5 Formeln

Alle Verbindungen, die in der höchsten Konzentration eine Inhibition von weniger als 40% der Enzymaktivität bewirken wurden in der vorliegenden Arbeit als inaktiv angesehen.

Die Inhibition wurde nach Gleichung 12 berechnet:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{Aktivität (mit Inhibitor)}}{\text{Aktivität (ohne inhibitor)}} \right) \cdot 100$$

Gleichung 12: Gleichung zur Berechnung der Inhibition

IC<sub>50</sub>-Werte wurden nach Gleichung 13 berechnet:

$$y = \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + \left( \frac{[I]}{IC_{50}} \right)^s} + y_{\min}$$

Gleichung 13: Gleichung zur Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte

Wobei  $y_{\max}$  und  $y_{\min}$  als 100% bzw. 0% Enzymaktivität,  $s$  als Steigung des linearen Teils der Kurve (Hill-Koeffizient) und  $[I]$  als Inhibitor-Konzentration definiert sind.

K<sub>i</sub>-Werte für kompetitive Inhibitoren wurden nach Gleichung 9 berechnet:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}$$

Gleichung 14: Gleichung zur Berechnung der K<sub>i</sub>-Werte für kompetitive Inhibition

K<sub>i</sub>-Werte für nicht-kompetitive Inhibition wurden nach Gleichung 15 berechnet:

$$v = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \cdot \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Gleichung 15: Gleichung zur Berechnung der K<sub>i</sub>-Werte für nicht-kompetitive Inhibition

Dabei ist  $v$  bzw.  $v_{\max}$  die (extrapolierte maximale) Dissoziationsgeschwindigkeit,  $[S]$  die Substratkonzentration,  $[I]$  die Inhibitorkonzentration und  $K_M$  die Michaelis-Konstante.

IC<sub>50</sub> Werte und K<sub>i</sub>-Werte für kompetitive Inhibitoren hängen nach der *Cheng-Prusoff* Gleichung<sup>158</sup> (Gleichung 16) voneinander ab:

## Ergebnisse

$$IC_{50} = \left( \frac{[S]}{K_M} + 1 \right) \cdot K_i$$

Gleichung 16: *Cheng-Prusoff* Gleichung

Zudem wurde der Lineweaver-Burk-Plot zur Bestimmung des Hemmtyps verwendet. Dabei wurden die reziproken Geschwindigkeiten gegen die reziproken Substratkonzentrationen aufgetragen und einer klassischen linearen Regression ( $y = a + bx$ ) unterzogen. Gelegentlich wurden dabei nur die Daten bei höheren Substratkonzentrationen verwendet. Zur Berechnung der  $IC_{50}$ - und  $K_i$ -Werte sowie der Erstellung der entsprechenden Diagramme wurde das Programm GraFit<sup>®</sup> (Version 5.0.13, Erithacus Software, Horley, Surrey, UK (2006)) verwendet.

## Ergebnisse

### 3.6 Enzymassays

Die Etablierung der fluorimetrischen Assays und die Testungen erfolgten, abgesehen von den monocyclischen *N,O*-Acetalen, in Kooperation mit Studierenden der Johannes Gutenberg-Universität, namentlich Christina Gardiner und Vanessa Efinger im Rahmen ihrer Bachelorarbeiten sowie mit Malena dos Santos im Zusammenhang mit ihrer Diplomarbeit unter Anleitung von Lina Irsheid. Die detaillierten Ergebnisse sind der Dissertation „*New inhibitors of Golgi- $\alpha$ -mannosidase II*“ (L. Irsheid, 2018)<sup>121</sup> entnommen und der Vollständigkeit halber im Anhang (Kapitel 7.3) aufgeführt.

Die Testungen zur Bestimmung der inhibitorischen Potentiale sowie der Hemmtypen der in dieser Arbeit synthetisierten Substanzen sollten mit den im Folgenden beschriebenen fluorometrischen Enzym-Assays durchgeführt werden.

Die Assays mit  $\alpha$ -Mannosidase wurden in MES-Puffer (2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer) (40 mM, pH = 5.75), die Assays mit  $\beta$ -Glucosidase in Citratpuffer (20 mM, pH = 5.0) durchgeführt. Zunächst wurden die Assays-Systeme durch Lina Irsheid unter Mithilfe von Bachelor- und Diplomstudentinnen im Arbeitskreis Schirmeister (JGU Mainz) etabliert. Dafür wurden die hochpotenten Inhibitoren Swainsonin (von Sigma Aldrich) für JBM und dGMII sowie Isofagomin (im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert) für die  $\beta$ -Glucosidase verwendet.

#### 3.6.1 Assays an $\alpha$ -Mannosidasen

Für die fluorometrischen Assays wurden die Golgi- $\alpha$ -Mannosidase aus *Drosophila melanogaster* (dGMII) und aus *Canavalia ensiformis* (Jackbohne, JBM) verwendet. Als Substrat diente 4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -*D*-mannopyranosid (4-MU-Man). Die Spaltung dieses Substrats setzt, nach Abbildung 75: Substratkonversion von 4-MU-Man durch  $\alpha$ -Mannosidasen fluoreszierendes 4-Methylumbelliferon frei (Anregung: 355 nm, Emission: 485 nm).

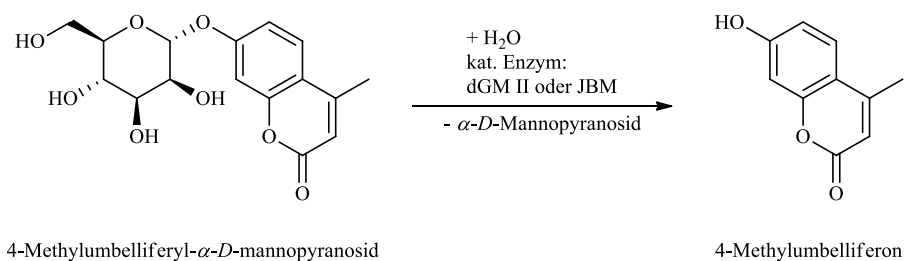


Abbildung 75: Substratkonversion von 4-MU-Man durch  $\alpha$ -Mannosidasen

## Ergebnisse

Der ermittelte  $K_M$ -Wert für die dGMII mit 4-MU-Man als Substrat beträgt  $3.6 \pm 0.3$  mM. Der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert von Swainsonin als Inhibitor der dGMII beträgt  $35 \pm 2.3$  nM.

Der ermittelte  $K_M$ -Wert für die JBM mit 4-MU-Man als Substrat beträgt  $0.4 \pm 0.05$  mM. Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte von Swainsonin als Inhibitor der JBM betragen  $141 - 278$  nM.

### 3.6.2 Assays an $\beta$ -Glucosidase

Für die fluorometrischen Assays wurde die  $\beta$ -Glucosidase aus *Prunus dulcis* (Süßmandel) verwendet. Als Substrat diente 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (4-MU-Glc). Die Spaltung dieses Substrats setzt fluoreszierendes 4-Methylumbelliferon nach Abbildung 76 frei (Anregung: 355 nm, Emission: 485 nm).

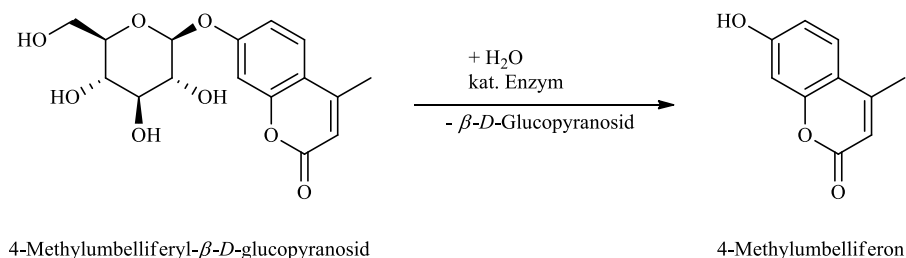


Abbildung 76: Konversion des Substrats 4-MU-Man durch  $\beta$ -Glucosidasen

Der ermittelte  $K_M$ -Wert für die  $\beta$ -Glucosidase aus Süßmandeln mit 4-MU-Glc als Substrat beträgt im Mittel  $2.9 \pm 0.4$  mM. Der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert von Isofagomin als Inhibitor der  $\beta$ -Glucosidase aus Süßmandeln beträgt 110 nM.

Der ermittelte  $K_M$ -Wert für die JBM mit 4-MU-Man als Substrat beträgt  $0.4 \pm 0.05$  mM. Der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert von Swainsonin als Inhibitor der JBM beträgt im Mittel  $174.7 \pm 73.4$  nM.

#### 3.6.2.1 Testungen der synthetisierten Verbindungen

Die Testung der synthetisierten Verbindungen (**pMSP** (vgl. Kapitel 2.2.1), **AS7**, **AS8**, **AS9** und **AS10** (Kapitel 3.1.2, Abbildung 53), alle in Kapitel 3.1.1.3 aufgeführten *N,O*-Acetale sowie 5-*epi*-Isofagomin) erfolgte mit dem im Folgenden beschriebenen Assaysystem:

#### Reaktionspuffer:

MES-Puffer (40 mM) versetzt mit Bovinem Serumalbumin 1.1% (finale Konzentration im MES-Puffer = 0.1 %) und  $ZnSO_4$ -Lösung 1.1 % (finale Konzentration im MES-Puffer = 0.1 %), pH = 5.75

## Ergebnisse

### Enzym:

GMII aus *Drosophila melanogaster*, in MES-Puffer versetzt mit 1.7% Bovinem Serumalbumin (finale Konzentration im MES-Puffer = 0.1 %) und 1.7 % ZnSO<sub>4</sub>-Lösung 1 (finale Konzentration im MES-Puffer = 0.1 %), Konzentration pro Well: 0.002 mg/mL

### Substrat:

4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**4-MU-Man**) wurde in Reaktionspuffer mit einer Konzentration im Well von 1 mM eingesetzt.

### Inhibitor:

**pMSP** (vgl. Kapitel 2.2.1), sowie die in Kapitel 3.1.2 aufgeführten potentiellen allosterischen Inhibitoren **AS7**, **AS8**, **AS9** und **AS10** (Abbildung 53) wurden jeweils mit einer Konzentration im Well von 300  $\mu$ M eingesetzt.

Alle in Kapitel 3.1.1.3 aufgeführten *N,O*-Acetale wurden mit einer Konzentration im Well von 100  $\mu$ M getestet.

5-*epi*-Isogomin wurde bei einer Konzentration im Well von 1 mM getestet.

Alle Verbindungen wurden in DMSO gelöst.

### Pipettierschema:

2.5  $\mu$ L Inhibitor + 10  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym + 27.5  $\mu$ L Puffer

Positiv-Kontrolle: 10  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym + 30  $\mu$ L Puffer

Negativ-Kontrolle: 2.5  $\mu$ L Inhibitor + 10  $\mu$ L Substrat + 37.5  $\mu$ L Puffer

### Experimentelle Durchführung:

Auf einer 96 Well Platte wurden 2.5  $\mu$ L der Inhibitorlösung sowie 37.5  $\mu$ L Puffer (Sechsfachachbestimmung) vorgelegt. Für die Positiv-Kontrolle wurden 30  $\mu$ L Puffer, für die Negativ-Kontrolle 37.5  $\mu$ L Puffer vorgelegt. Dann wurde für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 10  $\mu$ L Enzymlösung mit einer Multikanalpipette zugefügt. Im Anschluss wurde erneut für 5 Minuten inkubiert. Zum Schluss wurden 10  $\mu$ L Substratlösung zugegeben

## **Ergebnisse**

und das Reaktionsvolumen mit einer Multikanalpipette durchmischt Die Platte wurde für 10 Sekunden geschüttelt und anschließend wurde alle 30 Sekunden die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37 °C gemessen. Die Positiv-Kontrolle wurde für jede Inhibitormessung doppelt bestimmt, um die nicht inhibierte Enzymaktivität zu messen.

**Dabei zeigte leider keine der synthetisierten Substanzen eine signifikante Hemmung des Enzyms.**



# 4 Diskussion

## 4.1.1 Zur Etablierung des $\alpha$ -Mannosidaseassays

### 4.1.1.1 Enzymassays mit der dGMII

Der bestimmte  $K_M$ -Wert für dGMII mit 4-MU-Man als Substrat beträgt  $3.6 \pm 0.3$  mM ( $v_{\max} = 8.8 \pm 0.3$  F/s, siehe Kapitel 7.3.1.1). In der Literatur existiert lediglich ein  $K_M$ -Wert in einer persönlichen Kommunikation zwischen *H. Strachnan* und *K. Moremen* (Complex Carbohydrate Research Center and Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Georgia) als Teil der Publikation von *Coleman et al.*<sup>159</sup> mit einem Wert von  $4.9 \pm 2.6$  mM. Damit liegt der hier bestimmte  $K_M$ -Wert innerhalb der Fehlertoleranz des beschriebenen Wertes. Die Affinität des verwendeten Substrats ist somit relativ gering, verglichen mit dem natürlichen Substrat ( $89.6 \mu\text{M}$ )<sup>159,160</sup>. Nichtsdestotrotz ist der Assay sensitiv und benötigt sehr geringe Enzymkonzentrationen. Im Vergleich zu den Affinitäten der verwendeten Substrate im vormals genutzten photometrischen Assay (*p*-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid,  $50\text{--}60 \mu\text{M}$ <sup>159</sup>, siehe Abbildung 61 in Kapitel 3.3.2) und dem von *Coleman et al.*<sup>159</sup> zusätzlich untersuchten Substrat Resorufin- $\alpha$ -D-mannopyranosid (vgl. Abbildung 77) ( $200 \mu\text{M}$ ) liegt die Affinität von 4-MU-Man um Faktor 70 respektive 20 unter den zuvor beschriebenen. Dadurch ist es in der Lage, auch schwache Inhibitoren mit geringer Affinität ( $<200 \mu\text{M}$ ) zu identifizieren, welche wertvolle Leitstrukturen für potentielle neue Inhibitoren darstellen können.

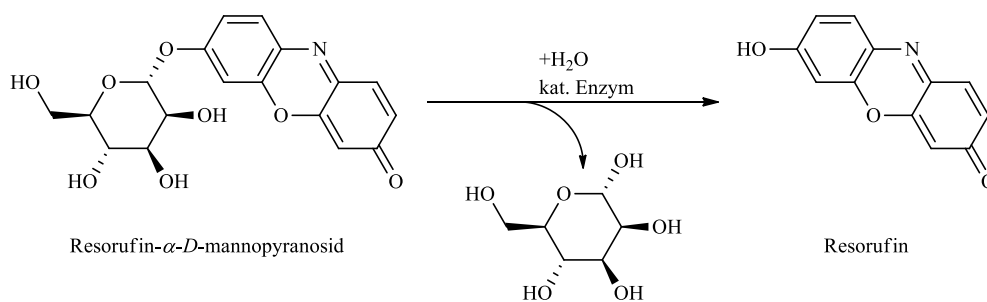


Abbildung 77: Katalytische Spaltung von Resorufin- $\alpha$ -D-mannopyranosid durch  $\alpha$ -Mannosidasen

Die Bestimmung des  $K_M$ -Wertes ist essenziell für den Assayaufbau, da eine Substratkonzentration kleiner oder gleich den  $K_M$ -Wertes zur Bestimmung von inhibitorischer Aktivität, insbesondere für kompetitive Inhibitoren angeraten ist<sup>161</sup>. Dementsprechend wurde die Substratkonzentration für die Enzymassays mit 4-MU-Man auf 1 mM festgelegt.

## Diskussion

Zur Validierung des Assays-Systems wurden der  $IC_{50}$ - und der  $K_i$ -Wert von Swainsonin mit verschiedenen Inkubationszeiten bestimmt. Die  $IC_{50}$ -Werte lagen in allen Fällen zwischen 31-40 nM und somit im Bereich der Literaturwerte (40 nM<sup>59</sup> bzw. 12-20 nM<sup>54</sup> mit *p*-Nitrophenyl- $\alpha$ -*D*-mannopyranosid als Substrat und 100 nM mit Resorufin- $\alpha$ -*D*-mannopyranosid als Substrat). Da alle Literaturwerte ohne Fehlerbereich angegeben sind, ist nicht einzuordnen, ob die gefundenen  $IC_{50}$ -Werte in diesen eingeschlossen sind.

### 4.1.1.2 Enzymassays mit der JBM

Der  $K_M$ -Wert mit 4-MU-Man als Substrat wurde zu  $0.4 \pm 0.05$  mM (siehe Kapitel 0) bestimmt. Im Vergleich zu den  $K_M$ -Werten mit *p*-Nitrophenyl- $\alpha$ -*D*-mannopyranosid (pNP-Man) als Substrat ( $2.5$  mM<sup>162</sup> und  $1.5 \pm 0.08$  mM<sup>134</sup>) hat 4-MU-Man eine geringfügig höhere Affinität zur JBM.

Die hier bestimmten  $IC_{50}$ -Werte von Swainsonin zeigten keine Abhängigkeit von der Konzentration des Substrates. Sie liegen alle zwischen 141 nM und 278 nM. Mit pNP-Man als Substrat werden in der Literatur  $IC_{50}$ -Werte von 40 nM bei einer Inkubationszeit von 20 min (*Fiaux et al.*<sup>59</sup>) und 400 nM bei 5 min Inkubationszeit (*Tulsiani*<sup>96</sup>) berichtet. Im Arbeitskreis Schirmeister wurde er unter den Bedingungen von *Tulsiani* von *Michael Juchum* im Rahmen seiner Diplomarbeit zu  $690 \pm 30$  nM bestimmt<sup>134</sup>.

Durch die relativ gute Übereinstimmung der Werte (unterer nanomolarer Bereich) wurde davon ausgegangen, dass das Assays-System vertrauenswürdige Ergebnisse liefert, und wurde somit für die weiteren Testungen angewandt.

### 4.1.2 Zur Etablierung des Glucosidaseassays

Analog zu den Überlegungen in Kapitel 3.3.2 wurde auch für die  $\beta$ -Glucosidase ein neuer fluorometrische Assay etabliert, welcher den vorherigen photometrischen mit *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -*D*-glucopyranosid (pNP-Glc) als Substrat ersetzt. Der  $K_M$ -Wert für  $\beta$ -Glucosidase aus Süßmandeln mit 4-MU-Glc als Substrat wurde in drei unabhängigen Messungen mit einem Mittelwert von  $2.9 \pm 0.4$  mM und  $v_{max}$  zu  $4.4 \pm 0.2$  F/s bestimmt. Demnach wurde die Konzentration an 4-MU-Glc für die weiteren Testungen auf 1 mM festgesetzt, da bei dieser Konzentration noch eine gute Enzymaktivität gewährleistet ist. Im Vergleich mit dem von *Byers et al.* beschriebenen  $K_M$ -Wert dieses Enzyms mit pNP-Glc von  $2.5$  mM<sup>163</sup> zeigt sich, dass das Fluoreszenz-Substrat eine vergleichbare Affinität aufweist. Dadurch sind die ermittelten

## Diskussion

IC<sub>50</sub>-Werte bzw. der daraus errechnete K<sub>i</sub>-Wert für Isofagomin direkt mit dem Literaturwert vergleichbar. Dieser betrug als Mittelwert aus zwei Messungen  $174.7 \pm 73.4$  nM (siehe Kapitel 7.3.3.2

IC<sub>50</sub> Bestimmung von Isofagomin). Über die *Cheng-Prusoff*-Gleichung (Gleichung 16, siehe Kapitel 3.5.5) errechnet sich der K<sub>i</sub>-Wert aus dem zuvor bestimmten K<sub>M</sub>-Wert und der Substratkonzentration von 1 mM zu 123.3 nM. In der Literatur ist dieser Wert für Isofagomin gegen die  $\beta$ -Glucosidase aus Süßmandeln von *Sierks et al.* zu 110 nM bestimmt worden<sup>78</sup>.

Durch die relativ gute Übereinstimmung der Werte wurde davon ausgegangen, dass das Assays-System vertrauenswürdige Ergebnisse liefert und für weitere Testungen angewandt werden kann.

### 4.1.3 Zur Testung der monocyclischen *N,O*-Acetale

Alle in Kapitel 3.1.1.3.2 aufgeführten Verbindungen (vgl. Tabelle 10 und Tabelle 11) wurden an der dGMII bei einer Konzentration von jeweils 100  $\mu$ M getestet, wobei keine der Verbindungen Inhibition zeigte. In NMR-Stabilitätstests mit der laut Docking potentesten Verbindungen D8, zeigte sich, dass die Verbindung in Wasser nach wenigen Minuten zwar zu einem gewissen Teil degeneriert, aber für eine Enzymhemmung noch in ausreichender Konzentration vorliegen sollte. In NMR-Stabilitätstests in dem für den Assay verwendeten MES-Puffer mit Zinkionen allerdings ist die Verbindung äußerst instabil und reagiert offenbar mit einem Bestandteil des Puffersystems. Dieser Befund ist aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit aller Verbindungen dieser Reihe auf die anderen Verbindungen übertragbar. Welche Reaktionen dabei im Einzelnen ablaufen, konnte nicht bestimmt werden. Es konnte lediglich festgestellt werden, dass die ursprünglichen NMR-Signale der Verbindung schon nach kurzer Zeit (unter einer Minute) teilweise oder ganz verschwunden waren. Es ist davon auszugehen, dass der Grund für die fehlende Inhibition in der Instabilität der Verbindungen im Puffersystem des Assays zu suchen ist. Über die inhibitorische Wirkung der Verbindungen ist somit keine Aussage möglich.

### 4.1.4 Zur Testung der nicht-kovalenten Inhibitoren

Die zur Validierung der neuen fluorometrischen Assays-Systeme synthetisierte Verbindung Isofagomin zeigte die in der Literatur angegebene inhibitorische Wirkung an der  $\beta$ -Glucosidase aus Süßmandeln. Das ebenfalls synthetisierte *5-epi*-Isofagomin zeigte erwartungsgemäß keine

## Diskussion

Inhibition dieses Enzyms. Dies ist, neben den fehlenden Wechselwirkungen der CH<sub>2</sub>-OH-Gruppe an Position 5, auch durch die axiale Stellung dieser Gruppe und dem damit einhergehenden größeren Raumbedarf der Verbindung zu erklären. Die Nachahmung des in Kapitel 1.4.4 beschriebenen Übergangszustands des natürlichen Substrats ist dann nicht mehr möglich.

Die Analoga zur Azamannose **AzMan9** *L*-1-Deoxygulonojirimycin und **AzMan10** *D*-Manno- $\delta$ -lactam wurden nicht getestet, da beide Verbindungen bereits literaturbekannt sind.

Die potentiell allosterischen Verbindungen **AS7** – **AS10** zeigten allesamt keinerlei Inhibition der dGMII. Der Grund für die Synthese dieser Verbindungen waren zuvor vielversprechende Assayergebnisse (70 % Hemmung der dGMII bei 300  $\mu$ M) mit Verbindung **AS8**, welche unter dem Namen ChBr7 zuvor bei ChemBridge<sup>TM</sup> erworben wurde. Da die Verbindung jedoch nicht länger kommerziell erhältlich war und IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt werden sollten, wurde die Verbindung inklusive dreier weiterer Derivate synthetisiert. Keine der Verbindungen zeigte Hemmung der dGMII in weiteren Assays. Aufgrund der Tatsache, dass die Erscheinungsform der kommerziell erworbenen Verbindung ein braunes Öl war und die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte Verbindung **AS8** ein farbloser Feststoff ist, ist davon auszugehen, dass die gelieferte Verbindung ChBr7 verunreinigt oder eine gänzlich andere Verbindung war. Die Reinheit der gekauften Verbindung war nicht angegeben, die der hier synthetisierten Verbindung betrug nach HPLC-MS 99.09 %. Die gefundene Hemmung muss demnach auf Verunreinigungen, einer anderen Verbindung Artefakten in den Assays beruhen. Da die gekaufte Verbindung nicht zuvor analysiert und in den ersten Assays vollständig verbraucht wurde, lassen sich keine weiteren Aussagen zum Ursprung der gefundenen Hemmung machen.

### 5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um neue Inhibitoren für das im *N*-Glycosylierungsweg relevante Enzym Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II zu finden. Dabei wurde unter Zuhilfenahme von computergestützten Methoden Moleküle identifiziert, die unterschiedliche Hemmmechanismen aufweisen sollten. Es wurden potentielle kovalent reversible Verbindungen wie das Molekül **L039** durch De-Novo-Design und molekulares Docking, vereinfachte Varianten davon (**A0** und **C4**), die Spiroverbindung **pMSP**, die monocyclischen *N,O*-Acetale (**HAM** und **HAdG**) und bicyclische Derivate der Azamannose (**AzMan9** und **10**) für das aktive Zentrum sowie nicht-kovalente potentielle Inhibitoren (**AS7-10**) für eine allosterische Bindetasche der GMII identifiziert.

## Zusammenfassung und Ausblick

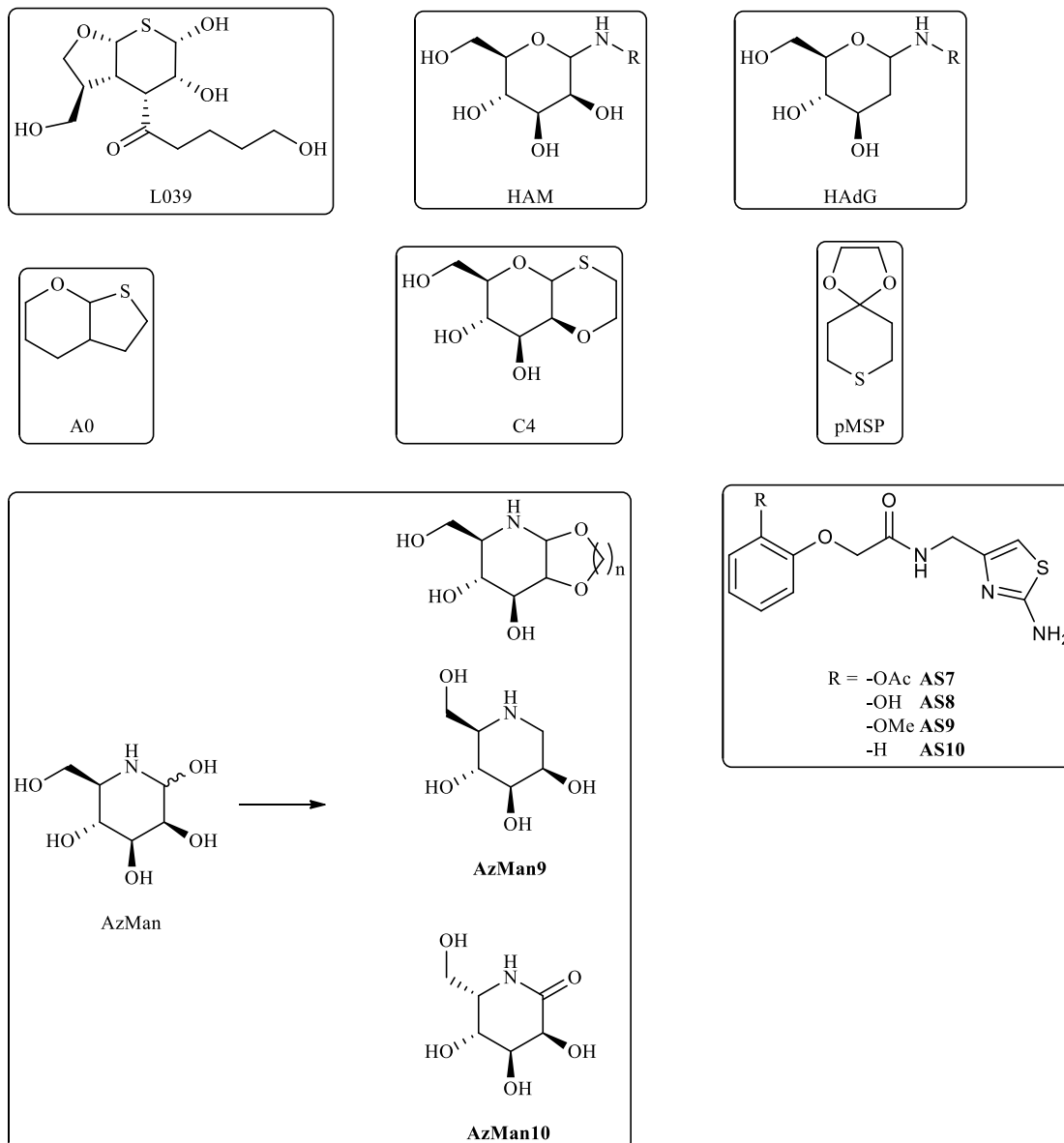


Abbildung 78: Identifizierte Verbindungen/Verbindungsklassen als potentielle Inhibitoren der GMII

Daneben wurden zur Etablierung neuer fluorometrischer Assaysysteme für  $\alpha$ -Mannosidasen und  $\beta$ -Glucosidasen Substrate (**MS** und **GS**) synthetisiert, welche die bis dahin im Arbeitskreis angewandten photometrischen Assays ablösen. Zur Verifizierung des  $\beta$ -Glucosidase-Assays wurde zudem ein bekannter potenter Inhibitor von  $\beta$ -Glucosidasen, das Isofagomin, synthetisiert, welches auch zur weiteren Derivatisierung bestimmt war. Die Validierung des  $\alpha$ -Mannosidase-Assays erfolgte mit Swainsonin.

## Zusammenfassung und Ausblick

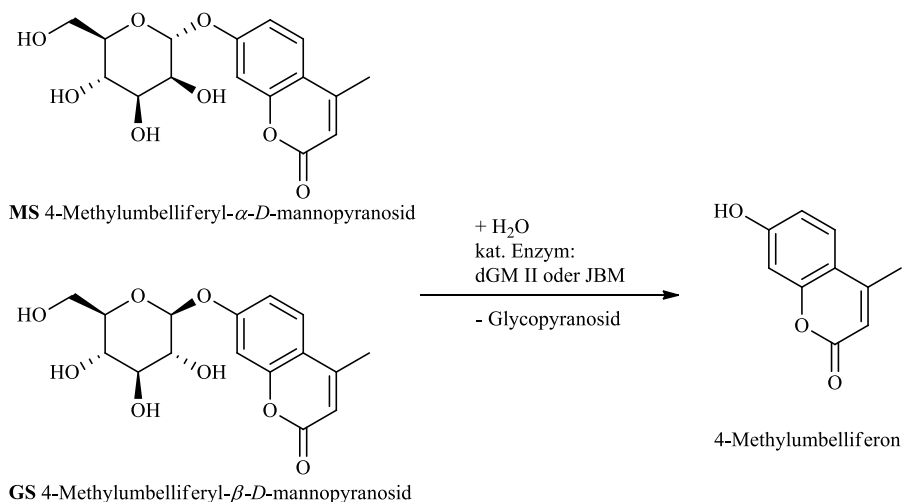


Abbildung 79: Synthetisierte Substrate für die Fluoreszenzassays

Beide Assays-Systeme wurden erfolgreich etabliert.

### Zu den Synthesen:

Zur Synthese von **L039** sollte zunächst die Gangbarkeit der angedachten Syntheseroute durch Synthese der einfachen Verbindung **A0** bestätigt werden. Da die direkte Kondensation von Mercaptoethanol an 3,4-Dihydropyran nicht gelang, wurde versucht, die Verbindung über eine alternative Syntheseroute zu synthetisieren. Dabei sollte der Bizyklus zunächst durch die acetalische C-S-Bindung, gefolgt von einer intramolekularen *Grignard*-Reaktion, gebildet werden. Dies scheiterte an der Dimerisierung bzw. der Bildung von Disulfidbindungen der Thiolkomponente (dargestellt in Abbildung 80).

## Zusammenfassung und Ausblick

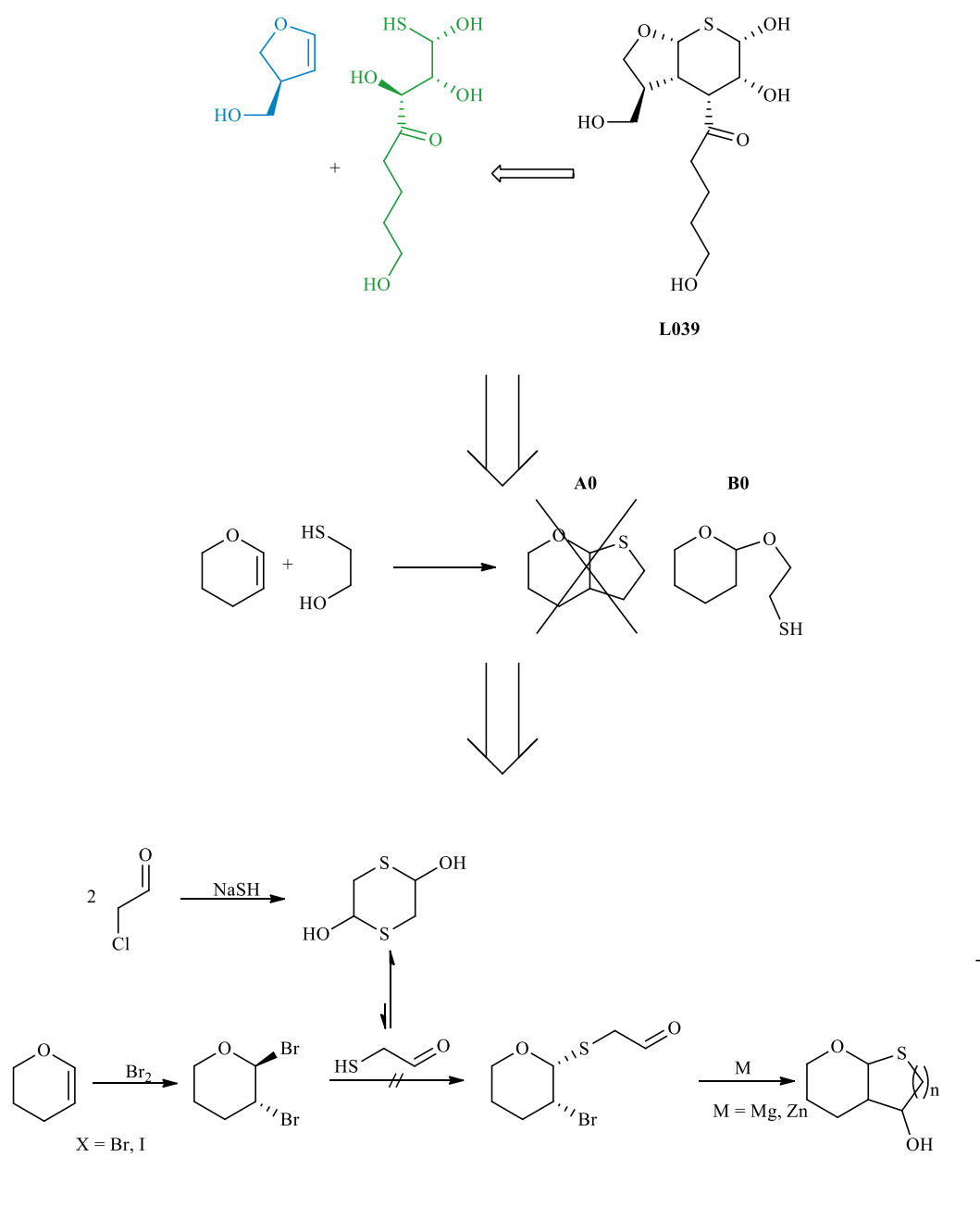


Abbildung 80: Angewandte Strategien zur Synthese des Grundgerüsts von L039

Da die Synthese zu **L039** an der Kondensation der Ringe scheiterte (siehe Reaktion zu **B0** anstatt **A0** in Abbildung 80) wurde der Umweg über das acetalgeschützte Thiol in zwei Varianten versucht, was aber ebenfalls kein Kupplungsprodukt mit 1,2-Dibrompyran lieferte.



## Zusammenfassung und Ausblick

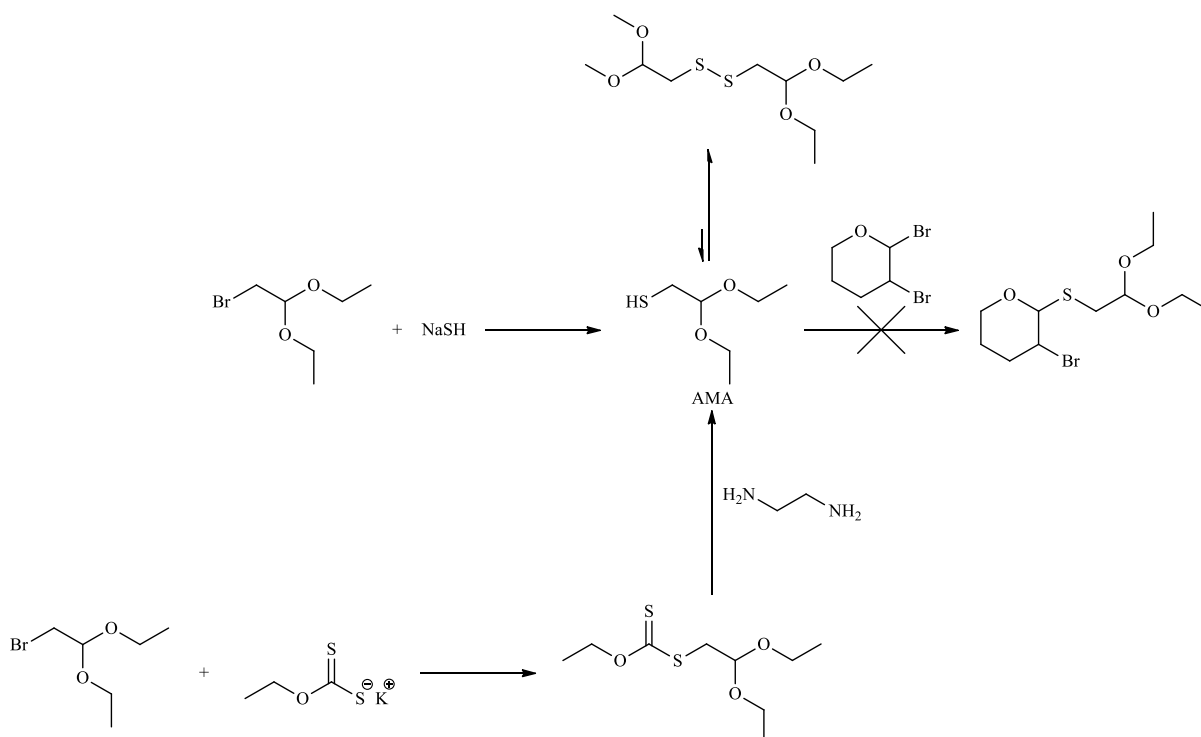


Abbildung 81: Umweg über das acetalgeschützte Thiol, direkt durch Umsetzung mit Natriumhydrogensulfid und über das entsprechende Xanthogenat.

Da bei dieser Reaktionssequenz in allen Fällen Dimere über Disulfidbildung entstanden, welche weder durch Dithiothreitol noch durch Magnesium gespalten und an 1,2-Dibrompyran gekoppelt werden konnten, wurde die Synthese der Verbindung **L039** nicht weiterverfolgt. Hier sind noch nicht alle Synthesemöglichkeiten ausgeschöpft. Durch gute Anpassung der Reaktionsbedingungen ist nicht auszuschließen, dass die *in situ* Spaltung der Disulfidbindungen gelingen kann. Die Methodenentwicklung zur Entschützung der Aldehydfunktion und zum Ringschluss über die *Barbier*-Reaktion stünden dann noch an.

Um das generelle Konzept der reversiblen Ringöffnung von bicyclischen *O,S*-Acetalen zu demonstrieren, wurde versucht, die Verbindung **C4** zu synthetisieren. Dabei konnte der letzte Schritt zum Ringschluss nicht erfolgreich durchgeführt werden. Hier könnte in Zukunft ein Versuch mit einem um ein Kohlenstoffatom verkleinerten Ringsystem zum Erfolg führen, da dadurch eventuell der größere Atomradius des Schwefels ausgeglichen werden könnte (vgl. Abbildung 37), der sich offenbar ungünstig auf den Ringschluss auswirkt. An *O,O*-Acetalen lieferte diese Synthese in der Vergangenheit verlässlich bicyclische Verbindungen<sup>134</sup>.

## Zusammenfassung und Ausblick

Die Synthese eines *O,S*-acetalischen Bicyklus könnte in weiterführenden Untersuchungen die generelle Möglichkeit der kovalent reversiblen Anbindung an Carbonsäuren bestätigen. Hierzu wären insbesondere NMR-Studien geeignet.

Wegen der leichten synthetischen Zugänglichkeit wurde die simple Spiroverbindung **pMSP** synthetisiert, welche zwar keine inhibitorische Wirkung zeigte, aber ebenfalls als Modellsystem zur Überprüfung der reversiblen Ringöffnung durch Carbonsäuren dienen könnte. Zudem sind an diesem System noch vielfältige Derivatisierungsmöglichkeiten gegeben, insbesondere in Hinblick auf Hydroxylgruppen an den Ringen zur Verbesserung der Wechselwirkungen in der aktiven Tasche der dGMII. Hierzu wären weiterführende Dockingstudien angeraten.

Es wurde eine kleine Bibliothek von 25 monocyclischen *N,O*-Acetalen synthetisiert, welche zwar theoretisch kovalent reversibel an ein Aspartat anbinden könnten, jedoch im verwendeten Assays-System instabil waren und dementsprechend keinerlei Inhibition aufzeigten. Hier könnte Anpassung in der Struktur zu erhöhter Stabilität gegen Nucleophile führen. Auch die Synthese von *N,O*-Bicyklen wäre an dieser Stelle denkbar.

Die Synthese von Azamannose scheiterte an der Reduktion des Lactams zum Lactol, da entweder keine Reduktion oder direkte Reduktion zur Methylengruppe stattfand. Auch hier sind noch nicht alle synthetischen Möglichkeiten ausgeschöpft. Die Verwendung anderer als der hier verwendeten Reduktionsmittel sowie eine optimierte Anpassung der Reaktionsbedingungen könnte zum Erfolg führen. Insbesondere die Etablierung anderer orthogonaler Schutzgruppen als die Benzyl-Schutzgruppe für die Hydroxidfunktionen ist wegen der denkbar ungünstigen Atomökonomie sowie der benötigten drastischen Bedingungen zur Entschützung angeraten. Daneben existiert noch eine andere Syntheseroute nach *Hudlicky et al.*<sup>164</sup> über Cyclohexadien-*cis*-diole.

Es wurden vier Derivate einer in vorangegangenen Assays als vielversprechend angesehenen Verbindung als Inhibitor für eine allosterischen Bindetasche der dGMII synthetisiert. Diese Verbindungen zeigten keine inhibitorischen Wirkung. Da die Zusammensetzung der zuvor kommerziell erworbenen Verbindung nicht mehr nachvollziehbar ist, sind weitere Derivatisierungen dieser Strukturen nicht angeraten. Dennoch erscheint die Adressierung der potentiellen allosterischen Bindetasche als vielversprechend, da sie eine bessere Adressierbarkeit (drugability) als die aktive Tasche aufweist. Hierzu sollten zunächst weitere

## **Zusammenfassung und Ausblick**

Dockingstudien auf Grundlagen von schon identifizierten ersten Leitstrukturen (siehe Dissertation Lina Irsheid<sup>121</sup>) erfolgen.

## Experimentalteil

# 6 Experimentalteil

## 6.1 Allgemeine Vorbemerkungen

### 6.1.1 Verwendete Messgeräte

#### Polarimetrie:

Die spezifischen Drehwerte  $[\alpha]_D^T$ : wurden an einem Polarimeter des Typs P 3000 der Firma Krüss ermittelt mit  $T$  = aktuelle Raumtemperatur und  $D$  = Wellenlänge (Natrium-D-Linie:  $\lambda = 589$  nm). Die Konzentrationsangabe ( $c$ ) erfolgt in g/100 ml Lösemittel.

#### Kernresonanzspektroskopie ( $^1\text{H-NMR}$ , $^{13}\text{C-NMR}$ ):

Die NMR-Spektren wurden an Spektrometern des Typs Avance III HD 300, Fourier 300 sowie Avance III HD 600 der Firma Bruker aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  wird in ppm und die Kopplungskonstanten  $J$  in Herz (Hz) angegeben. Als interner Standard dienten die jeweiligen Resonanzsignale der Restprotonen der deuterierten Lösemittel und deren Kohlenstoffatome. Die chemischen Verschiebungen sind wie folgt:

Lösemittel	$\delta$ (ppm) $^1\text{H}$	$\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$
$\text{CDCl}_3$	7.260	77.160
$\text{d}^6\text{-DMSO}$	2.500	39.520
MeOD	4.870	49.000
$\text{d}^6\text{-Aceton}$	2.050	29.840
$\text{d}^3\text{-Acetonitril}$	1.940	1.320
$\text{D}_2\text{O}$	4.790	

Die Multiplizitäten der Signale werden mit folgenden Abkürzungen wiedergegeben:

## Experimentalteil

s = Singulett, s(br) = breites Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett sowie Kombinationen nach dem Schema: dt = Dublett vom Triplett. Die Zuordnung der NMR-Signale erfolgte über DEPT90, DEPT135, 2D-Korrelationspektren (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) sowie in Analogie zu Stammverbindungen.

### Infrarotspektroskopie (IR):

Die Infrarotspektren wurden an einem Avatar 330 FT-IR-Spektrometer der Firma Thermo-Nicolet mittels einer ATR-Einheit aufgenommen. Die Angabe der Bandenlage erfolgt in Wellenzahlen  $\tilde{\nu}$  in der Einheit  $\text{cm}^{-1}$ .

### HPLC-ESI-MS:

Die HPLC-Auftrennung erfolgte auf einer *HP Agilent 1100 Series* HPLC-Anlage mit binärem Pumpensystem, Dioden-Array-Detector und Autosampler.

Daran gekoppelt ist ein *Agilent Technologies, LC/MSD Ion Trap* Massenspektrometer.

Als Trennsäule wurde eine *Agilent® Poroshell 129 EC-C<sub>18</sub>* Säule (150 x 2.10 mm) 4  $\mu\text{m}$  verwendet.

Als Laufmittel dienen MeCN/H<sub>2</sub>O-Gemische (+ 0.1% Ameisensäure (pos. ion mode) bzw. + 150 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH  $\approx$  7.8) (neg. ion mode)).

## 6.1.2 Chromatographische Methoden

### Dünnschichtchromatographie (DC):

Es wurden Fertigfolien aus Aluminium, beschichtet mit 0,20 mm Kieselgel 60 F<sub>254</sub> des Typs ALUGRAM® XTRA SIL G/UV<sub>254</sub> der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Zur Detektion dienten die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, sowie jeweils angegebene Anfärbereagenzien.

### Säulenchromatographie (SC):

Als Säulenfüllmaterial wurde für Schwerkraftsäulen Kieselgel 60 (0,06 - 0,2 mm), für *Flash*-Säulen Kieselgel 60 (0,04 - 0,063 mm) der Firma *ROTH* verwendet. Die Säulen wurden nass befüllt. Die Laufmittelzusammensetzungen sowohl für DC und SC sind jeweils in Volumenprozent angegeben. Je nach Trennproblem wurden Säulen verschiedener Länge und Durchmesser verwendet.

## Experimentalteil

### 6.1.3 Verwendete Chemikalien

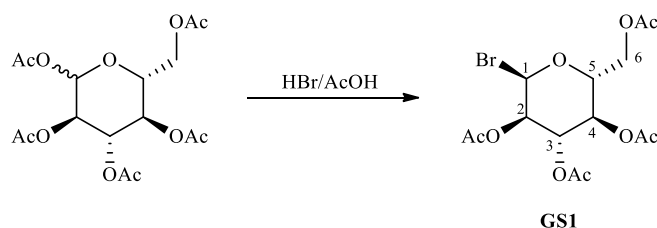
Alle Chemikalien wurden entweder von *Sigma Aldrich*, *Alfa Aesar*, *ABCR*, *TCl*, *Acros* oder *Fischer Scientific* bezogen und, wenn nicht anders vermerkt, ohne vorangehende Prozessierung (Aufreinigung, Trocknung) verwendet.

## 6.2 Substrate

### 6.2.1 GS: 4-Methylumbellifer-7-yl- $\beta$ -D-glucopyranosid

Nach *Rodebaugh et al.*<sup>148</sup>

#### 6.2.1.1 GS1 1-Bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranosid



8 g (20.5 mmol) peracetylierte *D*-Glucose wurden in 40 mL trockenem DCM gelöst und mit 16.2 mL 33% Bromwasserstofflösung in Essigsäure versetzt und bei RT über Nacht gerührt. Die Mischung wurde auf Eis gegossen, die organische Phase abgetrennt und die wässrige zweimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit Wasser und zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und abschließend mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknung mit Magnesiumsulfat wurde die Lösung am Rotationsverdampfer zu einem gelben Öl konzentriert und die reine  $\alpha$ -Form aus einer Mischung aus Diethylether, Diisopropylether und Petrolether bei  $-20^{\circ}\text{C}$  kristallisiert.

**Ausbeute:** 5.50 g (13.4 mol, 65.4 %)

**Habitus:** farblose Kristalle

**R<sub>f</sub>** 0.69 (Petrolether : Ethylacetat [1:1])

(Anfärbereagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäure)

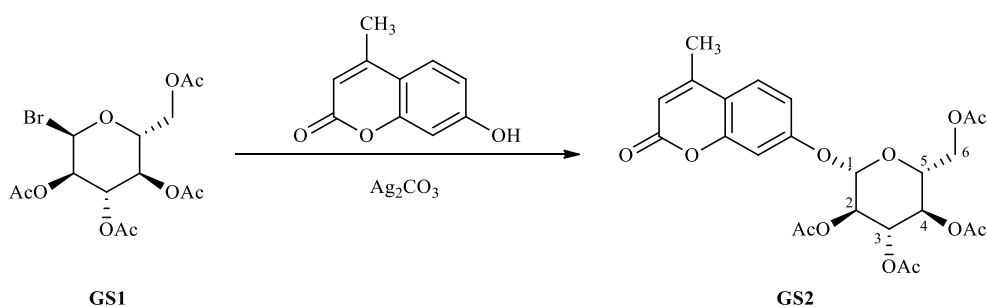
**FT-IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2967, 1736, 1213, 1106, 1030, 907, 886, 661 (Vergl. Lit. Werte)

## Experimentalteil

**<sup>1</sup>H-NMR:** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 6.61 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H 1, *α*-Anomer), 5.56 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H 3), 5.16 (t, *J* = 9.8 Hz, 1H, H 4), 4.83 (dd, *J* = 10.0, 4.0 Hz, 1H, H 2), 4.40 – 4.23 (m, 2H, H 6 und 5), 4.17 – 4.07 (m, 1H, H 6'), 2.10 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>) ppm (Vergl. Lit. Werte<sup>165</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.66/170.00/169.95/169.61 (4x -CO), 86.68 (C1), 72.25 (C5), 70.72 (C2), 70.28 (C3), 67.28 (C4), 61.07 (C6), 20.82/20.80/20.77/20.70 (4x -CH<sub>3</sub>) ppm (Vergl. Lit. Werte<sup>165</sup>).

### 6.2.1.2 GS2 4-Methylumbellifer-7-yl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -*D*-glucopyranosid



2.4 g (5.77 mmol, 3.4 Äq) **GS1** wurden in 20 mL trockenem DCM gelöst. Dazu wurde eine Mischung aus 300 mg 4-Methylumbelliferon (1.70 mmol, 1 Äq.), 800 mg frisch zubereitetes Silbercarbonat [dazu wurden 755 mg (4.45 mmol) Silbernitrat in 4.2 ml Wasser gelöst und zu einer Lösung aus 307 mg (2.90 mmol) Natriumcarbonat in 2.2 ml Wasser gegeben, der grün-gelbe Niederschlag abfiltriert und getrocknet] (2.9 mmol, 1.7 Äq.) sowie ein Tropfen Pyridin in 20 ml Acetonitril gegeben. Diese Suspension wurde unter Lichtausschluss und Argon zwei Tage bei RT gerührt. Dann wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der verbliebene gelbe Schaum in DCM aufgenommen und säulenchromatographisch vorgereinigt (Flashsäule, Cyclohexan : Ethylacetat [1:1]). Das so erhaltene gelbe Öl enthielt immer noch signifikante Mengen an 4-Methylumbelliferon und wurde deshalb in wenig Diethylether gelöst, mit *n*-Pentan versetzt und auf  $-80^\circ\text{C}$  gekühlt. Dabei kristallisiert selektiv das gelbe 4-Methylumbelliferon aus. Nach zwei Tagen war die überstehende Lösung annähernd farblos und

## Experimentalteil

wurde von den Kristallen abgetrennt. Nach Entfernung des Lösemittels wurde das Produkt als gelber Schaum in ausreichender Reinheit zur weiteren Umsetzung erhalten.

**Ausbeute:** 790 mg (1.16 mmol, 91%)

**Habitus:** gelber Schaum

**R<sub>f</sub>:** 0.40 (Petrolether : Ethylacetat [1:1])

(Anfärbereagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäure)

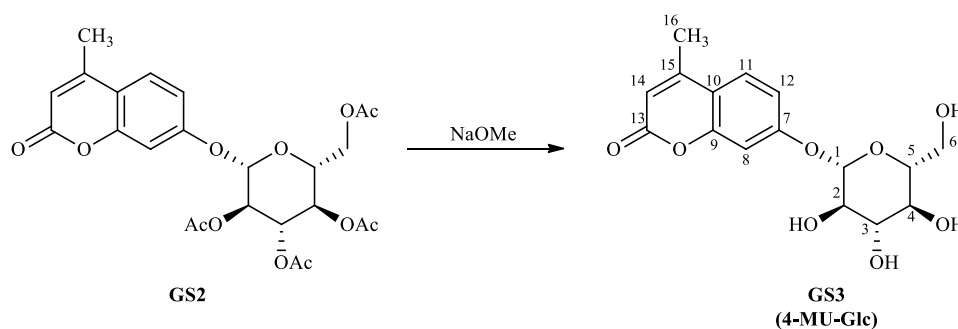
**<sup>1</sup>H-NMR:** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.51 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.00 – 6.86 (m, 2H), 6.19 (s, 1H), 5.31 (dd, *J* = 6.3, 2.9 Hz, 2H), 5.20 – 5.12 (m, 2H), 4.35 – 4.06 (m, 3H), 3.96 – 3.87 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.06 (s, 6H), 2.03 (s, 3H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.64, 170.19, 169.42, 169.27 (4x -CO), 160.81 (C13), 159.19 (C7) 154.83, 152.22, 125.74, 115.53, 114.03, 113.20 (C9, C10, C11, C12, C14, C15), 103.95 (C8), 98.35 (C1), 72.57, 72.42, 70.94, 68.07, 61.82 (C2, C3, C3, C5, C6), 20.71, 20.62, 20.60 (4x -COCH<sub>3</sub>), 18.70 (C16) ppm.



## Experimentaltteil

### 6.2.1.3 GS3 4-Methylumbellifer-7-yl- $\beta$ -D-glucopyranosid (4-MU-Glc)



780 mg (1.54 mmol, 1 Äq) **GS2** wurden in 40 ml trockenem Methanol gelöst und mit 300 mg Natriummethanolat (7.5 mmol, 4.9 Äq bez. auf das Edukt, 1.2 Äq. bezogen auf die Anzahl der Acetylgruppen) über Nacht bei RT gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung mit Amberlite<sup>®</sup> (H<sup>+</sup>-Form) neutralisiert und alle festen Bestandteile abfiltriert. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Flashsäule, Isopropanol : Chloroform [1:1]) aufgereinigt.

**Ausbeute:** 293 mg (0.87 mmol, 56.6 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff

**Rf:** 0.50 (Isopropanol : Chloroform [1:1])

(Anfärbereagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäure)

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 806, 858, 898, 978, 996, 1019, 1038, 1077, 1087, 1138, 1165, 1211, 1263, 1294, 1331, 1371, 1389, 1431, 1512, 1561, 1621, 1689, 1714, 2343, 2360, 2920, 3311, 3404, 3618

**<sup>1</sup>H-NMR:** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O + DMSO-*d*<sub>6</sub> als Standard)  $\delta$  7.62 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, -CH(Ar) 11), 7.02 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, -CH(Ar) 12), 6.96 (s, 1H, -CH(Ar) 8), 6.13 (s, 1H, -CH(Ar) 14), 5.02 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, -CH), 3.77 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub> 6), 3.63 – 3.24 (m, 5H, 4x -CH 2+3+4+5+6 & -CH<sub>2</sub> 6'), 2.32 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> 16) ppm (vgl. Literatur<sup>166</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O + DMSO-*d*<sub>6</sub> als Standard)  $\delta$  163.93 (C7), 161.08 (C13), 156.54 (C9), 155.23 (C15), 128.00 (C11), 115.98 (C10), 115.21

## Experimentalteil

(C12), 112.65 (C14), 104.64 (C8), 100.94 (C1), 77.63 (C5), 76.85 (C3), 74.09 (C2), 70.67 (C4), 61.77 (C6), 19.41 (C16) ppm (vgl. Literatur<sup>166</sup>).

$[\alpha]_{589}^{21}$  : -41.7° (c = 1 in DMSO)

**HPLC-MS** theoretisch 338.10 g/mol, gef. 339.1 g/mol [M+H]

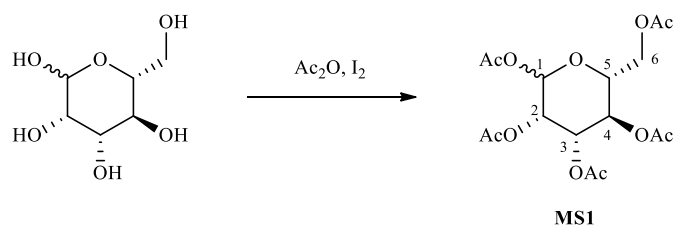
**(ESI)**

Reinheit: 97.64 %

### 6.2.2 MS: 4-Methylumbellifer-7-yl- $\alpha$ -D-mannopyranosid

Die Synthese wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von *Touisni et al.* durchgeführt<sup>149</sup>.

#### 6.2.2.1 MS1 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-mannopyranoside



*D*-Mannose (10.0 g, 55.5 mmol, 1 Äq) wurde in 50 ml Essigsäureanhydrid (587 mmol, 10.6 Äq) dispergiert und unter Kühlung im Eisbad mit 0.5 g Iod (3.9 mmol, 0.07 Äq) versetzt. Nach anfänglicher Wärmeentwicklung wurde das Eisbad nach 10 min entfernt und die tiefviolette Lösung bei RT für weitere 20 min gerührt. Dann wurde wässrige Thiosulfatlösung zugesetzt, bis sich die Reaktionslösung entfärbte. Überschüssiges Essigsäureanhydrid wurde durch vorsichtige Zugabe von Natriumhydrogencarbonat gespalten und die Mischung mit DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wird als 1:3-Mischung von  $\alpha$ - (25 %)- und  $\beta$ -Anomer erhalten.

## Experimentalteil

**Ausbeute:** 21.7 g (55.5 mmol, quantitativ)

**Habitus:** gelbes, hochviskoses Harz

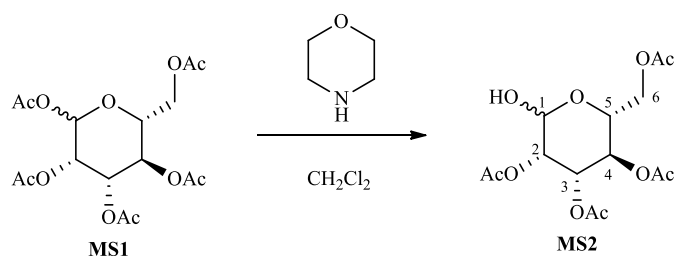
**$^1\text{H-NMR}$ :** ( $\beta$ -Anomer) (300 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  6.08 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H1), 5.38 – 5.30 (m, 2H), 5.25 (t,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 4.30 – 4.23 (m, 1H), 4.13 (dd,  $J = 11.9, 2.3$  Hz, 1H), 4.06 – 3.98 (m, 1H), 2.18 – 1.97 (m, 15H, 5x - $\text{CH}_3$ ) ppm.

( $\alpha$ -Anomer) (300 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  5.85 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H, H1), 5.48 (dd,  $J = 3.2, 1.0$  Hz, 1H), 5.31 – 5.27 (m, 1H), 5.12 (dd,  $J = 10.0, 3.3$  Hz, 1H), 4.34 – 4.30 (m, 1H), 4.07 (s, 1H), 3.80 (ddd,  $J = 9.8, 5.3, 2.3$  Hz, 1H), 2.22 – 1.98 (m, 15H, 5x - $\text{CH}_3$ ) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** ( $\beta$ -Anomer) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (5 x CO:170.65, 170.00, 169.75, 169.53, 168.07), 90.59, 70.60, 68.72, 68.32, 65.51, 62.09 ( $\text{CH}_2$ ), (5 x - $\text{CH}_3$ :20.87, 20.78, 20.73, 20.67, 20.65) ppm.

( $\alpha$ -Anomer) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (5 x CO:170.66, 170.21, 169.80, 169.58, 168.38), 90.41, 77.24, 73.29, 70.64, 68.17, 65.37 ( $\text{CH}_2$ ), (5 x - $\text{CH}_3$ : 20.76, 20.73, 20.68, 20.65, 20.55) ppm.

### 6.2.2.2 MS2 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-mannopyranoside



9.8 g **MS1** (26.1 mmol, 1 Äq.) wurden in 160 mL trockenem DCM gelöst. Nach Zugabe von 8.7 g Morpholin (100 mmol, 4 Äq.) wurde die Reaktionsmischung unter Argon über Nacht bei RT gerührt. Dann wurde die Lösung zweimal mit 1 M Salzsäure sowie dreimal mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel am

## Experimentaltteil

Rotationsverdampfer entfernt. Das so erhaltene Anomerengemisch nicht näher bestimmter Zusammensetzung wurde ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

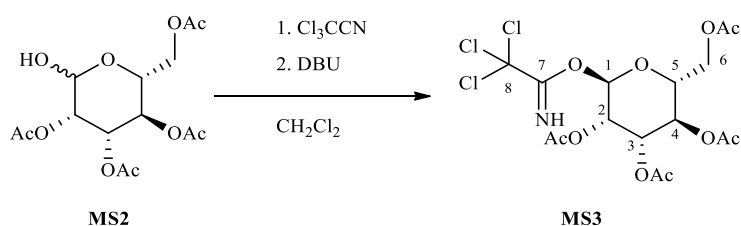
**Ausbeute:** 8.0 g (23.0 mmol, 92 %)

**Habitus:** gelbes, hochvisköses Öl

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-*d*) (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 5.42 (dd, *J* = 10.0, 3.2 Hz, 1H), 5.35 – 5.21 (m, 4H), 4.32 – 4.17 (m, 2H), 4.20 – 4.09 (m, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.00 (s, 3H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (Hauptkomponente, 75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ δ 170.80, 170.17, 169.99, 169.79 (4 x -CO), 92.24, 69.93, 68.70, 68.56, 66.14, 62.55, (4 x -CH<sub>3</sub>: 20.93, 20.80, 20.74, 20.72) ppm.

### 6.2.2.3 MS3 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*D*-mannopyranosyltrichloroacetimidat



13.6 g (39 mmol, 1 Äq.) **MS2** wurden in 150 ml trockenem DCM gelöst und unter Kühlung bei 0°C mit 14 g (10 mL, 100 mmol, 2.5 Äq.) Trichloracetimidat in kleinen Portionen versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei dieser Temperatur und über Nacht bei RT gerührt. Dann wurde ein geringer Überschuss an Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) (6.3 g, 6.4 ml, 41 mmol, 1.05 Äq.) zugesetzt und weitere 30 min bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung unter vermindertem Druck eingeeengt und säulenchromatographisch (Flashsäule, Cyclohexan : Ethylacetat [2:1]) aufgereinigt. Es wurde ausschließlich das  $\alpha$ -Anomer erhalten.

**Ausbeute:** 10.7 g (21.8 mmol, 56 %)

**Habitus:** blassgrauer Feststoff

## Experimentalteil

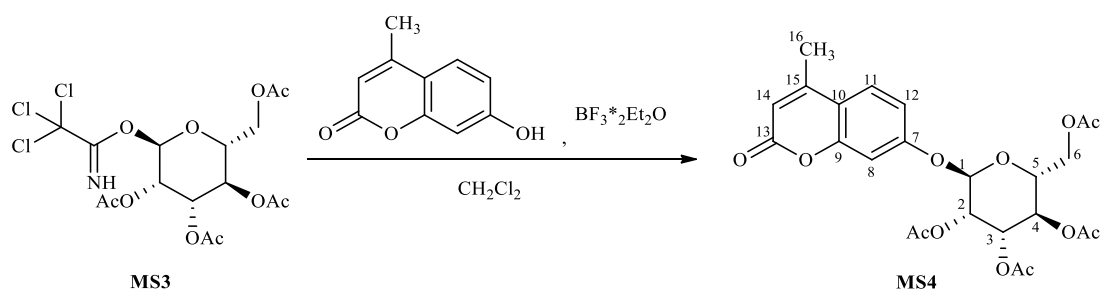
**R<sub>f</sub>** : 0.59 ( Cyclohexan: Ethylacetat [1:1])

(Anfärbereagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäure)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.79 (s, 1H), 6.27 (s, 1H), 5.50 – 5.32 (m, 3H), 4.33 – 4.10 (m, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.01 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.69, 169.92, 169.84, 169.734 (4x -COCH<sub>3</sub>), 159.85 (C7), 94.61 (C1), 90.60 (C8), 71.30, 68.90, 67.96, 65.47 (C2, C3, C4, C5), 62.15 (C6), 20.92, 20.82, 20.75 (4 x CH<sub>3</sub>) ppm (Vergl. Lit<sup>167</sup>).

### 6.2.2.4 MS4 4-Methylumbellifer-7-yl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -*D*-mannopyranoside



10.7 g MS3 (21.8 mmol, 1 Äq.) wurden in 50 ml trockenem DCM gelöst und nach Zugabe von 7.4 g (42 mmol, 2 Äq.) 7-Hydroxy-4-methylcoumarin und 0.67 g (0.6 ml, 4.7 mmol, 0.2 Äq.) Bortrifluorid-Dietherat 3 h bei RT gerührt, bis der größte Teil des Edukts (DC-Kontrolle) abreagiert hatte. Überschüssiges 7-Hydroxy-4-methylcoumarin wurde abfiltriert, das Filtrat mit Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Flashsäule, Elutionsmittelgradient Cyclohexan : Ethylacetat [3:1] → [1:1] → [0:1]) aufgereinigt.

**Ausbeute:** 9.8 g (19.4 mmol, 89 %)

**Habitus:** blassgelber Feststoff

**R<sub>f</sub>** : 0.45 ( Cyclohexan: Ethylacetat [3:1])

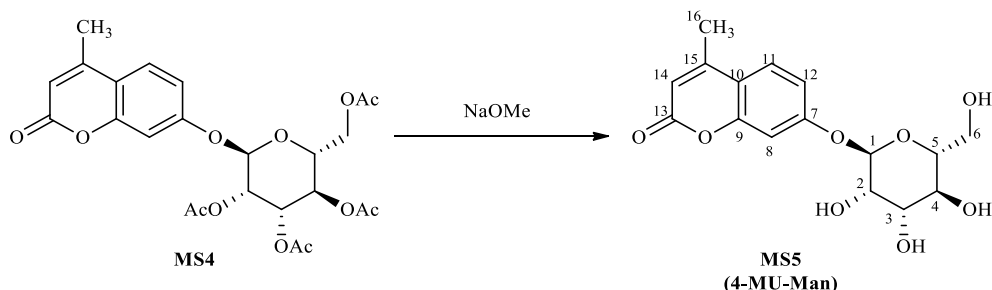
## Experimentaltteil

(Anfärbereagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäure)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  7.54 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H11), 7.12 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, H8), 7.03 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H, H12), 6.20 (s, 1H, H14), [5.58 (s, 1H), 5.57 – 5.52 (m, 1H), 5.48 – 5.46 (m, 1H), 5.41 – 5.33 (m, 1H) H1, H2, H3, H4], 4.29 (dd,  $J = 12.4, 5.8$  Hz, 1H, H6), 4.10 – 4.00 (m, 2H, H5, H6'), 2.42 (s, 3H, 3 x H16), 2.22 (s, 3H, -OAc), 2.05 (s, 9H, 3 x -OAc). ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  125.79 (C11), 113.44, 113.28 (C14, C12), 104.35 (C8), 95.89 (C1), 69.54, 69.05, 68.66, 65.73 (C1, C3, C4, C5), 62.02 (C6), 20.89, 20.70, 20.68, 20.67 (4 x -COCH<sub>3</sub>), 18.71 (C16) (vgl. Lit.<sup>168</sup>). Die Kohlenstoffe C7, C9, C13, C15 sowie die vier Carbonylkohlenstoffe der Acetalgruppen werden von der Messmethode nicht erfasst.

### 6.2.2.5 MS5 4-Methylumbellifer-7-yl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (4-MU-Man)



8.8 g (17.4 mmol, 1 Äq.) **MS4** sowie 1.8 g Natriummethanolat (33.3 mmol, 1.9 Äq.) wurden bei RT für 1 h gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung mit Amberlite<sup>®</sup> (H<sup>+</sup>-Form) neutralisiert und filtriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Flashsäule, Isopropanol : Chloroform [1:1]) aufgereinigt.

**Ausbeute:** 4.5 g (13.3 mmol, 76 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff

**R<sub>f</sub>:** 0.55 (Isopropanol : Chloroform [1:1])

## Experimentalteil

(Anfärbereagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäure)

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 668, 703, 795, 819, 833, 848, 880, 962, 996, 1036, 1068, 1102, 1116, 1144, 1160, 1190, 1273, 1343, 1361, 1388, 1425, 1508, 1562, 1613, 1676, 1696, 2342, 2359, 2896, 3356, 3502, 3568

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.65 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, -CH(Ar) 11), 7.14 – 6.97 (m, 2H, 2x -CH(Ar) H8, H12), 6.20 (s, 1H, -CH(Ar) H14), 5.53 (s, 1H, -CH H1), 3.87 (s, 1H), 3.70 (dd, *J* = 9.1, 3.0 Hz, 1H), 3.60 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 3.58 – 3.46 (m, 1H), 3.46 (dd, *J* = 10.6, 4.7 Hz, 1H), 3.40 – 3.30 (m, 1H), 2.36 (s, 3H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  160.13 (C13), 159.14 (C7), 154.36 (C9), 153.31 (C15), 126.44 (C11), 114.15 (C10), 113.71 (C12), 111.76 (C14), 103.66 (C8), 98.83 (C1), 75.39 (C5), 70.64 (C3), 69.87 (C2), 66.66 (C4), 61.04 (C6), 18.18 (C16) ppm.

**[ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>21</sup>:** 139.8 (c = 1 in DMSO)

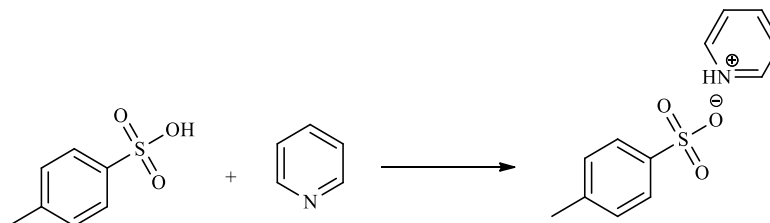
**HPLC-MS** theoretisch 338.10 g/mol, gef. 339.1 g/mol [M+H]

**(ESI)** Reinheit: 96.08 %

## Experimentaltteil

### 6.3 Bicyclische Acetale

#### 6.3.1 Pyridinium *p*-Toluensulfonat (PPTS)<sup>169</sup>



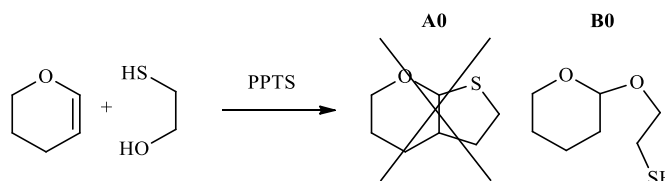
Zu 23 g Pyridin (0.29 mol, 1.1 Äq) wurden 50 g *p*-Toluensulfonsäure Monohydrat (0.26 mol, 1 Äq) in 500 ml Toluol gegeben und diese Lösung für zwei Stunden refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur fiel das Produkt als weißer Feststoff aus (51 g, 0.20 mol). Eine weitere Fraktion des Produkts war durch Kristallisation aus der Mutterlauge über Nacht (9 g, 0.035 mol) zugänglich.

**Ausbeute:** 60 g (0.24 mol, 92 %)

**Habitus:** weißer Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR:** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.07 - 8.87 (m, 1H), 8.72 - 8.48 (m, 1H), 8.18 - 8.00 (m, 1H), 7.67 - 7.48 (m, 1H), 7.13 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 2.26 (s, 1H) ppm. (Identisch mit einer authentischen Probe von TCI-Chemicals).

#### 6.3.2 Testsystem A0 bzw. B0



15 mmol 3,4-Dihydro-2*H*-pyran (1.26 g bzw. 1.37 ml, 1.5 Äq) wurden zu einer Lösung aus 10 mmol 3-Mercapto-1-ethanol (0.92 g bzw. 0.86 ml, 1 Äq) in 100 ml Dichlormethan sowie 1 mmol (0.25 g) frisch hergestelltes PPTS 8 h bei RT gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung mit halbgesättigter Kochsalzlösung gewaschen, um den Katalysator zu entfernen. Das Dichlormethan wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Petrolether5 : Ethylacetat1). Es zeigt sich, dass nicht das



## Experimentalteil

bicyclische *O,S*-Acetal **A0** sondern das monocyclische *O,O*-Acetal **B0** entstanden war (siehe Kapitel 3.1.1.1.3: Synthese von L039).

**Ausbeute:** 1.08 g (6.7 mmol, 67 %)

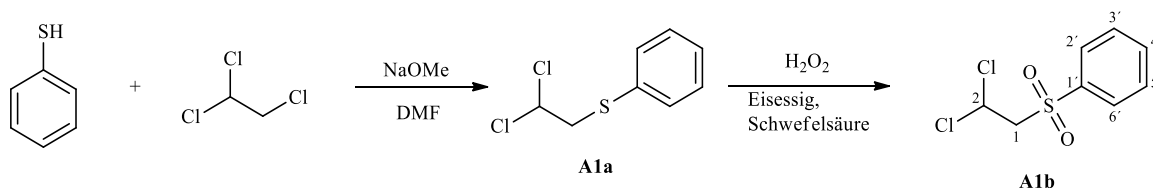
**Habitus:** klares, farbloses Öl

**R<sub>f</sub> :** 0.82 (Petrolether : Ethylacetat [3:1])

**<sup>1</sup>H-NMR:** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.60 (t, *J* = 3.4 Hz, 1H), 3.83 - 3.37 (m, 3H), 2.71 - 2.57 (m, 3H), 2.28 (s, 1H), 1.81 - 1.35 (m, 6H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 97.62 (CH<sub>acetal</sub>), 68.42 (CH<sub>2</sub>), 61.04 (CH<sub>2</sub>), 29.90 (CH<sub>2</sub>), 24.74 (CH<sub>2</sub>), 23.44 (CH<sub>2</sub>), 18.79 (CH<sub>2</sub>) ppm.

### 6.3.3 A1 (*E*)-((2-Chlorovinyl)sulfonyl)benzen<sup>124</sup>



#### A1a 2,2-Dichlorophenylsulfan

Zu einer Suspension aus 4.80 g (88.8 mmol, 1.03 Äq) Natriummethanolat in 40 mL DMF wurden unter Kühlung bei 15 °C 9.45 g Thiophenol (8.8 mL, 86.2 mmol, 1 Äq) zugesetzt und 15 min bei dieser Temperatur gerührt. Dann wurden 34.6 g (24 mL, 259 mmol, 3 Äq) 1,1,2-Trichlorethan portionsweise zugesetzt und die Reaktionsmischung auf 60 °C erwärmt und 3.5 h bei dieser Temperatur gerührt, dann auf RT abgekühlt, in 140 mL Eiswasser gegossen und zwischen Wasser und 140 mL Petrolether verteilt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase drei Mal mit Petrolether extrahiert. Die vereinten organischen Extrakte wurden zweimal mit 5%iger, wässriger Natriumhydroxidlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so gewonnen Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung zu A1b) umgesetzt.

## Experimentalteil

- Ausbeute:** 16.4 g (79.6 mmol, 89.6 %)
- Habitus:** blassgelbes Öl
- <sup>1</sup>H-NMR:** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.53 - 7.22 (m, 5H, Arom.), 5.63 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, Cl<sub>2</sub>CH-), 3.58 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, -SCH<sub>2</sub>-) ppm.

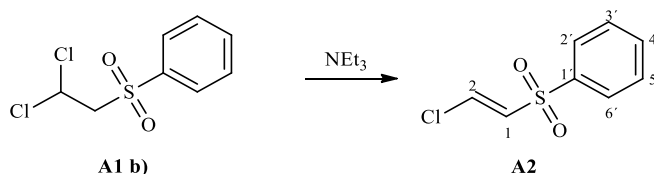
### 6.3.4 A1b ((2.2-Dichloroethyl)sulfonyl)benzen:

Das Rohprodukt aus **A1a** (6 g, 56.3 mmol, 1 Äq) wurde in 90 ml Eisessig mit 1.3 mL konz. Schwefelsäure versetzt und 5 min. gerührt. Dann wurden 13 ml 30%ige wässrige Wasserstoffperoxidlösung ohne Kühlung über einen Zeitraum von 20 min. über einen Rückflusskühler zugesetzt, ohne dass die Lösung zu sieden begann. Weitere 13 mL Wasserstoffperoxidlösung wurden dann in fünf Portionen so zugesetzt, dass das nun einsetzende Sieden jeweils wieder abklang. Nach beendeter Zugabe wurde die Lösung weitere 30 min gerührt, bevor sie in 500 mL kaltes Wasser eingegossen wurde. Dabei fiel das Produkt als weißer Feststoff aus. Es wurde abfiltriert, sorgfältig mit Wasser gewaschen, im Hochvakuum getrocknet und ohne Aufreinigung weiter umgesetzt.

- Ausbeute:** 13.4 g (56.3 mmol, 70.7 %)
- Habitus:** farbloser Feststoff
- <sup>1</sup>H-NMR:** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.98 - 7.91 (m, 2H, H2'&H6'), 7.75 - 7.67 (m, 1H, H-4'), 7.65 - 7.55 (m, 2H, H-3'&5'), 6.09 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, H2), 3.97 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H1) ppm.

## Experimentalteil

### 6.3.5 A2 (*E*)-(2-Chlorovinyl)sulfonylbenzen



13.4 g Sulfon aus **A2** (56.3 mmol, 1 Äq) wurden in einer Mischung aus 180 ml trockenem Diethylether und 18 ml trockenem Dichlormethan gelöst, auf 15 °C abgekühlt und über einen Zeitraum von 20 min unter Kühlung mit 9.3 mL Triethylamin (6.79 g, 61.1 mmol, 1.2 Äq) versetzt. Dann wurden weitere 30 min gerührt, bevor die Reaktionslösung dann mit 150 mL 0.5 M wässriger Schwefelsäure gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet wurde. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das so entstandene Rohprodukt wurde dreimal aus Petrolether umkristallisiert.

**Ausbeute:** 11.01 g (54.3 mmol, 91.5 %)

**Habitus:** weiße bis blassgelbe Kristalle

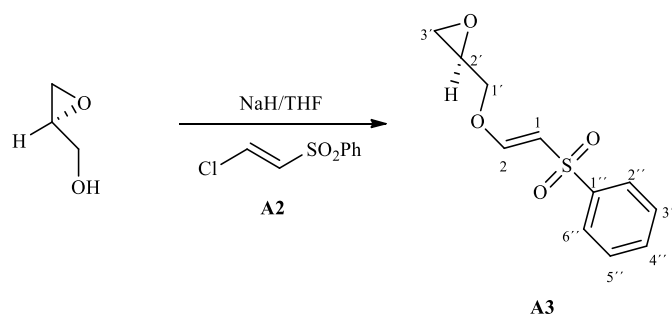
**R<sub>f</sub> :** 0.82 (Petrolether : Ethylacetat [3:1])

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.95 - 7.85 (m, 2H, H2' + H6'), 7.72 - 7.64 (m, 1H, H4'), 7.62 - 7.54 (m, 2H, H3' + H5'), 7.46 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, H2), 6.75 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, H1) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 139.50 (C1'), 136.22 (C3'), 134.03 (C2), 133.81 (C1), 129.56 (C3' + C5'), 127.79 (C1' + C6') ppm.

## Experimentalteil

### 6.3.6 A3 (*R,E*)-2-(((2-(Phenylsulfonyl)vinyl)oxy)methyl)oxiran<sup>170</sup>



Zu 650 mg Natriumhydrid (in Form von 1.08 g 60%ige Dispersion in Mineralöl, 16.3 mmol, 1.3 Äq) in 8 mL trockenem THF wurden im Aceton-Stickstoffbad bei  $-25^{\circ}\text{C}$  unter Schutzgas eine Lösung aus 0.82 ml (*S*)-Glycidol (917 mg, 12.4 mmol, 1 Äq) in 8 mL trockenem THF zugegeben. Diese Mischung wurde 30 min bei dieser Temperatur gerührt, bis eine Lösung aus 3.0 g A2 in 15 mL trockenem THF langsam zugetropft wurde, was eine deutliche Blasenentwicklung zur Folge hatte. Nach beendeter Zugabe wurde so lange bei  $-25^{\circ}\text{C}$  weiter gerührt, bis die Blasenentwicklung beendet war (20 min). Dann wurde die Reaktionsmischung auf  $0^{\circ}\text{C}$  aufgewärmt und die Reaktion durch Zugabe von 15 mL gesättigter, wässriger Ammoniumchloridlösung gequencht. Das so erhaltene Reaktionsgemisch wurde dreimal mit Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Magnesiumsulfat getrocknet und der Ether unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Flashsäule, Elutionsmittel: Petrolether : Ethylacetat [4:1]).

**Ausbeute:** 1.67 g (6.95 mmol, 56 %)

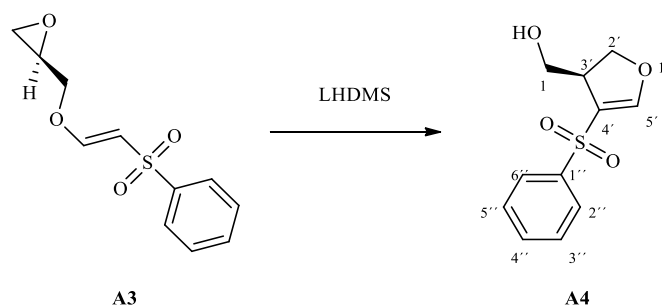
**Habitus:** schwach gelbes Öl

**R<sub>f</sub> :** 0.42 (Petrolether : Ethylacetat [1:1])

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  7.91 - 7.84 (m, 2H, H-2&6), 7.62 - 7.47 (m, 4H, H-3',4',5',2), 5.77 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, H1), 4.17 (dd,  $J = 11.6, 2.6$  Hz, 1H, H1'a), 3.75 (dd,  $J = 11.6, 6.1$  Hz, 1H, H1'b), 3.27 - 3.20 (m, 1H, H3'a), 2.89 - 2.84 (m, 1H, H3'b), 2.65 (dd,  $J = 4.8, 2.6$  Hz, 1H, H2') ppm.

## Experimentaltteil

### 6.3.7 A4 (3S)-4-Phenylsulfonyl-2,3-dihydrofuran-3-methanol<sup>170</sup>



Zu einer Lösung von **A4** (1.4 g, 5.8 mmol, 1 Äq) in 33 mL THF wurden bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  7 mL LHDMS (1.3 M Lösung in Hexan, 9.1 mmol, 1.6 Äq) zugegeben und dann unter Rühren langsam auf  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 35 mL gesättigter, wässriger Ammoniumsulfatlösung gequencht, dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Magnesium getrocknet. Nach Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Flashsäule, Elutionsmittel: Petrolether : Ethylacetat [1:1]).

**Ausbeute:** 810 mg (3.37 mmol, 58 %)

**Habitus:** gelbes Öl

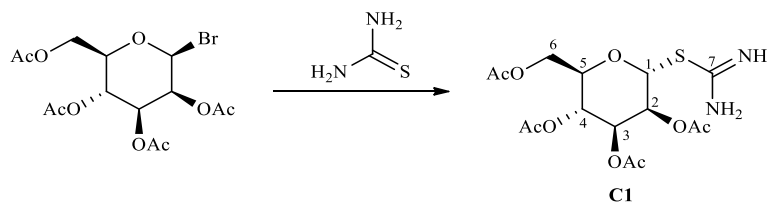
**R<sub>f</sub>:** 0.34 (Petrolether : Ethylacetat [1:1])

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  7.95 - 7.88 (m, 2H, H-2''&6''), 7.68 - 7.51 (m, 3H, H-3'',4'',5''), 7.34 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H, H-5'), 4.66 (dd,  $J = 10.7, 9.6$  Hz, 1H, H-5'a), 4.48 (dd,  $J = 9.6, 7.3$  Hz, 1H, H-5'b), 3.77 (dd,  $J = 11.7, 4.2$  Hz, 1H, H-1a), 3.68 (dd,  $J = 11.7, 5.1$  Hz, 1H, H-1b), 3.21 - 3.10 (m, 1H, H-3')

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  159.66(C-5'), 140.65(C-1'), 133.54(C-4''), 129.52(C-3''&5''), 127.42(C-2''&6''), 118.33(C-4'), 77.39(C-2'), 63.32(C-1), 44.29(C-3')

## Experimentalteil

### 6.3.8 C1 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-thiopseudoharnstoff



32 g Peracetyliertes Mannosebromid (78 mmol, 1 Äq.) wurden mit 6 g Thiourea (79 mmol, 1.01 Äq.) und 300 mg (0.8 mmol, 0.01 Äq.) Tetrabutylammoniumiodid in 150 ml Acetonitril für 6 h unter Rückfluss gekocht. Die Reaktionsmischung wurde abgekühlt und über Celite abgesaugt. Die festen Rückstände wurden mit Aceton gewaschen und alle organischen Phasen am Rotationsverdampfer eingengt und anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (Flashsäule Ethylacetat : Methanol : Triethylamin [10 : 1 : 0.1 %]. Dabei wurden diverse Fraktionen einer Mischung aus mindestens vier Substanzen gewonnen. Aus dreien davon kristallisierte über Nacht das Produkt aus.

**Ausbeute:** 3.5 g (8.9 mmol, 11 %)

**Habitus:** farblose, nadelförmige Kristalle

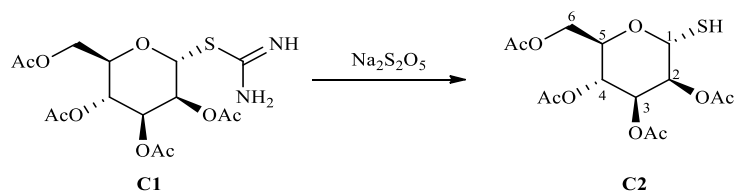
**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.36 (s, 3H,  $-\underline{\text{NH}}/\underline{\text{NH}}_2$ ), 6.33 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, H1), 5.36 (dd,  $J = 3.3, 1.3$  Hz, 1H, H2), 5.18 (t\*,  $J = 9.9$  Hz, 1H, H4), 5.06 (dd,  $J = 10.0, 3.4$  Hz, 1H, H3), 4.37 – 4.28 (m, 1H, H5), 4.23 (dd,  $J = 12.4, 5.2$  Hz, 1H, H6), 4.09 (dd,  $J = 12.3, 2.0$  Hz, 1H, H6'), [2.15 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.96 (s, 3H) 4x MeAc] ppm.

\* bei diesem Multipllett handelt es sich um ein Spinsystem höherer Ordnung, bei dem nicht alle Kopplungen aufgelöst werden konnten.

**$^{13}\text{C-NMR}$ :**  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  [169.99, 169.66, 169.41, 169.30 (4 x MeOOC-)], 164.80 (C7), 81.36 (C1), 70.68 (C5), 68.71 (C2), 68.47 (C3), 64.98 (C4), 61.36, [20.55, 20.51, 20.46, 20.39 (4 x  $\text{H}_3\text{C-Ac}$ )] ppm.

## Experimentalteil

### 6.3.9 C2 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio- $\alpha$ -D-mannopyranose



3.3 g **C1** (8 mmol, 1 Äq.) wurden in einer Mischung aus 43 mL Wasser und 13 ml DCM sowie 4.3 g Natriumpyrosulfit (23 mmol, 3 Äq.) eine Stunde refluxiert. Dann wurde die organische Phase abgetrennt und mit gesättigter Natriumchloridlösung sowie mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der blass-gelbe Rückstand ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

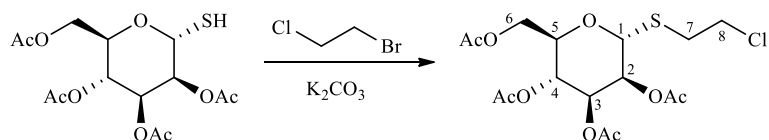
**Ausbeute:** 2.96 g (8 mmol, quant.)

**Habitus:** blassgelbes Harz

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  5.55 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 5.37 – 5.25 (m, 3H), 4.41 – 4.24 (m, 2H), 4.11 (dd,  $J = 12.0, 1.6$  Hz, 1H, H6'), 2.27 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H, -SH), 2.17 – 2.12 (m, 3H), 2.11 – 2.07 (m, 3H), 2.06 – 2.02 (m, 3H), 2.01 – 1.97 (m, 3H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [170.74, 170.01, 169.96, 169.74 (4 x MeOOC-)], 77.10 (C1), 71.99 (C3), 69.78 (C5), [68.64, 66.22 (C2, C4)], 62.28 (C6), [20.99, 20.85, 20.80, 20.72 (4 x H<sub>3</sub>C-Ac)] ppm.

### 6.3.10 C3 2-Chlorethyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- $\alpha$ -D-mannopyranose



In Anlehnung an eine Vorschrift von Kruger et al.<sup>171</sup> wurden 2.96 g **C2** (8 mmol, 1 Äq.) in 16 mL Aceton mit 4,6 g (2.7 ml, 24 mmol, 4 Äq.) 1-Bromo-2-Chlorethan sowie mit 1.3 g

## Experimentalteil

Kaliumcarbonat (9.6 mmol, 1.2 Äq.) in 12 mL Wasser versetzt und 1 h bei RT gerührt. Dann wurde mit Wasser und Ethylacetat aufgegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige nochmals mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Flashsäule, Cyclohexan : Ethylacetat [6:1])

**Ausbeute:** 2.2 g (5.2 mmol, 65 %)

**Habitus:** weißes Pulver

**R<sub>f</sub> :** 0.81 (Cyclohexan : Ethylacetat [1:1])

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-d) δ 5.33 (dd, J = 2.9, 1.5 Hz, 1H; H2), 5.30 (d, J = 1.5 Hz 1H, H1), 5.28 – 5.17 (m, 2H, H3, H4), 4.38 (ddd, J = 8.7, 6.3, 1.9 Hz, 1H, H5), 4.28 (dd, J = 12.1, 6.2 Hz, 1H, H6), 4.11 (dd, J = 12.1, 2.1 Hz, 1H, H6'), 3.80 – 3.58 (m, 2H, 2x H8), 3.10 – 2.88 (m, 2H, 2 x H7), [2.16 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.98 (s, 3H) (4 x H<sub>3</sub>C-Ac)] ppm.

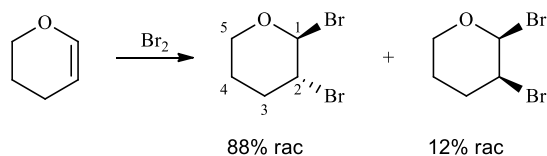
**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [170.64, 170.01, 169.86, 169.82 (4 x MeOOC-)], 83.33 (C1), 70.90 (C2), 69.46 (C5), 69.33 (C3), 66.41 (C4), 62.63 (C6), 42.70 (C8), 34.08 (C7), [20.99, 20.82, 20.81, 20.72 (4 x H<sub>3</sub>C-Ac)] ppm.

**[α]<sub>D</sub><sup>21</sup> :** +84.02° (C = 1 in Chloroform)



## Experimentalteil

### 6.3.11 *trans*-2,3-Dibrompyran (DBP)



Zu 0.9 mL Brom (2.81 g, 17.6 mmol, 1 Äq.) in 50 mL Pentan wurde bei  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  so lange 3,4-Dihydropyran zugetropft (ca. 4 mL, 3.72 g, 44 mmol, 2.5 Äq.), bis die Gelbfärbung durch das Brom gänzlich verschwunden war. Da sich Dihydropyran bei dieser Temperatur quasi nicht in Pentan löst, das Produkt allerdings schon, wurde die Pentanphase abgegossen und destillativ aufgereinigt. Dabei konnte zuerst das racemische Gemisch von *cis*-2,3-Dibrompyran als Rohprodukt abgetrennt werden. Im Anschluss wurden eine leicht verunreinigte und eine reine Fraktion des Hauptprodukts *trans*-2,3-Dibrompyran als racemisches Gemisch erhalten.

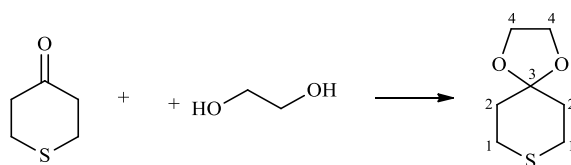
**Ausbeute:** 2.4 g (9.8 mmol, 55.7 %)

**Habitus:** blassgelbes bis farbloses, klares Öl

**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  6.69 (s(br), 1H, H1), 4.59 (s(br), 1H, H2), 4.10 – 3.88 (m, 2H, 2x H5), 2.78 – 2.62 (m, 1H, H3), 2.44 – 2.26 (m, 1H, H4), 2.07 – 1.97 (m, 1H, H3'), 1.64 – 1.51 (m, 1H, H4') ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$ :**  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  91.74 (C1), 63.79 (C5), 50.51 (C2), 25.69 (C3), 19.58 (C4) ppm (vgl. Lit.<sup>126</sup>).

### 6.3.12 1,4-dioxa-8-thiaspiro[4.5]decan (pMSP)



In Anlehnung an eine allgemeine Arbeitsvorschrift<sup>172</sup> wurden 0.5 g Tetrahydro-4*H*-thiopyran-4-on (4.3 mmol, 1 Äq.) in 5 ml Toluol gelöst, mit 320 mg (5.2 mmol, 1.2 Äq.) Ethylenglycol sowie ca. 50 mg *p*-Toluensulfonsäure versetzt und 8 h am Wasserabscheider zum Sieden erhitzt.

## Experimentalteil

Dann wurde die Reaktionsmischung abgekühlt, mehrfach mit verd. Natronlauge gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mit Pentan versetzt und das Produkt bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  kristallisiert.

**Ausbeute:** 453 mg (2.8 mmol, 67 %)

**Habitus:** farblose Nadelkristalle unterhalb  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , darüber farblose Flüssigkeit

**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  3.87 (s, 4H, H4), 2.73 – 2.61 (m, 4H, H1), 1.86 – 1.71 (m, 4H, H2).

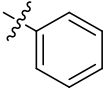
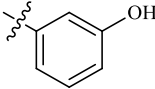
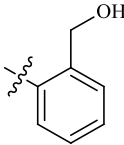
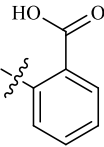
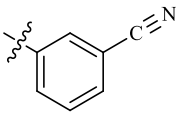
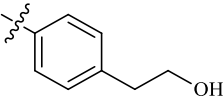
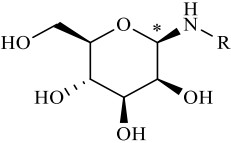
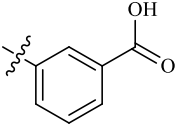
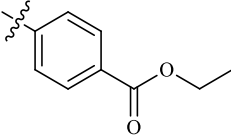
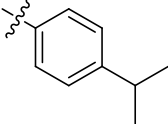
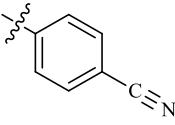
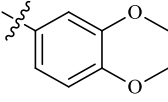
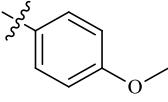
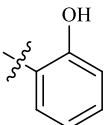
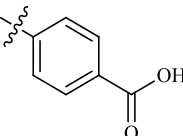
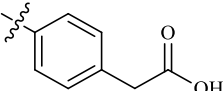
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  106.38 (C3), 63.81 (C4), 36.48 (C2), 26.29 (C1). ppm.

## Experimentalteil

### 6.4 Monocyclische *N,O*-Acetale

Auf Mannosebasis (HAM):

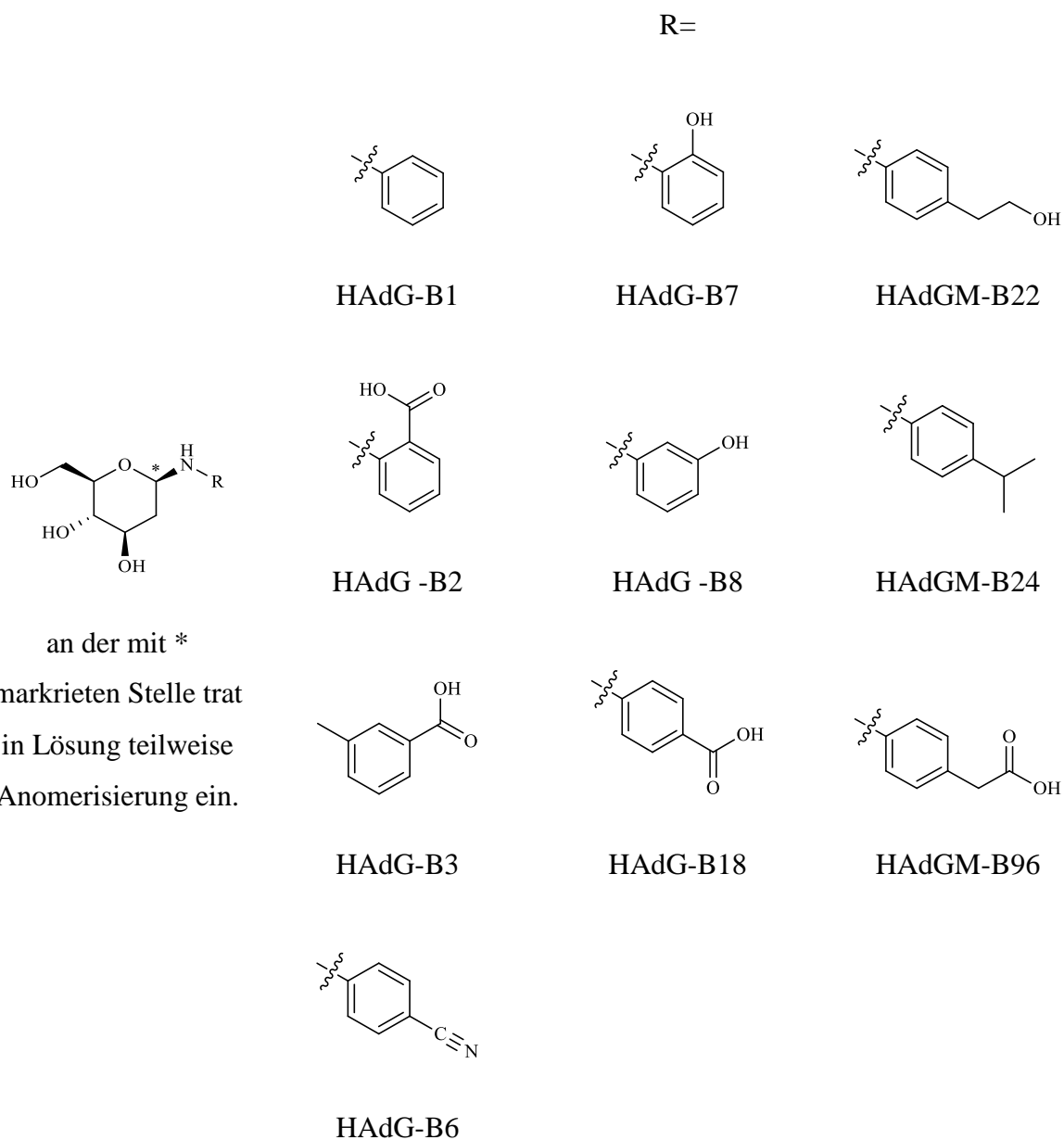
Tabelle 10: Übersicht der synthetisierten monocyclischen *N,O*-Acetale auf Mannose-Basis

	R=		
			
	HAM-B1	HAM-B8	HAM-B21
			
	HAM-B2	HAM-B9	HAM-B22
			
An der mit * markierten Stelle trat in Lösung teilweise Anomerisierung ein	HAM-B3	HAM-B11	HAM-B24
			
	HAM-B6	HAM-B16	HAM-B95
			
	HAM-B7	HAM-B18	HAM-B96

## Experimentalteil

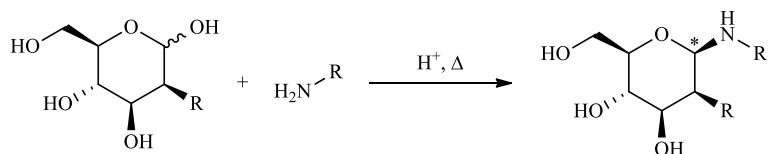
### Auf 2-Deoxyglucosebasis (HAdG)

Tabelle 11: Übersicht der synthetisierten monocyclischen *N,O*-Acetale auf 2-Deoxyglucose-Basis



## Experimentaltteil

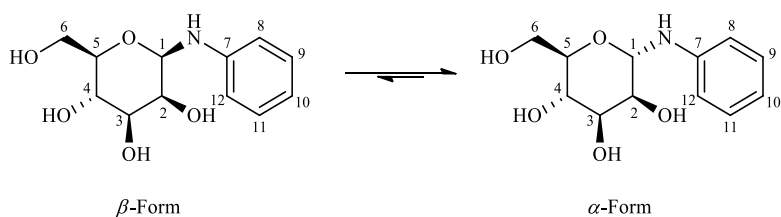
### 6.4.1 Generelle Arbeitsvorschrift



In Anlehnung an Wang *et al.*<sup>140</sup>

1 Äq. Zucker sowie 1 Äq. Amin wurden in 6 ml einer Mischung aus 95 % (Vol.) Ethanol, 5 % Wasser sowie 0.1 % Essigsäure im verschlossenen Vial bei 65 °C für 3 h gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung abgekühlt das Produkt je nach Beschaffenheit entweder direkt abgetrennt oder umkristallisiert.

### 6.4.2 HAM-B1 (2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*(*S*))-2-(hydroxymethyl)-6-(phenylamino)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol



**Ansatzgröße:** 245 mg *D*-Mannose (1.36 mmol)

127 mg Anilin (1.36 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde aus der Reaktionslösung kristallisiert.

**Anmerkungen:** Das Produkt wird als reine  $\beta$ -Form isoliert (Kristallstruktur), anomerisiert allerdings in Lösung und liegt im Gleichgewicht als Anomerengemisch von 31 %  $\alpha$ - und 69 %  $\beta$ -Anomer vor

**Ausbeute:** 184 mg (0.72 mmol, 53 %)

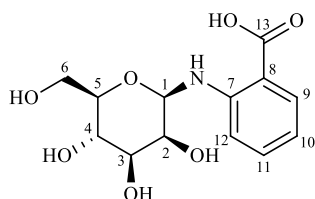
**Habitus:** weißer Feststoff

## Experimentalteil

- FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 690, 746, 773, 837, 871, 888, 935, 989, 1027, 1038, 1060, 1073, 1108, 1142, 1181, 1256, 1278, 1311, 1356, 1441, 1512, 1585, 1604, 2844, 2900, 2977, 3335, 3410, 3525.
- <sup>1</sup>H-NMR:** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.18 – 6.97 (m, 2H, H9&11  $\alpha+\beta$ ), 6.81 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H, H8&12  $\alpha$ ), 6.73 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H, H8&12  $\beta$ ), 6.62 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H10  $\alpha+\beta$ ), 6.30 (d,  $J = 5.6$  Hz, 1H, -NH  $\alpha$ ), 5.74 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H, -NH  $\beta$ ), 4.89 – 4.49 (m, 4H, H1 + 3x -OH  $\alpha+\beta$ ), 4.42 – 4.20 (m, 1H, -OH  $\alpha+\beta$ ), 3.83 – 3.28 (m, 5(6)H, H 2, 3, 4, 2x H6  $\alpha+\beta$  (sowie H5  $\alpha$ ), 3.22 – 3.06 (m, 1H, H5  $\beta$ ) ppm.
- <sup>13</sup>C-NMR:**  $\beta$ -Anomer (75 MHz, DMSO)  $\delta$  146.33 (C7), 128.84 (C9&11), 117.34 (C10), 113.65 (C8&12), 81.40 (C1), 78.28 (C5), 74.53 (C3), 71.23 (C4), 67.14 (C2), 61.28 (C6) ppm.
- $\alpha$ -Anomer (75 MHz, DMSO)  $\delta$  147.14 (C7), 128.77 (C9&11), 117.12 (C10), 113.43 (C8&12), 83.81 (C1), [72.81, 71.08, 70.70, 67.87 (C2, C3, C4, C5)], 61.36 (C6) ppm.
- $[\alpha]_{589}^{24}$ :** -46.94° (c = 1 in DMSO als  $\alpha / \beta$  Gemisch [2.9:7.1])

## Experimentalteil

### 6.4.3 HAM-B2 2-(((2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)amino)benzoesäure



**Ansatzgröße:** 245 mg *D*-Mannose (1.36 mmol)

186 mg 2-Aminobenzoesäure (1.36 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt als Feststoff abgetrennt und mit Ethanol gewaschen

**Ausbeute:** 272 mg (0.91 mmol, 67 %)

**Habitus:** hellbrauner Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 754, 774, 881, 912, 964, 1010, 1040, 1065, 1092, 1123, 1143, 1164, 1231, 1318, 1377, 1455, 1520, 1581, 1605, 1673, 2340, 2359.

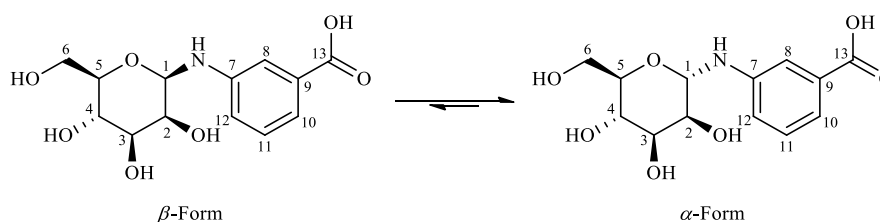
**<sup>1</sup>H-NMR:** 1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.61 (s(br), 1H, -COOH), 8.65 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, -NH), 7.79 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H, H12), 7.55 – 7.23 (m, 1H, H10), 6.89 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H9), 6.71 – 6.58 (m, 1H, H11), 4.97 – 4.85 (m, 2H, H1 + -OH), 4.84 – 4.66 (m, 2H, 2x -OH), 4.44 – 4.24 (m, 1H, -OH), 3.77 – 3.71 (m, 1H, H2), 3.70 – 3.59 (m, 1H, H6), 3.52 – 3.27 (m, 3H, H6', H3, H4), 3.25 – 3.12 (m, 1H, H5).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  169.39 (C13), 148.91 (C7), 134.11 (C10), 131.39 (C12), 115.74 (C11), 113.26 (C9), 111.18 (C8), 80.23 (C1), 77.89 (C5), 74.33 (C3), 70.88 (C4), 66.90 (C2), 61.18 (C6).

**$[\alpha]_{589}^{24}$ :** -65.01° (*c* = 1 in DMSO)

## Experimentaltteil

### 6.4.4 HAM-B3 3-(((3*S*,4*S*,5*S*,6*R*(*S*))-3,4,5-Trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)amino)benzoesäure



**Ansatzgröße:** 245 mg *D*-Mannose (1.36 mmol)

186 mg 3-Aminobenzoesäure (1.36 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt als Feststoff abgetrennt und mit Ethanol gewaschen

**Anmerkungen:** Das Produkt wird vermutlich als reine  $\beta$ -Form isoliert, anomerisiert allerdings in Lösung und liegt im NMR als Anomerengemisch von 25 %  $\alpha$ - und 75 %  $\beta$ -Anomer vor

**Ausbeute:** 169 mg (0.56 mmol, 42 %)

**Habitus:** weißer Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 666, 686, 710, 762, 773, 808, 866, 888, 904, 956, 1014, 1061, 1083, 1116, 1141, 1196, 1237, 1266, 1313, 1384, 1450, 1488, 1529, 1585, 1610, 1640, 1977, 2360, 2833, 2932, 2947, 3342, 3564.

**<sup>1</sup>H-NMR:**  $\beta$ -Anomer (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  12.68 (s, 1H, -COOH $\underline{H}$ ), 7.32 (s, 1H, H8), 7.21 (s(br), 2H, H10, H11), 7.02 – 6.92 (m, 1H, H12), 6.10 (d, J = 9.4 Hz, 1H, -N $\underline{H}$ ), 4.78 (d, J = 9.3 Hz, 3H, H1, 2x -OH $\underline{H}$ ), 4.34 (s, 1H, -OH $\underline{H}$ ), 3.73 (s, 2H, H4, H6), 3.57 – 3.24 (m, 4H, H2, H3, H6', -OH $\underline{H}$ ), 3.22 – 3.07 (m, 1H, H5) ppm.

$\alpha$ -Anomer (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  12.68 (s, 1H, -COOH $\underline{H}$ ), 7.41 (s, 1H, H8), 7.17 (s(br), 2H, H10, H11), 7.05 (s, 1H, H12), 6.60 (d, J = 5.7 Hz, 1H, -N $\underline{H}$ ), 4.88 (d, J = 4.8 Hz, 3H, H1, 2x -OH $\underline{H}$ ), 4.41 – 4.21 (m, 1H, -



## Experimentalteil

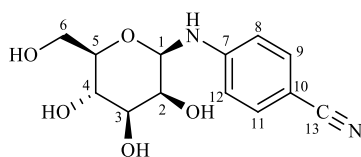
OH), 3.73 – 3.26 (m, 6H, H2, H3, H4, H6, H6', -OH), 3.20 – 3.10 (m, 1H, H5) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR:  $\beta$ -Anomer (75 MHz, DMSO)  $\delta$  167.83 (C13), 146.62 (C7), 131.37 (C9), 128.92 (C11), 118.31 (C10), 117.89 (C12), 114.24 (C8), 81.41 (C1), 77.94 (C5), 74.40 (C3), 71.13 (C4), 67.06 (C2), 61.23 (C6) ppm.

$\alpha$ -Anomer (75 MHz, DMSO)  $\delta$  167.86 (C13), 147.15 (C7), 131.27 (C9), 128.95 (C11), 118.31 (C10), 117.89 (C12), 114.24 (C8), 83.51 (C1), [73.00, 70.99, 70.57, 67.68 (C2, C3, C4, C5)], 61.18 (C6) ppm.

$[\alpha]_{589}^{24}$ : -97.35° (c = 1 in DMSO)

### 6.4.5 HAM-B6 4-(((2R,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-Trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)amino)benzonnitril



**Ansatzgröße:** 245 mg *D*-Mannose (1.36 mmol)

160 mg 4-Aminobenzonnitril (1.36 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt aus der Reaktionslösung abgetrennt und mit Ethanol gewaschen.

**Ausbeute:** 300 mg (1.1 mmol, 79 %)

**Habitus:** Farbloser Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 835, 879, 934, 990, 1035, 1059, 1075, 1107, 1142, 1182, 1230, 1261, 1279, 1318, 1333, 1358, 1492, 1523, 1576, 1608, 2217, 2341, 2359, 2854, 2901, 2976, 3077, 3242, 3350, 3400, 3533.

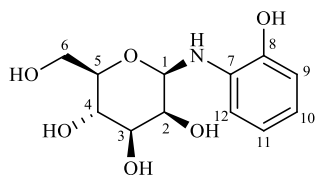
## Experimentalteil

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.49 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H9&11), 6.87 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H8&12), 6.83 (d, J = 8.8 Hz, 1H, -NH), 4.87 (d, J = 5.4 Hz, 1H, -OH), 4.85 – 4.73 (m, 3H, H1, 2x -OH), 4.40 (dd, J = 5.8, 5.3 Hz, 1H, -OH), 3.73 (dd, J = 4.9, 1.8 Hz, 1H, H4), 3.66 (ddd, J = 11.4, 5.3, 1.8 Hz, 1H, H6), 3.50 – 3.30 (m, 3H, H2, H3, H6'), 3.22 – 3.14 (m, 1H, H5) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO) δ 150.66 (C7), 133.30 (C9&11), 120.44 (C13), 113.78 (C8&12), 97.90 (C10), 80.80 (C1), 78.07 (C5), 74.28 (C3), 70.84 (C4), 66.97 (C2), 61.24 (C6) ppm.

**[α]<sub>589</sub><sup>24</sup>:** -142.84° (c = 1 in DMSO)

### 6.4.6 HAM-B7 (2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-(Hydroxymethyl)-6-((2-hydroxyphenyl)-amino)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol



**Ansatzgröße:** 245 mg *D*-Mannose (1.36 mmol)

148 mg 2-Aminophenol (1.36 mmol)

**Aufreinigung:** Das Rohprodukt wurde direkt aus der Reaktionsmischung abgetrennt und aus Ethanol umkristallisiert.

**Ausbeute:** 229 mg (0.84 mmol, 62 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 668, 700, 726, 749, 758, 804, 840, 856, 877, 895, 932, 982, 1025, 1042, 1060, 1076, 1102, 1139, 1159, 1181, 1223, 1254, 1270, 1280, 1314, 1345, 1373, 1400, 1464, 1480, 1513, 1590, 1610, 2342, 2359, 2850, 2898, 2940, 2962, 2989, 3035, 3200, 3286, 3302, 3394, 3497, 3549.

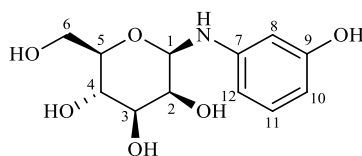
## Experimentalteil

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.31 (s, 1H, -ArOH), 6.77 – 6.58 (m, 3H, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>12</sub>), 6.48 (ddd, J = 7.3, 2.0 Hz, 1H, H<sub>12</sub>), 5.35 (d, J = 10.5 Hz, 1H, -NH), 4.96 (d, J = 5.3 Hz, 1H, -OH), 4.79 (d, J = 10.6 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4.75 (d, J = 5.0 Hz, 1H, -OH), 4.70 (d, J = 4.5 Hz, 1H, -OH), 4.28 (dd, J = 6.4, 5.2 Hz, 1H, -OH), 3.78 – 3.68 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 3.63 (ddd, J = 11.5, 5.2, 2.2 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 3.50 – 3.35 (m, 3H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>6</sub>'), 3.19 – 3.07 (m, 1H, H<sub>5</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO) δ 143.93 (C<sub>8</sub>), 134.35 (C<sub>7</sub>), 119.26 (C<sub>10</sub>), 116.86 (C<sub>11</sub>), 113.57 (C<sub>12</sub>), 111.63 (C<sub>9</sub>), 80.30 (C<sub>1</sub>), 77.52 (C<sub>5</sub>), 74.27 (C<sub>3</sub>), 70.90 (C<sub>4</sub>), 66.83 (C<sub>2</sub>), 60.92 (C<sub>6</sub>) ppm.

**[α]<sub>589</sub><sup>24</sup>:** -119.42° (c = 1 in DMSO)

### 6.4.7 HAM-B8 (2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-(Hydroxymethyl)-6-((3-hydroxyphenyl)amino)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol



**Ansatzgröße:** 245 mg *D*-Mannose (1.36 mmol)

148 mg 3-Aminophenol (1.36 mmol)

**Aufreinigung:** Beim Abkühlen entsteht ein polymeres Gel, welches durch Erwärmen aus dem Reaktionsgefäß in einen Rundkolben überführt und mit Acetonitril aufgeköcht wurde, wobei das Produkt als Feststoff ausfällt. Dieses wird abfiltriert und getrocknet.

**Ausbeute:** 315 mg (1.16 mmol, 85 %)

**Habitus:** blassgelber Feststoff

## Experimentalteil

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 668, 690, 721, 772, 800, 865, 896, 932, 991, 1036, 1061, 1074, 1083, 1108, 1140, 1162, 1186, 1231, 1250, 1294, 1315, 1338, 1357, 1374, 1400, 1462, 1496, 1519, 1585, 1620, 2342, 2359, 2696, 2849, 2884, 2904, 2929, 2957, 2975, 3061, 3230, 3340, 3399, 3502.

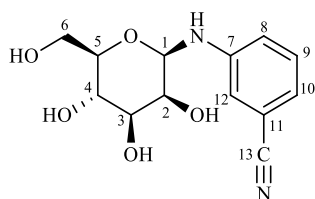
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8.95 (s, 1H, -ArOH), 6.86 (dd, J = 7.9, 8.0 Hz, 1H, H11), 6.20 – 6.12 (m, 2H, H10 oder H12, H8), 6.06 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H, H10 oder H12), 5.58 (d, J = 9.7 Hz, 1H, -NH), 4.77 (d, J = 5.2 Hz, 1H, -OH), 4.71 – 4.63 (m, 3H, H1, 2x -OH), 4.30 (dd, J = 5.8, 5.3 Hz, 1H, -OH), 3.75 – 3.67 (m, 1H, H4), 3.67 – 3.60 (m, 1H, H6), 3.45 (dd, J = 11.6, 5.8 Hz, 1H, H6'), 3.41 – 3.37 (m, 2H, H3, H2), 3.17 – 3.05 (m, 1H, H5) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  158.11 (C9), 147.58 (C14), 129.46 (C11), [105.03, 104.81 (C10&12)], 100.64 (C8), 81.49 (C1), 77.87 (C5), 74.49 (C3), 71.22 (C4), 67.08 (C2), 61.25 (C6) ppm.

**$[\alpha]_{589}^{24}$ :** -121.47° (c = 1 in DMSO)

## Experimentalteil

### 6.4.8 HAM-B9 3-(((2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-Trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)amino)benzonnitril



**Ansatzgröße:** 245 mg *D*-Mannose (1.36 mmol)

160 mg 3-Aminobenzonnitril (1.36 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt aus der Reaktionsmischung abgetrennt und mit Ethanol gewaschen.

**Ausbeute:** 372 mg (1.33 mmol, 98 %)

**Habitus:** blassbrauner, feinkristalliner Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 683, 719, 744, 791, 853, 879, 897, 925, 940, 994, 1035, 1048, 1058, 1075, 1082, 1108, 1140, 1188, 1206, 1232, 1258, 1280, 1316, 1349, 1361, 1376, 1396, 1461, 1486, 1521, 1584, 1598, 2161, 2225, 2343, 2360, 2875, 2898, 2932, 2957, 2973, 3060, 3082, 3215, 3340, 3388, 3521.

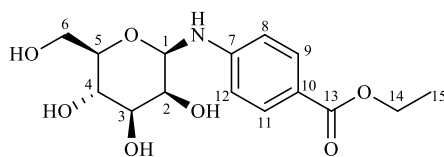
**<sup>1</sup>H-NMR:** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.27 (dd, *J* = 7.9 Hz, 1H, H<sub>9</sub>), 7.13 (s(br), 1H, H<sub>12</sub>), 7.09 (dd, *J* = 8.0, 1.9 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 7.02 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H<sub>10</sub>), 6.42 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, -**NH**), 4.85 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, -**OH**), 4.83 – 4.74 (m, 3H, H<sub>1</sub>, 2x -**OH**), 4.38 (dd, *J* = 5.8 Hz, 5.4 Hz, 1H, -**OH**), 3.72 (dd, *J* = 5.0, 2.3 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 3.66 (ddd, *J* = 11.4, 5.4, 2.0 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 3.47 – 3.31 (m, 3H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>6'</sub>), 3.25 – 3.15 (m, 1H, H<sub>5</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  147.31 (C<sub>7</sub>), 129.95 (C<sub>9</sub>), 120.53 (C<sub>10</sub>), 119.59 (C<sub>13</sub>), 118.56 (C<sub>8</sub>), 115.99 (C<sub>12</sub>), 111.51 (C<sub>11</sub>), 80.94 (C<sub>1</sub>), 77.94 (C<sub>5</sub>), 74.36 (C<sub>3</sub>), 70.96 (C<sub>4</sub>), 67.04 (C<sub>2</sub>), 61.27 (C<sub>6</sub>) ppm.

**[ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>24</sup>:** -114.26° (*c* = 1 in DMSO)

## Experimentalteil

### 6.4.9 HAM-B11 Ethyl-4-(((2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)amino)benzoat



**Ansatzgröße:** 245 mg *D*-Mannose (1.36 mmol)

225 mg 2-Aminophenol (1.36 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt aus der Reaktionslösung abgetrennt und mit Ethanol gewaschen

**Ausbeute:** 66 mg (0.20 mmol, 15 %)

**Habitus:** farbloser, feinkristalliner Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 696, 769, 843, 853, 882, 901, 936, 992, 1033, 1059, 1075, 1104, 1125, 1143, 1178, 1260, 1276, 1311, 1367, 1401, 1420, 1451, 1473, 1496, 1524, 1580, 1607, 1685, 1705, 2341, 2360, 2847, 2902, 2937, 2978, 2995, 3233, 3333, 3403, 3512.

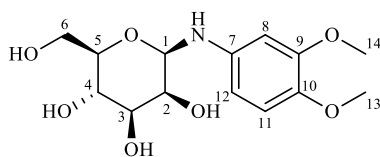
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H9&11), 6.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H8&12), 6.60 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, -NH), 4.85 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, -OH), 4.83 – 4.71 (m, 3H, H1, 2x -OH), 4.37 (dd, *J* = 5.2, 5.7 Hz, 1H, -OH), 4.21 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, 2x H14), 3.73 (dd, *J* = 4.9, 1.9 Hz, 1H, H4), 3.66 (ddd, *J* = 11.4, 5.2, 1.9 Hz, 1H, H6), 3.51 – 3.36 (m, 3H, H2, H3, H6'), 3.25 – 3.12 (m, 1H, H5), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, 3x H15) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  165.83 (C13), 150.91 (C7), 130.65 (C9&11), 118.03 (C10), 112.82 (C8&12), 80.89 (C1), 78.04 (C5), 74.29 (C3), 70.87 (C4), 66.96 (C2), 61.20 (C6), 59.75 (C14), 14.35 (C15) ppm

**[ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>24</sup>:** -123.06° (*c* = 1 in DMSO)

## Experimentalteil

### 6.4.10 HAM-B16 (2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-((3,4-Dimethoxyphenyl)amino)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol



**Ansatzgröße:** 100 mg *D*-Mannose (0.55 mmol)

84 mg 3,4-Dimethoxyanilin (0.55 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt aus der Reaktionslösung abgetrennt und mit Isopropanol und Ether gewaschen.

**Anmerkungen:** Weiteres Produkt wäre auch aus der Mutterlauge erhältlich gewesen. Auf deren Aufarbeitung wurde verzichtet.

**Ausbeute:** 90 mg (0.29 mmol, 52 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 768, 805, 830, 868, 908, 945, 960, 1003, 1034, 1048, 1073, 1106, 1124, 1143, 1164, 1183, 1232, 1282, 1351, 1372, 1413, 1432, 1450, 1464, 1512, 1537, 1614, 2831, 2932, 3273, 3367.

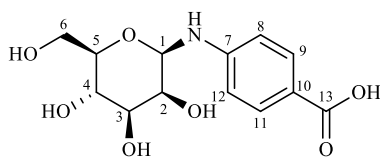
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  6.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H11), 6.47 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H8), 6.22 (dd, *J* = 8.6, 2.5 Hz, 1H, H12), 5.45 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, -NH), 4.81 – 4.62 (m, 4H, H1, 3x -OH), 3.72 – 3.69 (m, 1H, H4), 3.68 (s, 4H, 3x H14, -OH), 3.62 (s, 4H, H6, 3x H13), 3.46 – 3.29 (m, 3H, H2, H3, H6'), 3.19 – 3.08 (m, 1H, H5) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  149.70 (C9), 141.17 (C7), 141.04 (C10), 114.09 (C11), 104.56 (C12), 100.10 (C8), 82.11 (C1), 77.94 (C5), 74.60 (C3), 71.25 (C4), 67.26 (C2), 61.29 (C6), 56.54 (C13), 55.26 (C14).

**[ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>24</sup>:** -112.71° (c = 1 in DMSO)

## Experimentalteil

### 6.4.11 HAM-B18 4-(((2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-Trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)amino)benzoesäure



**Ansatzgröße:** 245 mg *D*-Mannose (1.36 mmol)

186 mg 4-Aminobenzoesäure (1.36 mmol)

**Aufreinigung:** Das Lösemittel wurde größtenteils entfernt und der ölige Rückstand mit Acetonitril aufgegosen, wobei das Rohprodukt kristallisierte. Es wurde abgetrennt und mit heißem Ethanol gewaschen.

**Anmerkungen:** Die Reaktionsmischung wurde zusätzlich zum regulären Lösemittel (4 ml Ethanol/Wasser) mit weiteren 2 ml Wasser versetzt und für 15 min bei 90 °C gerührt. Nach oben beschriebener Aufarbeitung kann aus der Mutterlauge weiteres Produkt als  $\alpha/\beta$ -Gemisch im Verhältnis 3:7 gewonnen werden.

**Ausbeute:** 183 mg (0.61 mmol, 45 %) reines  $\beta$ -Anomer

**Habitus:** farbloser, feinkristalliner Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 697, 768, 842, 879, 898, 932, 990, 1034, 1059, 1074, 1106, 1142, 1181, 1259, 1278, 1293, 1314, 1426, 1496, 1526, 1580, 1604, 1674, 2285, 2551, 2678, 2846, 2887, 2974, 3343, 3406, 3512.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  12.15 (s, 1H, -COOH), 7.68 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H9&11), 6.79 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H8&12), 6.53 (d, J = 9.0 Hz, 1H, -NH), 4.99 – 4.63 (m, 4H, H1, 3x -OH), 4.41 – 4.28 (m, 1H, -OH), 3.73 (s(br), 1H, H4), 3.70 – 3.59 (m, 1H, H6), 3.51 – 3.29 (m, 3H, H2, H3, H6'), 3.25 – 3.09 (m, 1H, H5) ppm.

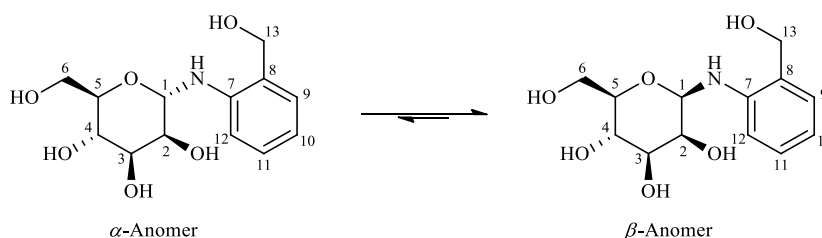


## Experimentaltteil

$^{13}\text{C-NMR}$ : (75 MHz, DMSO)  $\delta$  167.47 (C13), 150.63 (C7), 130.86 (C9&11), 118.89 (C10), 112.74 (C8&12), 80.94 (C1), 78.02 (C5), 74.32 (C3), 70.91 (C4), 66.98 (C2), 61.22 (C6) ppm.

$[\alpha]_{589}^{24}$ : -121.87° (c = 1 in DMSO)

### 6.4.12 HAM-B21 (2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-(Hydroxymethyl)-6-((2-(hydroxymethyl)phenyl)-amino)tetra-hydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol



**Ansatzgröße:** 245 mg *D*-Mannose (1.36 mmol)

167 mg 2-Aminobenzylalkohol (1.36 mmol)

**Aufreinigung:** Beim Abkühlen entsteht ein polymeres Gel, welches durch Erwärmen aus dem Reaktionsgefäß in einen Rundkolben überführt und mit Acetonitril aufgeköcht wurde, wobei das Produkt als Feststoff ausfällt. Dieses wird abfiltriert und getrocknet. Eine Abtrennung des  $\alpha$ -Anomers gelingt durch Aufkochen der Mischung mit Ethanol. In der Ethanolphase, welche heiß abgetrennt werden muss, bevor diese zu einem Gel erstarrt, anomerisiert das Produkt allerdings wieder zu einer 25:75 Mischung.

**Anmerkungen:** Das Produkt wird als Anomerengemisch von 25 %  $\alpha$ - und 75 %  $\beta$ -Anomer gewonnen.

**Ausbeute:** 164 mg (0.57 mmol, 42 %)

**Habitus:** blassgelber Feststoff

## Experimentalteil

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 668, 678, 744, 768, 807, 846, 878, 903, 957, 976, 1004, 1051,  
(Mischung) 1071, 1123, 1154, 1257, 1308, 1383, 1422, 1468, 1515, 1591, 1608, 2848,  
2888, 2928, 3263, 3361.

**<sup>1</sup>H-NMR:**  $\beta$ -Anomer (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.14 – 7.02 (m, 2H, H), 10), 6.77 (d, J = 7.9, Hz, 1H, H12), 6.62 (dd, J = 7.9, 7.5 Hz, 1H), 6.10 (d, J = 10.1 Hz, 1H, -NH), 5.14 (dd, J = 6.0, 4.1 Hz, 1H, -OH), 4.91 (d, J = 5.3 Hz, 1H, -OH), 4.83 – 4.70 (m, 2H, H1, -OH), 4.45 – 4.32 (m, 4H, 2x H13, 2x -OH), 3.84 – 3.56 (m, 2H, H4, H6), 3.53 – 3.39 (m, 3H, H2, H3, H6'), 3.23 – 3.10 (m, 1H, H5) ppm.

$\alpha$ -Anomer (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.00 (dd, J = 7.6, 7.3 Hz, 1H, H10), 6.90 (d, J = 7.3 Hz, 1H, H9), 6.75 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H12), 6.68 (dd, J = 7.6, 7.3 Hz, 1H, H11), 5.31 (d, J = 6.3 Hz, 1H, -NH), 5.01 (d, J = 5.1 Hz, 1H, -OH), 4.86 (d, J = 14.8 Hz, 1H, H13), 4.73 (d, J = 14.8 Hz, 1H, H13'), 4.68 (d, J = 6.3 Hz, 1H, -OH), 4.45 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.41 – 4.29 (m, 2H, 2x -OH), 4.19 (d, J = 7.5 Hz, 1H, -OH), [3.87 – 3.69 (m, 2H), 3.70 – 3.53 (m, 2H), 3.55 – 3.37 (m, 2H)] (H2, H3, H4, H5, H6, H6') ppm.

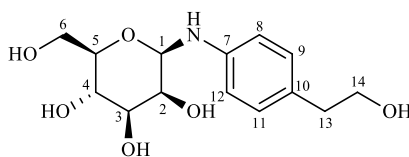
**<sup>13</sup>C-NMR:**  $\beta$ -Anomer <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  145.44 (C7), [128.68, 128.64 (C9, C10)], 126.50 (C8), 117.35 (C11), 112.84 (C12), 81.58 (C1), 78.23 (C5), 74.97 (C3), 71.73 (C4), 67.57 (C2), 62.73 (C13), 61.74 (C6) ppm.

$\alpha$ -Anomer <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  142.83 (C7), 127.37 (C10), 125.25 (C9), 122.65 (C8), 118.71 (C11), 118.01 (C12), 84.98 (C1), 71.10 (C2), [71.68, 70.07, 68.86, 67.49 (C3,C4,C5)], 64.35 (C6), 62.73 (C13) ppm.

**[ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>24</sup>:** -78.56° (c = 1 in DMSO)  
(Mischung)

## Experimentalteil

### 6.4.13 HAM-B22 (2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-((4-(2-Hydroxyethyl)phenyl)amino)-6-(hydroxymethyl)tetra-hydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol



**Ansatzgröße:** 100 mg *D*-Mannose (0.55 mmol)

76 mg 2-(4-Aminiphenyl)ethanol (0.55 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt aus der Reaktionslösung abgetrennt

**Ausbeute:** 272 mg (0.91 mmol, 68 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 692, 780, 806, 830, 851, 878, 908, 951, 1001, 1045, 1078, 1107, 1127, 1184, 1269, 1287, 1300, 1349, 1374, 1482, 1516, 1527, 1617, 2878, 2932, 3298, 3368.

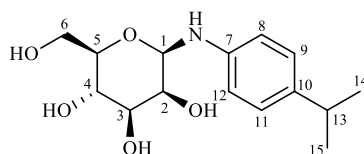
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  6.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H9&11), 6.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H8&12), 5.56 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, -NH), 4.80 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, -OH), 4.75 – 4.66 (m, 3H, H1, 2x -OH), 4.55 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, -OH), 4.34 – 4.31 (m, 1H, -OH), 3.70 (dd, *J* = 4.8, 1.8 Hz, 1H, H4), 3.63 (ddd, *J* = 11.4, 5.1, 2.0 Hz, 1H, H6), 3.50 (dt, *J* = 7.3, 5.2 Hz, 2H, 2x H13), 3.46 – 3.38 (m, 3H, H2, H3, H6'), 3.18 – 3.07 (m, 1H, H5), 2.57 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, 2x H14) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  144.38 (C7), 129.21 (C9&11), 127.98 (C10), 113.62 (C8&12), 81.52 (C1), 77.86 (C5), 74.53 (C3), 71.22 (C4), 67.14 (C2), 62.82 (C14), 61.26 (C6), 38.40 (C13) ppm.

**[ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>24</sup>:** -112.19° (c = 1 in DMSO)

## Experimentalteil

### 6.4.14 HAM-B24 (2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-(Hydroxymethyl)-6-((4-isopropylphenyl)amino)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol



**Ansatzgröße:** 245 mg *D*-Mannose (1.36 mmol)

184 mg 4-Isopropylanilin (1.36 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt kristallisierte direkt aus der Reaktionslösung aus und wurde aus dieser abgetrennt, mit Ethanol gewaschen und getrocknet.

**Ausbeute:** 279 mg (0.94 mmol, 69 %)

**Habitus:** farbloser, feinkristalliner Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 654, 728, 776, 823, 839, 882, 899, 937, 989, 1031, 1042, 1059, 1074, 1108, 1142, 1192, 1231, 1256, 1276, 1288, 1312, 1357, 1417, 1460, 1494, 1520, 1581, 1616, 2845, 2882, 2957, 3335, 3412, 3524.

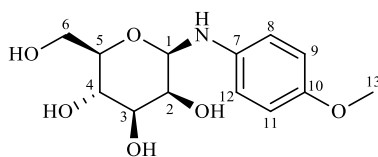
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  6.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H9&11), 6.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H8&12), 5.54 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, -NH), 4.80 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, -OH), 4.77 – 4.65 (m, 3H, H1, 2x -OH), 4.35 – 4.28 (m, 1H, -OH), 3.70 (dd, *J* = 4.8, 1.8 Hz, 1H, H4), 3.64 (ddd, *J* = 11.4, 5.2, 2.0 Hz, 1H, H6), 3.52 – 3.36 (m, 3H, H2, H3, H6'), 3.19 – 3.08 (m, 1H, H5), 2.73 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1H, H13), 1.14 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, 3x H14 & 3xH15) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  144.19 (C7), 137.25 (C10), 126.52 (C9&11), 113.65 (C8&12), 81.56 (C1), 77.88 (C5), 74.55 (C3), 71.24 (C4), 67.16 (C2), 61.28, (C6) 32.59 (C13), 24.29 (C14&15) ppm.

**[ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>24</sup>:** -108.09° (*c* = 1 in DMSO)

## Experimentalteil

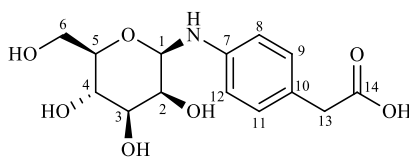
### 6.4.15 HAM-B95 (2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-(Hydroxymethyl)-6-((4-methoxyphenyl)amino)tetra-hydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol



- Ansatzgröße:** 245 mg *D*-Mannose (1.36 mmol)  
167 mg 4-Methoxyanilin (1.36 mmol)
- Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt aus der Reaktionslösung abgetrennt und mit Ethanol gewaschen.
- Ausbeute:** 245 mg (0.86 mmol, 63 %)
- Habitus:** farbloser Feststoff
- FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 658, 761, 786, 817, 841, 880, 936, 989, 1030, 1060, 1074, 1106, 1143, 1172, 1235, 1246, 1271, 1295, 1313, 1356, 1457, 1513, 2841, 2881, 2975, 3007, 3035, 3212, 3325, 3360, 3410, 3521.
- <sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  6.80 – 6.60 (m, 4H, H8&12, H9&11), 5.39 (d, J = 10.2 Hz, 1H, -NH), 4.74 (d, J = 5.3 Hz, 1H, -OH), 4.72 – 4.61 (m, 3H, H1, 2x -OH), 4.28 (dd, 1H, -OH), 3.70 (dd, J = 5.4, 1.7 Hz, 1H, H4), 3.67 – 3.60 (m, 4H, H6, 3x H13), 3.47 – 3.34 (m, 3H, H2, H3, H6'), 3.11 (ddd, J = 8.0, 5.5, 1.9 Hz, 1H, H5) ppm.
- <sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  151.66 (C10), 140.26 (C7), [114.39, 114.11 (C8&12, C9&11)], 81.81 (C1), 77.53 (C5), 74.28 (C3), 70.99 (C4), 66.90 (C2), 60.99 (C6), 55.01 (C13) ppm.
- [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>24</sup>:** -116.00° (c = 1 in DMSO)

## Experimentalteil

### 6.4.16 HAM-B96 2-(4-(((2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-Trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)amino)phenyl)essigsäure



**Ansatzgröße:** 245 mg *D*-Mannose (1.36 mmol)

206 mg 4-Aminophenyllessigsäure (1.36 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt aus der Reaktionslösung abgetrennt

**Anmerkungen:** Das Produkt ist unter Normalbedingungen äußerst instabil und zersetzte sich so schnell, dass eine vollständige Charakterisierung nicht möglich war. Deshalb wurden weder ein <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum noch Korrelationsspektren gemessen, was eine genaue Zuordnung der Signale erlaubt hätte. Auf ein IR-Spektrum sowie auf eine Drehwertmessung wurde ebenfalls verzichtet.

**Ausbeute:** 195 mg (0.62 mmol, 46 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff, der sich bei Raumtemperatur zu einem schwarzen, hochviskosen Öl zersetzt.

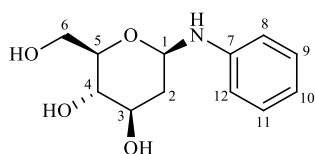
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 6.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.66 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 4.73 (d, *J* = 9.9 Hz, 2H), 4.32 (s, 1H), 3.70 (s, 1H), 3.64 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 3.48 – 3.21 (m, 8H), 3.18 – 3.08 (m, 1H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO) δ 129.40, 113.28, 81.15, 77.58, 74.24, 70.89, 66.86, 60.95, 39.76 ppm. (Die Signale von C7, C10 und C14 werden von der Messmethode nicht erfasst.)

**(DEPT135)**

## Experimentalteil

### 6.4.17 HAdG-D1 (2*R*,3*S*,4*R*,6*R*)-2-(Hydroxymethyl)-6-(phenylamino)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4-diol



**Ansatzgröße:** 200 mg 2-Deoxy-*D*-Glucose (1.22 mmol)

148 mg 2-Aminophenol (1.22 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt aus der erkalteten Reaktionslösung abgetrennt und mit Isopropanol gewaschen.

**Ausbeute:** 195 mg (0.81 mmol, 67 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 691, 745, 754, 821, 830, 847, 887, 928, 997, 1030, 1043, 1062, 1089, 1134, 1169, 1180, 1192, 1216, 1264, 1279, 1311, 1356, 1380, 1444, 1498, 1533, 1604, 2851, 2876, 2921, 2943, 3059, 3318.

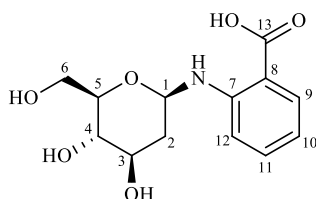
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.14 – 6.99 (m, 2H, H9&11), 6.69 – 6.63 (m, 2H, H8&12), 6.59 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H10), 6.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, -NH), 4.85 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, -OH), 4.81 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, -OH), 4.67 (ddd, *J* = 10.6, 8.5, 1.8 Hz, 1H, H1), 4.35 (dd, *J* = 6.2, 5.4 Hz, 1H, -OH), 3.65 (ddd, *J* = 11.6, 5.4, 2.3 Hz, 1H, H6), 3.55 – 3.41 (m, 2H, H3, H6'), 3.15 (ddd, *J* = 9.5, 5.2, 2.2 Hz, 1H, H5), 3.08 – 2.98 (m, 1H, H4), 2.01 (ddd, *J* = 12.5, 5.1, 1.8 Hz, 1H, H2), 1.63 – 1.46 (m, 1H, H2') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  146.71 (C7), 128.72 (C9&11), 116.91 (C10), 113.21 (C8&12), 80.11 (C1), 77.46 (C5), 71.70 (C4), 71.63 (C3), 61.09 (C6), 39.27 (C2) ppm.

**[ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>24</sup>:** -166.76° (*c* = 1 in DMSO)

## Experimentalteil

### 6.4.18 HAdG-D2 2-(((2*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)amino)benzoesäure



**Ansatzgröße:** 200 mg 2-Deoxy-*D*-Glucose (1.22 mmol)

167 mg 2-Amino-benzoesäure (1.22 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt aus der Reaktionslösung ausgefällt und mit Isopropanol gewaschen.

**Anmerkungen:** Das Produkt wird als reine  $\beta$ -Form isoliert, anomerisiert allerdings in Lösung und liegt laut NMR als Anomerengemisch von 30 %  $\alpha$ - und 70 %  $\beta$ -Anomer vor. Eine vollständige Zuordnung der NMR-Signale ist nicht für alle Kerne eindeutig möglich (grau).

**Ausbeute:** 277 mg (0.98 mmol, 80 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 661, 702, 753, 787, 834, 849, 889, 935, 998, 1029, 1053, 1069, 1091, 1142, 1165, 1180, 1236, 1282, 1300, 1319, 1368, 1399, 1455, 1522, 1587, 1670, 2876, 2902, 3219, 3332, 3388, 3509.

**<sup>1</sup>H-NMR:**  $\beta$ -Anomer: (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.81 (s, 1H, -COOH), 8.31 (d, J = 7.9 Hz, 1H, -NH), 7.80 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H12), 7.38 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H10), 6.92 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H9), 6.68 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H11), 5.07 – 4.78 (m, 2H, -OH, H1), 4.43 (s\*, 1H, -OH), 3.65 (d\*, J = 11.5 Hz, 2H, H6, -OH), 3.59 – 2.97 (m, 4H, H3, H4, H5, H6'), 2.13 (dd\*, J = 11.7, 4.5 Hz, 1H, H2), 1.47 (q\*, J = 11.3 Hz, 1H, H2')



## Experimentalteil

$\alpha$ -Anomer: (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  12.81 (s, 1H, -COOH), 8.56 (d, J = 6.2 Hz, 1H, -NH), 7.80 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H12), 7.38 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H10), 7.04 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H9), 6.68 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H11), 5.27 (t, J = 4.6 Hz, 1H, H1), 5.08 – 4.74 (m, 2H, 2x -OH), 4.31 (s, 1H, -OH), 3.79 – 2.98 (m, 5H, H3, H4, H5, 2x H6), 1.99 (dd\*, J = 12.9, 4.3 Hz, 1H, H2), 1.75 (ddd, J = 12.8, 4.6 Hz, 1H, H2') ppm.

\* bei diesem Multiplett handelt es sich um ein Spinsystem höherer Ordnung, bei dem nicht alle Kopplungen aufgelöst werden konnten.

**<sup>13</sup>C-NMR:**  $\beta$ -Anomer: (75 MHz, DMSO)  $\delta$  169.99 (C13), 149.03 (C7), 134.36 (C10), 131.34 (C12), 116.19 (C11), 113.42 (C9), 110.82 (C8), 78.71 (C1), 77.73 (C5), 71.44 (C4), 71.25 (C3), 60.96 (C6), 39.63 (C2) ppm.

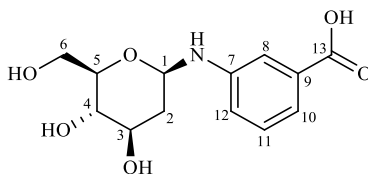
$\alpha$ -Anomer: <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  170.15 (C13), 149.11 (C7), 134.36 (C10), 131.34 (C12), 116.12 (C11), 113.37 (9), 110.82 (C8), 77.21 (C1), [72.54, 71.92 (C4, C5)], 68.39 (C3), 61.01 (C6), 37.68 (C2) ppm.

$[\alpha]_{589}^{24}$  : -39.8 ° (c = 1 in DMSO)

(Mischung)

## Experimentalteil

### 6.4.19 HAdG-D3 3-(((4R,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)amino)benzoesäure



**Ansatzgröße:** 200 mg 2-Deoxy-*D*-Glucose (1.22 mmol)

167 mg 3-Amino-benzoesäure (1.22 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt aus der Reaktionslösung ausgefällt und mit Isopropanol gewaschen.

**Anmerkungen:** Das Produkt zersetzt sich innerhalb weniger Wochen vollständig zu einer schwarzen, teerartigen Masse.

**Ausbeute:** 242 mg (0.85 mmol, 70 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 667, 681, 755, 806, 831, 889, 929, 1001, 1042, 1063, 1088, 1171, 1192, 1262, 1284, 1317, 1384, 1411, 1451, 1483, 1544, 1592, 1607, 1679, 2161, 2358, 2923, 3316.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  12.62 (s, 1H, -COOH), 7.27 (s, 1H, H8), [7.27 (s\*, 1H,), 7.21 (s\*, 1H,), 6.94 – 6.83 (m, 1H) H10, H11, H12], 6.69 (d, J = 8.4 Hz, 1H, -NH), 4.84 (s(br)\*, 2H, 2x -OH), 4.71 (t\*, J = 8.9 Hz, 1H, H1), 3.64 (d\*, J = 10.8 Hz, 1H, H6), 3.57 – 3.40 (m, 3H, -OH, H3, H6'), 3.20 – 3.11 (m, 1H, H5), 3.04 (t\*, J = 8.9 Hz, 1H, H4), 2.02 (dd, J = 11.5, 4.9 Hz, 1H, H2), 1.55 (q, J = 11.4 Hz, 1H, H2') ppm.

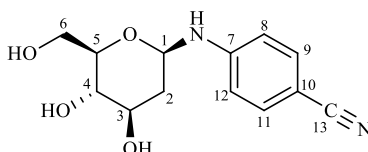
\* bei diesem Multiplett handelt es sich um ein Spinsystem höherer Ordnung, bei dem nicht alle Kopplungen aufgelöst werden konnten.

## Experimentalteil

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  167.77 (C13), 146.86 (C7), 131.26 (C9), 128.90 (C11), 117.97 (C10), 117.18 (C12), 114.17 (C8), 80.01 (C1), 77.52, (C5) 71.62 (C4), 71.52 (C3), 61.03 (C6), 39.20 (C2) ppm.

**$[\alpha]_{589}^{24}$ :** -69.96° (c = 1 in DMSO)

### 6.4.20 HAdG-D6 4-(((2*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)amino)benzonnitril



**Ansatzgröße:** 200 mg 2-Deoxy-*D*-Glucose (1.22 mmol)

144 mg 4-Aminobenzonnitril (1.22 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt abgetrennt und getrocknet.

**Ausbeute:** 235 mg (89 mmol, 73 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 670, 719, 835, 857, 886, 931, 999, 1044, 1059, 1089, 1136, 1170, 1183, 1215, 1265, 1282, 1313, 1328, 1356, 1382, 1423, 1437, 1451, 1525, 1586, 1609, 2164, 2215, 2358, 2865, 2918, 2944, 3090, 3254, 3343.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.50 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H9&11), 7.34 (d, J = 7.9 Hz, 1H, -**NH**), 6.75 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H8&12), 4.90 (d, J = 4.9 Hz, 1H, -**OH**), 4.86 (d, J = 4.9 Hz, 1H, -**OH**), 4.79 – 4.68 (m, 1H, H1), 4.43 – 4.36 (m, 1H, -**OH**), 3.64 (ddd, J = 11.4, 5.4, 2.0 Hz, 1H, H6), 3.56 – 3.39 (m, 2H, H3, H6'), 3.23 – 3.13 (m, 1H, H5), 3.08 – 2.97 (m, 1H, H3), 2.02 (ddd, J = 11.4, 5.2, 0.8 Hz, 1H, H4), 1.54 (q\*, J = 11.4 Hz, 1H, H4') ppm.

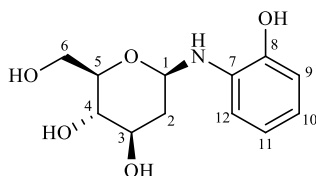
## Experimentalteil

\* bei diesem Multiplett handelt es sich um ein Spinsystem höherer Ordnung, bei dem nicht alle Kopplungen aufgelöst werden konnten.

**$^{13}\text{C}$ -NMR:**  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  150.63 (C7), 133.27 (C9&11), 120.30 (C13), 113.32 (C8&12), 97.67 (C10), 79.17 (C1), 77.65 (C5), 71.46 (C4), 71.30 (C3), 60.94 (C6), 38.84 (C2) ppm.

**$[\alpha]_{589}^{24}$ :**  $-133.45^\circ$  (c = 1 in DMSO)

### 6.4.21 HAdG-D7 (2R,3S,4R,6R)-2-(Hydroxymethyl)-6-((2-hydroxyphenyl)amino)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diol



**Ansatzgröße:** 200 mg 2-Deoxy-*D*-Glucose (1.22 mmol)

133 mg 2-Aminophenol (1.22 mmol)

**Aufreinigung:** Das Rohprodukt wurde direkt aus der Reaktionsmischung abgetrennt und aus Isopropanol umkristallisiert.

**Ausbeute:** 115 mg (0.45 mmol, 37 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 673, 746, 836, 844, 889, 905, 954, 1003, 1038, 1053, 1087, 1095, 1123, 1154, 1174, 1199, 1224, 1248, 1267, 1288, 1323, 1375, 1456, 1518, 1608, 2357, 2844, 2875, 2913, 2933, 3228, 3395.

**$^1\text{H}$ -NMR:** (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (s, 1H, ArOH), 6.76 – 6.58 (m, 3H, H9, H10, H12), 6.49 (ddd, J = 7.5, 7.5, 1.6 Hz, 1H, H11), 5.13 (d, J = 9.1 Hz, 1H, -NH), 4.86 (d, J = 4.6 Hz, 1H, -OH), 4.82 (d, J = 4.8 Hz, 1H, -OH),

## Experimentalteil

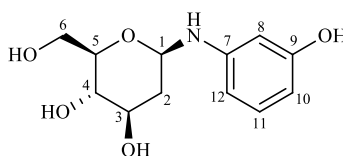
4.71 (t\*, J = 9.3 Hz, 1H, H1), 4.35 (t\*, J = 5.7 Hz, 1H, -OH), 3.64 (ddd, J = 11.3, 5.1, 1.8 Hz, 1H, H6), 3.56 – 3.40 (m, 2H, H3, H6'), 3.21 – 3.10 (m, 1H, H5), 3.04 (ddd, J = 9.1, 4.6 Hz, 1H, H4), 2.04 (ddd, J = 11.5, 4.9, 0.9 Hz, 1H, H2), 1.59 (q\*, J = 11.5 Hz, 1H, H2') ppm.

\* bei diesem Multiplett handelt es sich um ein Spinsystem höherer Ordnung, bei dem nicht alle Kopplungen aufgelöst werden konnten.

<sup>13</sup>C-NMR: <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 143.98 (C8), 134.68 (C7), 119.55 (C10), 117.38 (C11), 113.92 (C12), 112.28 (C9), 80.00 (C1), 77.60 (C5), 71.63 (C3, C4), 61.08 (C6), 39.49 (C2) ppm.

[α]<sub>589</sub><sup>24</sup>: -99.50° (c = 1 in DMSO)

### 6.4.22 HAdG-D8 (2R,3S,4R,6R)-2-(Hydroxymethyl)-6-((3-hydroxyphenyl)amino)tetrahydro-2H-pyran-3,4-diol



**Ansatzgröße:** 200 mg 2-Deoxy-*D*-Glucose (1.22 mmol)

133 mg 3-Aminophenol (1.22 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde aus der Reaktionslösung kristallisiert und mit Isopropanol gewaschen

**Ausbeute:** 190 mg (0.74 mmol, 61 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 690, 764, 833, 856, 899, 956, 1016, 1070, 1091, 1158, 1208, 1242, 1273, 1292, 1331, 1383, 1456, 1504, 1539, 1600, 2357, 2883, 2934, 2968, 3368, 3502.

## Experimentalteil

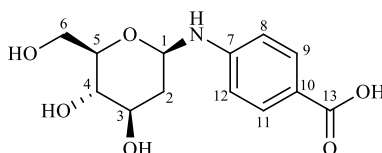
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.90 (s, 1H, AcOH), 6.84 (t\*, J = 8.2 Hz, 1H, H11), 6.27 (d, J = 8.5 Hz, 1H, -NH), 6.16 – 6.06 (m, 2H, H8, H10 oder H12), 6.06 – 5.97 (m, 1H, H10 oder H12), 4.83 (d, J = 4.8 Hz, 1H, -OH), 4.78 (d, J = 4.8 Hz, 1H, -OH), 4.60 (t\*, J = 8.9 Hz, 1H, H1), 4.39 – 4.28 (m, 1H, -OH), 3.64 (ddd, J = 11.4, 5.3, 1.9 Hz, 1H, H6), 3.53 – 3.40 (m, 2H, H3, H6'), 3.16 – 3.05 (m, 1H, H5), 3.02 (ddd, J = 9.2, 8.7, 4.7 Hz, 1H, H4), 1.97 (ddd, J = 11.5, 4.8, 0.8 Hz, 1H, H2), 1.52 (q\*, J = 11.5 Hz, 1H, H2') ppm.

\* bei diesem Multiplett handelt es sich um ein Spinsystem höherer Ordnung, bei dem nicht alle Kopplungen aufgelöst werden konnten.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO) δ 157.98 (C9), 147.99 (C14), 129.29 (C11), [104.57, 104.42 (C10&12)], 100.32 (C8), 80.20 (C1), 77.43 (C5), 71.63 (C3, C4), 61.06 (C6), 39.27 (C2), 25.48 ppm.

**[α]<sub>D</sub><sup>24</sup>:** -82.51° (c = 1 in DMSO)

### 6.4.23 HAdG-D18 4-(((2R,4R,5S,6R)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)amino)benzoesäure



**Ansatzgröße:** 200 mg 2-Deoxy-*D*-Glucose (1.22 mmol)

167 mg 4-Amino-benzoesäure (1.22 mmol)

**Aufreinigung:** Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im Rückstand aus Isopropanol umkristallisiert.

**Ausbeute:** 308 mg (1.08 mmol, 89 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff

## Experimentalteil

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 654, 697, 769, 844, 866, 886, 904, 960, 1018, 1069, 1112, 1171, 1219, 1272, 1287, 1312, 1380, 1435, 1499, 1533, 1605, 1675, 2561, 2851, 2930, 3342, 3423.

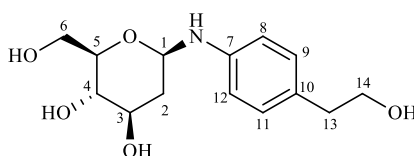
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.69 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H9&11), 7.11 (d, J = 8.0 Hz, 1H, -NH), 6.69 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H8&12), 4.74 (t\*, J = 8.9 Hz, 1H, H1), 3.65 (d\*, J = 10.8 Hz, 1H, H6), 3.56 – 3.40 (m, 2H, H3, H6'), 3.23 – 3.14 (m, 1H, H5), 3.03 (t\*, J = 8.9 Hz, 1H, H4), 2.02 (dd, J = 12.2, 4.5 Hz, 1H, H2), 1.55 (q\*, J = 11.4 Hz, 1H, H2') ppm.

\* bei diesem Multiplett handelt es sich um ein Spinsystem höherer Ordnung, bei dem nicht alle Kopplungen aufgelöst werden konnten.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  167.45 (C13), 150.74 (C7), 130.87 (C9&11), 118.77 (C10), 112.32 (C8&12), 79.44 (C1), 77.62 (C5), 71.54 (C4), 71.42 (C3), 61.01 (C6), 39.47 (C2) ppm.

**$[\alpha]_{589}^{24}$ :** -121.87° (c = 1 in DMSO)

### 6.4.24 HAdG-D22 (2*R*,3*S*,4*R*,6*R*)-6-((4-(2-Hydroxyethyl)phenyl)amino)-2-(hydroxymethyl)tetra-hydro-2*H*-pyran-3,4-diol



**Ansatzgröße:** 250 mg 2-Deoxy-*D*-Glucose (1.52 mmol)

209 mg 2-(4-Aminiphenyl)-ethanol (1.52 mmol)

**Aufreinigung:** Die Reaktionslösung erstarrt beim Abkühlen zu einem glasartigen Gel, welches durch Vermischung mit Dichlormethan unter Ultraschallbehandlung das Produkt freigibt. Dieses wird abgetrennt und getrocknet.

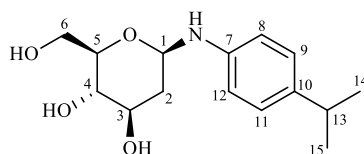
## Experimentalteil

- Ausbeute:** 222 mg (0.78 mmol, 52 %)
- Habitus:** farbloser Feststoff
- FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 667, 831, 857, 888, 930, 997, 1041, 1063, 1089, 1134, 1169, 1191, 1215, 1262, 1278, 1308, 1356, 1380, 1417, 1436, 1525, 1589, 1617, 2342, 2360, 2851, 2921, 3314.
- <sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  6.92 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H<sub>9</sub>&11), 6.57 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H<sub>8</sub>&12), 6.23 (d, J = 8.8 Hz, 1H, -NH), 4.83 (d, J = 4.8 Hz, 1H, -OH), 4.79 (d, J = 4.8 Hz, 1H, -OH), 4.64 (t\*, J = 9.0 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4.51 (t, J = 5.2 Hz, 1H, -ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), 4.33 (t\*, J = 5.8 Hz, 1H, -OH), 3.63 (ddd, J = 11.5, 5.3, 1.9 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 3.55 – 3.38 (m, 4H, H<sub>3</sub>, 2x H<sub>14</sub>, H<sub>6</sub>'), 3.18 – 3.07 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 3.07 – 2.96 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 2.56 (t, J = 7.3 Hz, 2H, 2x H<sub>13</sub>), 1.98 (dd\*, J = 11.8, 5.1 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 1.52 (q\*, J = 11.5 Hz, 1H, H<sub>2</sub>') ppm.
- \* bei diesem Multiplett handelt es sich um ein Spinsystem höherer Ordnung, bei dem nicht alle Kopplungen aufgelöst werden konnten.
- <sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  144.80 (C<sub>7</sub>), 129.09 (C<sub>9</sub>&11), 127.52 (C<sub>10</sub>), 113.17 (C<sub>8</sub>&12), 80.26 (C<sub>1</sub>), 77.44 (C<sub>5</sub>), 71.72 (C<sub>4</sub>), 71.64 (C<sub>3</sub>), 62.78 (C<sub>14</sub>), 61.10 (C<sub>6</sub>), 39.30 (C<sub>2</sub>), 38.38 (C<sub>13</sub>) ppm.
- $[\alpha]_{589}^{24}$ :** -75.93° (c = 1 in DMSO)



## Experimentalteil

### 6.4.25 HAdG-D24 (2*R*,3*S*,4*R*,6*R*)-2-(Hydroxymethyl)-6-((4-isopropylphenyl)amino)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4-diol



**Ansatzgröße:** 200 mg 2-Deoxy-*D*-Glucose (1.22 mmol)

165 mg 4-Isopropylanilin (1.22 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt aus der erkalteten Reaktionslösung abgetrennt und getrocknet.

**Ausbeute:** 296 mg (1.05 mmol, 86 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 667, 822, 856, 888, 928, 997, 1040, 1062, 1088, 1134, 1169, 1193, 1213, 1259, 1276, 1288, 1313, 1361, 1379, 1417, 1453, 1523, 1589, 1617, 2358, 2851, 2871, 2923, 2958, 3028, 3310.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H9&11), 6.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H8&12), 6.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, -NH), 4.83 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, -OH), 4.79 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, -OH), 4.64 (t\*, *J* = 9.3 Hz, 1H, H1), 4.33 (t\*, *J* = 5.8 Hz, 1H, -OH), 3.64 (ddd, *J* = 11.4, 5.4, 1.9 Hz, 1H, H6), 3.56 – 3.38 (m, 2H, H3, H6'), 3.18 – 3.08 (m, 1H, H5), 3.01 (ddd, *J* = 9.3, 8.9, 4.8 Hz, 1H, H4), 2.72 (hept, *J* = 6.5 Hz, 1H, H13), 1.98 (dd\*, *J* = 11.9, 4.7 Hz, 1H, H2), 1.52 (q\*, *J* = 11.5 Hz, 1H, H2'), 1.13 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, 3x H14, 3x H15) ppm.

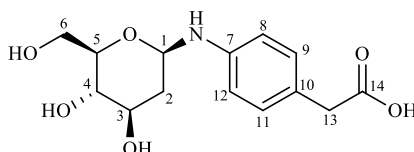
\* bei diesem Multiplett handelt es sich um ein Spinsystem höherer Ordnung, bei dem nicht alle Kopplungen aufgelöst werden konnten.

## Experimentalteil

**<sup>13</sup>C-NMR:** 13C NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  144.63 (C7), 136.80 (C10), 126.41 (C9&11), 113.21 (C8&12), 80.30 (C1), 77.46 (C5), 71.74 (C4), 71.66 (C3), 61.13 (C6), 39.31 (C2), 32.52 (C13), 24.27 (C14&15) ppm.

**$[\alpha]_{589}^{24}$ :** -83.48° (c = 1 in DMSO)

### 6.4.26 HAdG-D96 2-(4-(((2R,4R,5S,6R)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)amino)phenyl)essigsäure



**Ansatzgröße:** 200 mg 2-Deoxy-*D*-Glucose (1.22 mmol)

184 mg 4-Aminophenyllessigsäure (1.22 mmol)

**Aufreinigung:** Das Produkt wurde direkt aus der Reaktionslösung auskristallisiert und abgetrennt.

**Ausbeute:** 246 mg (0.83 mmol, 68 %)

**Habitus:** hellbrauner Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 673, 702, 716, 805, 831, 861, 887, 958, 1005, 1056, 1120, 1158, 1184, 1246, 1291, 1316, 1377, 1394, 1420, 1531, 1592, 1614, 1725, 2871, 2923, 2978, 3261, 3379, 3571.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  12.06 (s, 1H, -COOH), 6.96 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H9&11), 6.60 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H8&12), 6.36 (d, J = 8.7 Hz, 1H, -NH), 4.85 (s (br), 2H, 2x -OH), 4.67 (t\*, J = 9.2 Hz, 1H, H1), 4.37 (s, 1H, -OH), 3.63 (d\*, J = 11.4 Hz, 1H, H6), 3.55 – 3.39 (m, 4H, H3, H6', 2x H13), 3.13 (dd\*, J = 9.4, 3.1 Hz, 1H, H5), 3.02 (t\*, J = 8.9 Hz, 1H, H4), 1.99 (dd, J = 11.9, 4.7 Hz, 1H, H2), 1.53 (q, J = 11.5 Hz, 1H, H2') ppm.

## Experimentalteil

\* bei diesem Multiplett handelt es sich um ein Spinsystem höherer Ordnung, bei dem nicht alle Kopplungen aufgelöst werden konnten.

**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  173.39 (C14), 145.42 (C7), 129.68 (C9&11), 123.19 (C10), 113.17 (C8&12), 80.14 (C1), 77.50 (C5), 71.70 (C4), 71.67 (C3), 61.06 (C6), 40.02 (C13), 39.31 (C2) ppm.

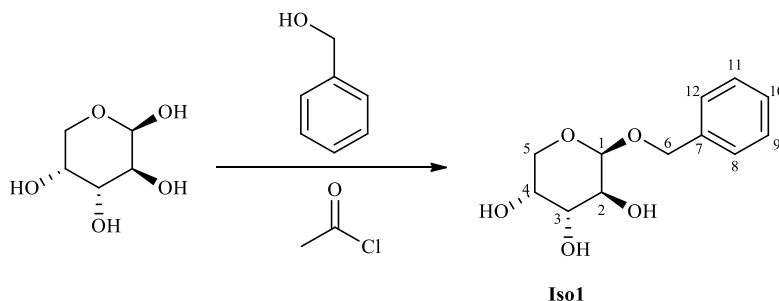
**$[\alpha]_{589}^{24}$ :**  $-74.23^\circ$  (c = 1 in DMSO)

## Experimentalteil

### 6.5 Nicht-kovalente Inhibitoren

#### 6.5.1 Isofagomin und 5-epi-Isfagomin

##### 6.5.1.1 Iso1 $\beta$ -D-Arabinopyranosid



25 g D-Arabinose (166.5 mmol, 1 Äq.) wurden in 66 g Benzylalkohol (610 mmol, 3.7 Äq.) gelöst und unter Rühren portionsweise mit 6 g Acetylchlorid (331.3 mmol, 2 Äq) so versetzt, dass die Temperatur unter 45 °C blieb. Dann wurde die Reaktionsmischung für 12 h bei 50 °C gerührt, wobei schon nach kurzer Zeit eine Gelbfärbung des Reaktionsansatzes auftrat. Nachdem auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde die Lösung mit Diethylether verdünnt und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt, wobei das Produkt aus der Lösung ausfiel. Das braun-gelbe Präzipitat wurde abfiltriert und bis zur Farblosigkeit mit Ethanol gewaschen. Die Mutterlauge der Reaktion, sowie sämtliche Waschflüssigkeiten wurden gesammelt und am Rotationsverdampfer weitestgehend konzentriert. Der sich dabei bildende Feststoff wurde bis zur Farblosigkeit mit Ethanol gewaschen.

**Ausbeute:** 31 g (129.0 mmol, 78 %)

**Habitus:** weißer Feststoff mit himbeerartigem Geruch

**R<sub>f</sub>:** 0.82 (Petrolether : Ethylacetat [3:1])

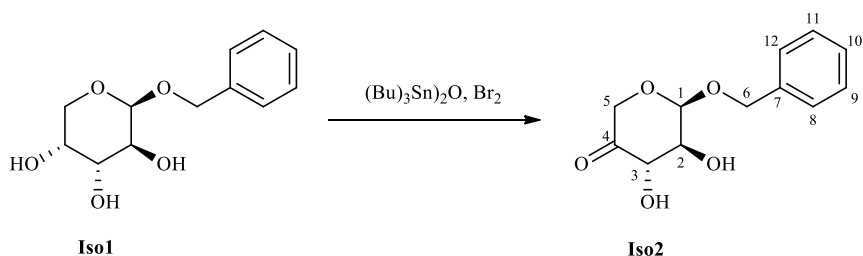
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.45 - 7.20 (m, 5H, ArH 8.9,10.11 und 12), 4.76 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, CH 1), 4.70 - 4.61 (m, 2H, CH<sub>2</sub> 6 und OH), 4.59 - 4.56 (m, 1H, OH), 4.53 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H, OH), 4.45 (d,  $J = 12.4$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub> 6'), 3.74 - 3.62 (m, 4H, CH<sub>2</sub> 5 sowie CH 2.3 und 4), 3.47 (dd,  $J = 11.8, 2.9$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub> 5'') ppm.

## Experimentalteil

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  138.66 (C-7), 128.63, 127.90 (C-8&12, C-9&11), 127.78 (C-10), 99.38 (C-1), 69.55, 69.11, 68.77 (C-2,3,4), 68.89 (C-6), 63.75 (C-5) ppm.

**$[\alpha]_{589}^{21}$ :**  $-208^\circ$  ( $c = 0.5$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ), vgl. Lit.<sup>173</sup> ( $[\alpha]_{589}^{20^\circ\text{C}} = -217^\circ$  ( $c = 0.6$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ))

### 6.5.1.2 Iso2 2-(Benzyloxy)-3,4-dihydroxydihydro-2H-pyran-5(4H)-on



Eine gerührte Suspension aus 2.0 g Benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosid (**Iso1**, 8.4 mmol, 1 Äq), 7.9 g Molekularsieb (3 Å) und 10 g  $(\text{Bu}_3\text{Sn})_2\text{O}$  (8.54 mL, 17.0 mmol, 2 Äq) in 45 mL trockenem Chloroform wurde langsam zum Sieden auf  $60^\circ\text{C}$  erhitzt und 3 h gekocht. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf  $-40^\circ\text{C}$  in einer Mischung aus Ethanol und flüssigem Stickstoff gekühlt und solange elementares Brom zugetropft, bis eine Gelbfärbung der Reaktionsmischung bestehen blieb. Dabei fiel ein farbloser Feststoff aus. Nach 5 min Rühren bei dieser Temperatur wurde die Mischung möglichst schnell auf eine vorbereitete, mit grobem Kieselgel (0.063-0.2 mm) in reinem Chloroform gepackte Chromatographiesäule gegeben und unter Überdruck auf die stationäre Phase aufgetragen. Etwaig verbliebenes Molsieb wurde ebenfalls auf die Säule gegeben und solange mit Chloroform durchgespült, bis die sichtbar gelben Zinnkomponenten vollständig eluiert waren und auf Kontroll-DCs kein Spot mit  $R_f > 0.8$  (EE : Toluol [1:1]) mehr vorhanden war. Dann wurde das Laufmittel zu reinem Ethylacetat gewechselt und das Produkt als komplexes Gemisch aus mindestens drei Isomeren mit  $R_f < 0.8$  (EE : Toluol [1:1]) und  $R_f > 0.31$  ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH [8:1]) in Form eines Öls gesammelt.

**Ausbeute:** 1.972 g (8.26 mmol, 98 %)

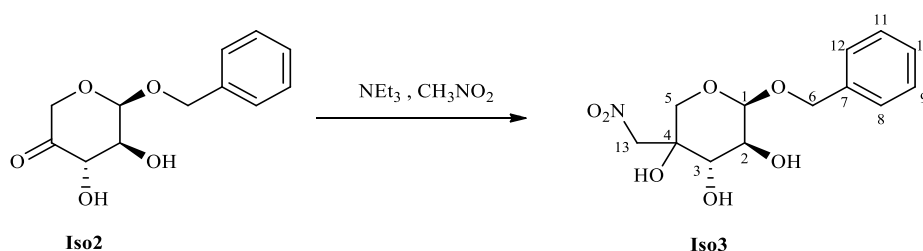
**Habitus:** klares, farbloses bis gelbes Öl

## Experimentalteil

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3300 (OH-Valenzschwingung), 2941, 2977, 2865 ( $\text{CH}_2$ -Valenzschwingung), 1453 ( $\text{C}=\text{O}$ -Valenzschwingung), 1347, 1334, 1315, 1259, 1136, 1029.1099, 1121, 1006, 952, 886, 846, 783, 740  $\text{cm}^{-1}$ .

**R<sub>f</sub>** : < 0.80 (EE : Toluol [1:1]) und > 0.31 ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH [8:1])

### 6.5.1.3 Iso3 (2R,3S,4S,5R/S)-2-(Benzyloxy)-5-(nitromethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol



900 mg **Iso2** (3.78 mmol, 1 Äq.) wurden in 25 mL Nitromethan gelöst und bis zum Erstarren gekühlt (ca.  $-35$  °C). Während die Mischung langsam auftaute, wurden 0.6 mL Triethylamin (0.436 g, 4.31 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben und die sich gelb färbende Mischung über 24 h bei RT gerührt. Dabei fiel ein Teil des 5R-Produkts in Form eines farblosen Feststoffs aus. Dieser wurde abfiltriert und die restliche Reaktionslösung am Rotationsverdampfer so weit wie möglich eingedampft und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt. Dabei wurden die beiden Stereoisomere (in Position 5, C4) nicht voneinander getrennt, da die Reduktion in der übernächsten Stufe nicht stereoselektiv ist.

**Ausbeute:** Racemat: 580 mg (1.94 mmol, 51 %)

**Habitus:** farbloser, weißer Feststoff

**R<sub>f</sub>** : 0.38 - 0.42, breiter Spot, enthält beide Isomere ( $\text{CHCl}_3$  : Methanol [8:1])

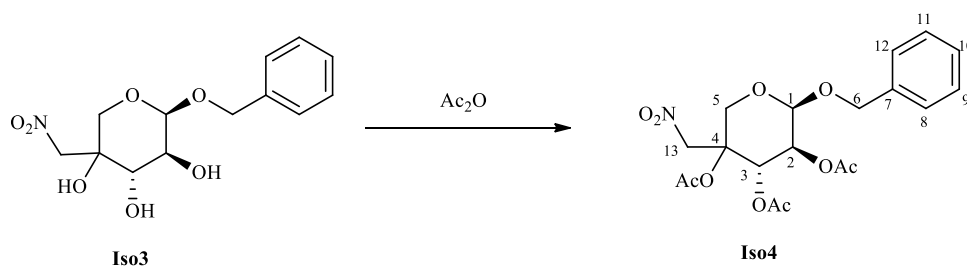
## Experimentalteil

Analytik 5*R*-Isomer (Vergl. Lit.<sup>150</sup>):

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO)  $\delta$  = 7.42 - 7.22 (m, 5H, 5x -CH(Ar) 8, 9, 10, 11 und 12), 5.17 (d,  $J$  = 13.7 Hz, 1H, -OH), 5.11 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 1H, -OH), 4.86 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 1H, -OH), 4.78 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 1H, CH 1), 4.75 - 4.59 (m, 3H, 2x -CH<sub>2</sub> 13 und -CH 3), 4.46 (d,  $J$  = 12.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> 6), 3.80 (d,  $J$  = 12.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> 6), 3.71 - 3.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub> 5), 3.48 (dd,  $J$  = 9.4, 6.1 Hz, 1H, CH 2) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  138.04 (C-7), 128.20(C-9&11), 127.50(C-12&8), 127.40 (C-10), 98.73 (C-1), 79.88 (C-13), 72.69 (C-4), 69.31 (C-2), 68.75 (C3), 68.55(C-6), 63.72 (C-5) ppm.

### 6.5.1.4 Iso4 (2*R*,3*S*,4*S*,5*R/S*) -2-(Benzyloxy)-5-(nitromethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetat



370 mg racemisches **Iso3** (1.23 mmol) wurden in 16 mL Essigsäureanhydrid suspendiert, auf 0° C gekühlt und mit 0.321 g *p*-Toluensulfonsäure-Monohydrat (1.69 mmol, 1.4 Äq) versetzt. Nachdem sich eine klare Lösung gebildet hatte, wurde das Kältebad entfernt und 24 h bei RT gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung mit Wasser versetzt und mit Dichlormethan extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden solange mit Natriumhydrogencarbonat versetzt, bis keine Gasentwicklung mehr auftrat. Diese Suspension wurden mit ausreichend Wasser versetzt, um sämtliche nicht gelösten Bestandteile zu lösen und zwei homogene flüssige Phase erhalten wurden. Diese wurden getrennt, die wässrige nochmals mit Dichlormethan extrahiert, die gesammelten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt. Dabei

## Experimentalteil

wurde kein Wert auf die Auftrennung der beiden Stereoisomere gelegt, sondern lediglich eine kleine Probe des 5*S*-Isomers zur Charakterisierung abgetrennt.

**Ausbeute:** Racemat: 0.420 g, (1.01 mmol, 80%)

**Habitus:** gelbes, hochviskoses Öl

**R<sub>f</sub> :** 5*S* - Isomer: 0.67

5*R* - Isomer 0.57 (Cyclohexan : Ethylacetat [1.8:1])

Analytik 5*S*-Isomer (Vergl. Lit.<sup>150</sup>):

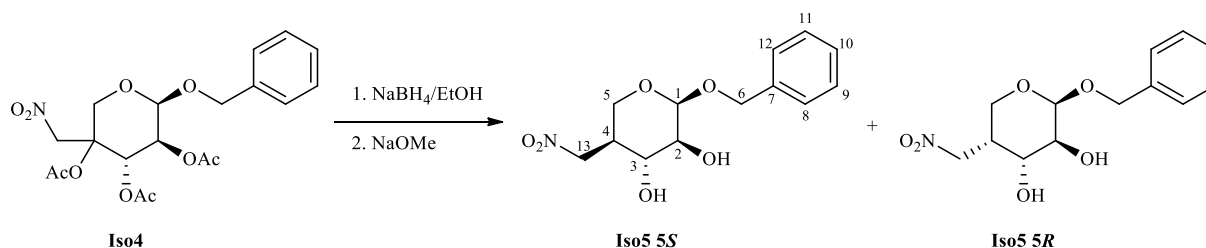
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = ppm. <sup>1</sup>H NMR 7.29 (m, 5H, 5x -CH(Ar) 8, 9, 10, 11 und 12), 5.63 - 5.45 (m, 1H, -CH 1), 5.16 - 4.88 (m, 3H, -CH<sub>2</sub> 13&13' und -CH<sub>2</sub> 6 ), 4.88 - 4.59 (m, 2H, 2x -CH 2 und 3), 4.54 - 4.35 (m, 2H, -CH<sub>2</sub> 5), 3.86 (dd, *J* = 12.6, 4.2 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub> 6'), 2.19 - 2.11 (m, 3H, - CH<sub>3</sub>), 2.03 - 1.99 (m, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.97 (d, *J* = 4.4 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ= 170.53/ 170.26/169.90 (3x -CO), 136.66 (-C(Ar) 7), 128.68 (2x -CH (Ar) 8&12), 128.32 (2x -CH (Ar) 13&15), 128.04 (-CH (Ar) 10), 95.06 (-CH 1), 79.54 (-CH<sub>2</sub> 13), 74.40 (-C 4), 70.08/69.51 (2x -CH 2 und 3), 69.00 (-CH<sub>2</sub> 6), 59.42 (-CH<sub>2</sub> 5), 21.92/ 20.81/ 20.44 (3x -CH<sub>3</sub>) ppm.



## Experimentaltteil

### 6.5.1.5 Iso5 (2*S*,3*S*,4*R*,5*R/S*)- 2-(Benzyloxy)-5-(nitromethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4-diol



420 mg (0.99 mmol 1 Äq) der racemischen Mischung **Iso4** wurden in 13.0 mL Ethanol suspendiert und unter Kühlung bei 0 °C eine ethanolischen Natriumborhydridlösung (0.458 g NaBH<sub>4</sub>, 1.20 mmol, 1.2 Äq. in 4.4 mL Ethanol) langsam hinzuge tropft. Dabei entstand eine klare Lösung. Anschließend wurde das Eisbad entfernt und die Lösung bei Raumtemperatur ca. 45 min gerührt. Danach wurde das Ethanol unter vermindertem Druck entfernt. Der farblose Rückstand wurde in 12.0 mL absolutem Methanol gelöst. Anschließend wurden 470 mg (0.09 mmol, 0.1 Äq.) Natriummethanolat (NaOMe) in 1.0 mL absolutem Methanol hinzugegeben. Nach 3 h Rühren wurde eine weitere Spatelspitze Natriummethanolat in die Reaktionslösung gegeben. Die Lösung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit 3 g Festsäure (Iewatit<sup>®</sup>) versetzt und die Suspension so lange gerührt, bis deren pH-Wert bei 6 lag. Die Festsäure wurde abfiltriert und das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand, welcher beide Isomere (**Iso5 5*R*** und **Iso5 5*S***) enthielt, wurde mittels einer Schwerkraftsäule (Flashsäule, Laufmittelgradient: *n*-Pentan/Ethylacetat [5:1] → [1:1]) aufgereinigt, wodurch die beiden Isomere größtenteils separiert werden konnten.

**Ausbeute:** 5*S*-Isomer: 130 mg (0.46 mmol, 46 %)

5*R*-Isomer: 99 mg (0.35 mmol, 35 %)

Racemat: 51 mg (0.18 mmol, 18 %)

Gesamtausbeute: 280 mg, (0.99 mmol, 99%)

## Experimentalteil

Analytik (Vergl. Lit.<sup>150</sup>):

### Iso4 5S

**Habitus:** farblose Kristalle

**R<sub>f</sub> :** 0.32 (Toluol : Ethylacetat [1:1])

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, d<sup>6</sup>- DMSO)  $\delta$  = 7.43 – 7.23 (m, 5H, 5x -CH(Ar) 8, 9, 10, 11 und 12), 5.17 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, -OH), 5.00 (s, 1H, -OH), 4.80 (d,  $J$  = 3.4 Hz, 1H, -CH 1), 4.75 – 4.40 (m, 4H, -CH<sub>2</sub> 6 und -CH<sub>2</sub> 5), 3.65 – 3.40 (m, 2H, -CH<sub>2</sub> 13), 2.73 (s, 1H), 2.27 (s, 2H, 2x CH 2 und 3) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  127.94 (2x -CH (Ar) 8&12), 127.35 (2x -CH (Ar) 13&15), 127.18 (-CH (Ar) 10), 98.12 (-CH 1), 73.11(-CH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> 13), 68.76 (-CH 2), 68.59 (-CH<sub>2</sub>Ph 6), 67.20 (-CH 3), 59.44 (-CH<sub>2</sub>O 5), 38.13 (-CHCH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> 4), (-CAr 7 wird von der Messmethode nicht erfasst) ppm.

**(DEPT135)**

### Iso4 5R

**Habitus:** hochviskoses, farbloses Öl

**R<sub>f</sub> :** 0.41 (Toluol : Ethylacetat [1:1])

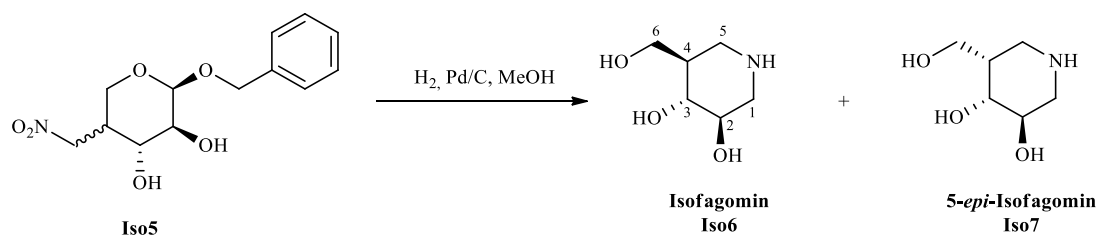
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, d<sup>6</sup>- DMSO)  $\delta$  = 7.47 – 7.16 (m, 5H, 5x -CH(Ar) 8,9,10,11 und 12), 5.34 (d,  $J$  = 4.0 Hz, 1H, -OH), 4.91 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 1H, -OH), 4.73 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H, -CH 1), 4.72 – 4.40 (m, 4H, -CH<sub>2</sub> 6 und -CH<sub>2</sub> 5), 3.82 (ddd,  $J$  = 15.2, 10.0, 3.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> 13+13'), 3.47 – 3.39 (m, 2H, 2x CH 2 und 3), 2.76 – 2.62 (m, 1H, CH 4) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO)  $\delta$  127.92(2x -CH (Ar) 8&12), 127.21(2x -CH (Ar) 13&15), 127.12 (-CH (Ar) 10), 98.64 (-CH 1), 74.12 (-CH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> 13), 72.76 (-CH 2), 68.20 (-CH<sub>2</sub>Ph 6), 67.99 (-CH 3), 59.37 (-CH<sub>2</sub>O 5), 41.58 (-CHCH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> 4), (-CAr 7 wird von der Messmethode nicht erfasst) ppm.

**(DEPT135)**

## Experimentaltteil

### 6.5.1.6 Iso6 Isofagomin (3*R*,4*R*,5*R*)-5-(Hydroxymethyl)piperidine-3,4-diol und Iso7 5-*epi*-Isfagomin (3*R*,4*R*,5*S*)-5-(Hydroxymethyl)piperidine-3,4-diol



#### 1. Umsetzung von Iso5 5*S*-Isomer zu Iso7 5-*epi*-Isfagomin

113 mg (5*S*)-2-(Benzyloxy)-5-(nitromethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4-diol (Iso5 5*S*) (0.39 mmol) wurde in ca. 30 mL absolutem Methanol gelöst und mit 140 mg 10 % Palladium auf Aktivkohle bei 0.25 bar Wasserstoff über 24 h bei Raumtemperatur hydriert. Anschließend wurde die Aktivkohle mit Hilfe eines Faltenfilters und eines Mikrofilters entfernt. Das Methanol wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (feines Kieselgel, Laufmittel: (Ethanol : 25 %iger Ammoniak [10:1]) gereinigt. Die so gewonnen freie Base wurde durch Lösen in 0.1 M Salzsäure und anschließende Lyophilisation in das entsprechende HCl-Salz überführt.

#### 2. Umsetzung von Iso5 5*R*-Isomer zu Iso6 Isfagomin

87 mg (0.31 mmol) (5*R*)-2-(Benzyloxy)-5-(nitromethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4-diol (Iso5 5*R*) wurde in ca. 30 mL absolutem Methanol gelöst. Anschließend wurde 73 mg 10 % Palladium auf Aktivkohle bei 0.25 bar Wasserstoff über 24 h bei Raumtemperatur hydriert. Dann wurde analog zu der obigen Vorschrift „Umsetzung von Iso5 5*S*-Isomer zu Iso7 5-*epi*-Isfagomin“.

#### 3. Umsetzung eines Gemisches aus Iso5 5*R*- und 5*S*-Isomer

57 mg (0.31 mmol) (5*R*)-2-(Benzyloxy)-5-(nitromethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4-diol (Iso5 5*R*+5*S*) wurde in ca. 20 mL absolutem Methanol gelöst. Anschließend wurde 69 mg 10 % Palladium auf Aktivkohle bei 0.25 bar Wasserstoff über 24 h bei Raumtemperatur hydriert. Dann wurde analog zu der obigen Vorschrift „Umsetzung von Iso5 5*S*-Isomer zu Iso7 5-*epi*-Isfagomin“ verfahren.

## Experimentalteil

**Ausbeute:** Isofagomin (HCl-Salz): 43 mg, 0.23 mmol, 75 % (bezogen auf das 5*R*-Isomer), 25% (bezogen auf das gesamt eingesetzte Edukt)

5-*epi*-Isofagomin (HCl-Salz): 32 mg, 0.17 mmol, 44% (bezogen auf das 5*S*-Isomer), 19% (bezogen auf das gesamt eingesetzte Edukt)

Die Gesamtausbeute beträgt 75 mg, (0.41 mmol, 45%) bezogen auf das gesamt eingesetzte Edukt, sowohl 5*R* und 5*S* als auch das Isomergemisch aus beiden.

**Habitus:** jeweils teilkristallines, blassbraunes Harz

**Analytik:**

**Isofagomin (Iso6):**

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  = 3352 (OH/NH-Valenzschwingung), 1737, 1632 (NH-Deformationsschwingung), 1556, 1456 (CH-Deformationsschwingungen), 1433, 1373, 1210, 1137, 1043, 1012, 955, 919, 699, 664 cm<sup>-1</sup> (Vergl. Lit. Werte<sup>[14]</sup>).

**R<sub>f</sub> :** 0.26 (Isopropanol : Wasser : NH<sub>3</sub> konz. [7:2:1])

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  = 1.44 – 1.11 (m, 3H, -CH<sub>2</sub> 6, 6' und -CH 3), 1.07 – 0.84 (m, 3H, -CH<sub>2</sub> 5, -CH<sub>2</sub> und -CH 2), 0.47 (s, 1H -CH 4), 0.40 (m, 2H, -CH<sub>2</sub> 5', -CH<sub>2</sub> 1') ppm (Vergl. Lit. Werte<sup>[21]</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  = 70.89 (C3), 68.03 (C2), 58.95 (C6), 46.44 (C1), 44.71 (C5), 40.27 (C4) ppm (Vergl. Lit. Werte<sup>[21]</sup>) ppm.

**$[\alpha]_{589}^{21}$  :** 13.28° (c = 1.28, MeOH (Vergl. Lit. Wert:  $[\alpha]_{589}^{20}$  : 17.00° (c = 1.6 MeOH)<sup>[4]</sup>).

**MS (ESI)** theoretisch 147.09 g/mol, gef. 148.3 g/mol [M+H]

## Experimentalteil

### 5-*epi*-Isogomin (Iso7):

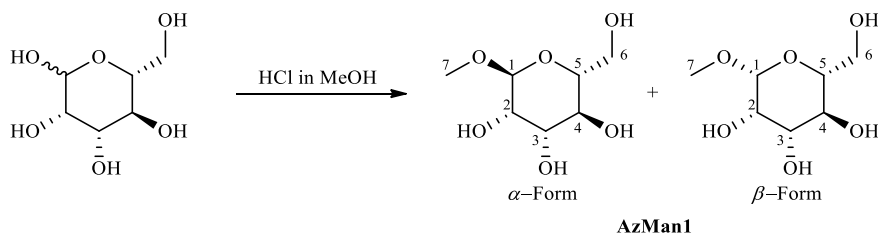
- FT-IR**  $\bar{\nu}$  = 3352 (OH/NH-Valenzschwingung), 1738, 1632 (NH-Deformationsschwingung), 1569, 1556, 1456 (CH-Deformationsschwingungen), 1210, 1136, 1090, 1044, 994, 898, 698  $\text{cm}^{-1}$
- R<sub>f</sub>** : 0.14 (Isopropanol : Wasser : NH<sub>3</sub> konz. [7:2:1])
- <sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  = 1.96 (d,  $J$  = 20.6 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub> 6, 6'), 1.58 (m, 2H, -CH 3 und -CH<sub>2</sub>), 1.21 (m, 3H, CH<sub>2</sub> 1, 1' und -CH<sub>2</sub> 5), 0.93 (t,  $J$  = 12.2 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub> 5'), 0.32 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, -CH 4) ppm (Vergl. Lit. Werte<sup>[3]</sup>).
- <sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  65.00 (2x -CH 2 und 3), 60.18 (-CH 6), 44.23 (-CH<sub>2</sub> 1), 40.62 (-CH<sub>2</sub> 5), 36.20 (-CH 4) ppm (Vergl. Lit. Werte<sup>[3]</sup>).
- $[\alpha]_{589}^{21}$**  : 4.71° (c = 0.42, MeOH).

(Vergl. Lit.<sup>150</sup>).

## Experimentalteil

### 6.5.2 Azamannose

#### 6.5.2.1 AzMan1 $\alpha$ -Monomethylmannose, $\beta$ -Monomethylmannose



26.5 g Mannose (147 mmol) in 250 mL Methanol wurden mit 5 mL konzentrierter HCl versetzt und 1 h refluxiert. Dann wurde die Mischung abgekühlt und mit Natriumcarbonat neutralisiert. Das dabei entstehende NaCl und überschüssiges Natriumcarbonat wurden abgetrennt und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt kann ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt werden. Zu Analysezwecken wurde eine saubere Probe des  $\alpha$ -Anomers durch Kristallisation aus Methanol separiert.

**Ausbeute:** 28.5 g (147 mmol, quant.)

**Habitus:**  $\alpha$ -Anomer: farbloser, kristalliner Feststoff

$\alpha/\beta$ -Mix: blassgelbes Harz

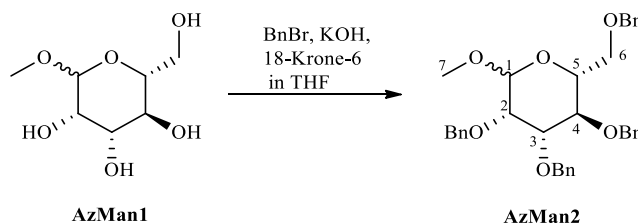
**$^1\text{H-NMR}$ :** (300 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  4.75 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H, H1), 3.94 – 3.85 [(m, 2H), 3.78 – 3.70 (m, 2H), 3.67 – 3.57 (m, 2H)H2-6], 3.40 (s, 3H, 3X H7) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (75 MHz, D2O)  $\delta$  100.81 (C1), 72.50, 70.50, 69.86, 66.72, 60.90 (C6), 54.66 (C7). (Identisch mit einer authentischen Probe von TCI)

[ $\alpha$ -Anomer]

## Experimentalteil

### 6.5.2.2 AzMan2 1-Methyl-2,3,4,6-benzylmannopyranosid



Zu 3.87 g Methylmannose (**AzMan1**, 18.4 mmol, 1 Äq.) in 25 mL THF wurden 7,5 g gepulvertes KOH (132.5 mmol, 1.8 Äq. bez. auf die OH-Gruppen), 240 mg 18-Krone-6-Ether (0.9 mmol, 0.05 Äq.) sowie 10 mL Benzylbromid (14.4 g, 84.2 mmol, 1.1 Äq. bez. auf die OH-Gruppen) zugegeben und das Reaktionsgemisch bei RT über Nacht gerührt. Dann wurde das Lösemittel weitestgehend am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand zwischen Wasser und Diethylether verteilt, die wässrige Phase nochmal mit Ether extrahiert und die gesammelten organischen Phasen mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer entfernt. Der klare, farblose Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Flashsäule, Cyclohexan : Ethylacetat [8:1 → 0:1])

**Ausbeute:** 6.2 g (11.2 mmol, 60 %)

**Habitus:** klares, farbloses Öl

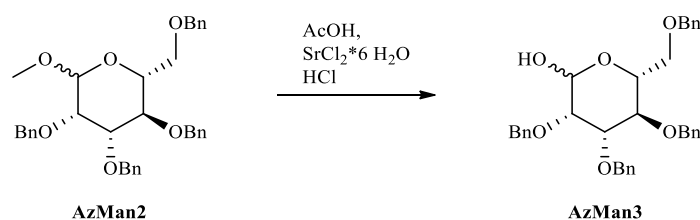
**R<sub>f</sub> :** 0.64 (Cyclohexan : Ethylacetat [4:1])

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-d) δ 7.71 – 7.11 (m, 20H, aromatisch), 5.09 – 4.61 (m, 4 x AB, 8H), 4.93 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 4.13 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 4.04 (dd, J = 9.3, 3.0 Hz, 1H), 3.94 (dd, J = 2.9, 1.8 Hz, 1H), 3.93 – 3.84 (m, 3H), 3.48 (s, 3H) ppm. (Entspricht Lit.<sup>175</sup>)

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 128.34 - 127.38 (aromatische -CH), 98.90 (C1), 80.18, 75.01, 74.87, 74.50, 73.30, 72.52, 72.05, 71.65, 69.26, 54.67 (C7) ppm. (Entspricht Lit.<sup>175</sup>) Sämtliche quarternären Kohlenstoffe werden von dieser Messmethode nicht erfasst.

## Experimentalteil

### 6.5.2.3 AzMan3 2,3,4,6-O-Benzylmannopyranosid



Nach Wei *et al.*<sup>176</sup>

35.8 g **AzMan2** (64.5 mmol, 1 Äq.) in 180 mL Eisessig wurden mit 1.72 g Strontiumchlorid Hexahydrat (6.45 mmol, 0.1 Äq.) sowie 36 ml 5 M HCl (180 mmol HCl, 2.8 Äq.) versetzt und für 2-3 h auf 70 °C erhitzt, bis die RK laut Dünnschichtchromatographie abgeschlossen ist. Dann wurde die Reaktionsmischung in Eiswasser gegossen, mit Dichlormethan extrahiert, mit Wasser gewaschen und mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutral gewaschen. Die organischen Extrakte wurden mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Flashsäule, Laufmittelgradient: Cyclohexan : Ethylacetat [8:1]→[2:1]).

**Ausbeute:** 20 g (37 mmol, 57 %)

**Habitus:** gelbes Harz

**R<sub>f</sub> :** 0.22 (Cyclohexan : Ethylacetat [4:1])

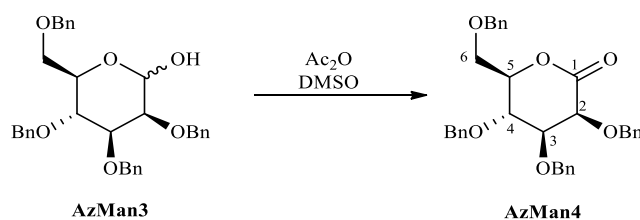
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-d) δ 7.12 – 6.84 (m, 19H), 6.84 – 6.74 (m, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.58 – 4.04 (m, 9H), 3.75 – 3.21 (m, 4H), 3.01 (s, 1H) ppm (Gemisch aus α- und β-Anomer).

**<sup>13</sup>C-NMR:** 13C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 126.90 - 125.92 (aromatische CH), 92.07, 91.15, 81.43, 78.10, 73.57, 73.42, 73.16, 73.02, 72.92, 71.75, 71.07, (DEPT135) 70.55, 69.92, 68.05, 67.43 ppm (Gemisch aus α- und β-Anomer).



## Experimentalteil

### 6.5.2.4 AzMan4 2,3,4,6-*O*-Benzylmannolacton



Nach Rajanikanth *et al.*<sup>154</sup>

20 g **AzMan3** (37 mmol, 1 Äq.) wurden in 100 mL DMSO gelöst und mit 70 mL Acetanhydrid (75.6 g, 740 mmol, 20 Äq.) versetzt und für 2 d bei RT gerührt. Dann wurde unter vermindertem Druck das entstandene Dimethylsulfid entfernt. Die zurückbleibende Lösung wurde im Scheidetrichter mit Wasser versetzt, wobei sich das Rohprodukt als gelbes Öl unten im Scheidetrichter absetzt. Diese Phase wird abgetrennt und das Produkt aus Methanol bei -20 °C kristallisiert.

**Ausbeute:** 18 g (33.4 mmol, 90 %)

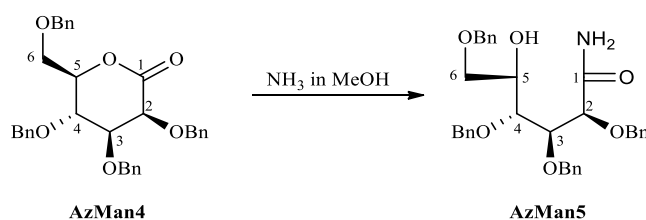
**Habitus:** farblose Kristalle

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.50 – 7.27 (m, 18H, aromatisch), 7.21 – 7.09 (m, 2H, aromatisch), 5.12 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>), 4.89 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>), 4.73 – 4.55 (m, 4H, 2 x PhCH<sub>2</sub>), 4.44 – 4.35 (m, 2H), 4.35 – 4.25 (m, 2H, H2, H5), 4.15 – 4.07 (m, 1H, H3), 3.84 (dd, *J* = 7.1, 1.4 Hz, 1H, H4), 3.69 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, H6, H6') ppm. Entspricht Lit.<sup>153</sup>

**<sup>13</sup>C-NMR:** 13C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.47 (C1), [137.84, 137.82, 137.38, 136.95(4 x Ph(C1)CH<sub>2</sub>-)], 128.63 - 127.89 (aromatisch), 78.74, 76.80, 76.22, 75.63, 73.63, 73.10, 73.08, 72.00, 69.31 ppm.

## Experimentalteil

### 6.5.2.5 AzMan5 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-*D*-mannoamid



Nach Overkleef *et al.*<sup>153</sup>

16.2 g **AzMan4** (30 mmol), wurden in 200 mL 7 M Ammoniak in Methanol (1400 mmol) bei RT gerührt. Dabei fällt das Produkt direkt aus der Reaktionslösung aus. Nach 1 h wurden weitere 300 mL Methanol zugesetzt, um die Rührfähigkeit aufrecht zu erhalten. Der ausgefallene Feststoff kann direkt abgetrennt werden, die restliche Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer entfernt und eine weitere Fraktion des Produkts aus Methanol umkristallisiert.

**Ausbeute:** 15.5 g (27.9 mmol, 93 %)

**Habitus:** Farblose Kristalle

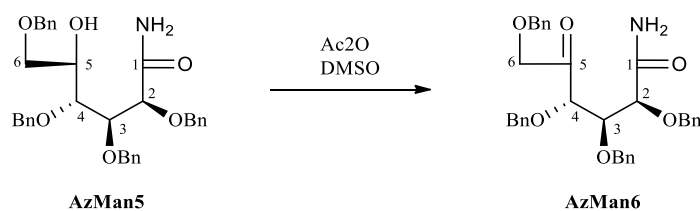
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  7.41 – 7.15 (m, 20H), 6.58 (s, 1H, -NH<sub>2</sub>), 5.57 (s, 1H, -NH<sub>2</sub>), 4.79 – 4.47 (m, 8H), 4.36 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.14 (dd, *J* = 5.6, 3.6 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4.09 – 3.97 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 3.90 (dd, *J* = 7.2, 5.7 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 3.69 – 3.63 (m, 2H, H<sub>6,6'</sub>), 3.22 (s<sub>br</sub>, 1H, -OH) ppm. Entspricht Lit.<sup>153</sup>

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.42 (C<sub>1</sub>), [138.42, 138.28, 138.25, 137.27 (4 x Ph(C<sub>1</sub>)CH<sub>2</sub>-)], 128.68 - 127.77 (aromatisch), 81.44 (C<sub>3</sub>), 80.18 (C<sub>2</sub>), 79.09 (C<sub>4</sub>), [74.81, 74.53, 73.58, 72.93 (4 x PhCH<sub>2</sub>-)], 71.38 (C<sub>6</sub>), 71.10 (H<sub>5</sub>) ppm.

**[ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>21</sup>:** +13.0° (*c* = 1 in Chloroform)

## Experimentalteil

### 6.5.2.6 AzMan6 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-5-dehydro-5-oxo-*D*-mannoamid



24.3 g **AzMan5** (43,8 mmol) in 120 mL trockenem DMSO wurden mit 70 mL Acetanhydrid versetzt und über Nacht unter Argonathmosphäre gerührt. Dann wurde das Produkt durch Zugabe von Wasser ausgefällt, abgetrennt und aus Ethylacetat umkristallisiert. Eine zweite Fraktion war aus der zuvor stark zu reduzierenden Mutterlauge erhältlich.

**Ausbeute:** 20.6 g (37.2 mmol, 85 %)

**Habitus:** farblose Kristalle

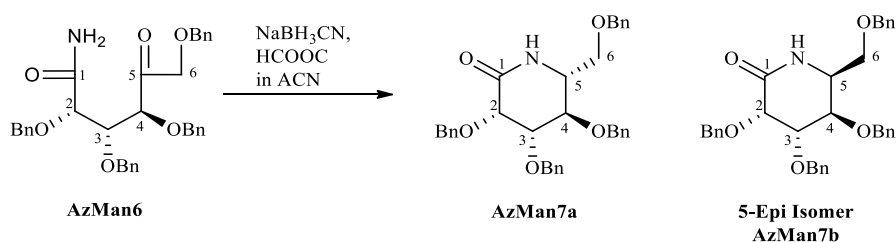
**R<sub>f</sub> :** 0.82 (Petrolether : Ethylacetat [3:1])

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.34 – 7.22 (m, 18H), 7.18 (dd, *J* = 6.7, 2.8 Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 6.10 (s, 1H), 4.66 – 4.41 (m, 8H), 4.32 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 4.24 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H), 4.11 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H) ppm. Entspricht Lit.<sup>153</sup>

**<sup>13</sup>C-NMR:** <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 207.02 (C1), 172.93 (C5), [137.45, 137.33, 137.02, 136.81(4 x Ph(C1)CH<sub>2</sub>-)], 128.58 - 127.93 (aromatisch), [82.01, 80.51, 78.93(C2 - C4)], [74.60, 74.23, 74.10, 73.25, 72.78(4 x PhCH<sub>2</sub>-, C6)] ppm.

## Experimentaltteil

### 6.5.2.7 AzMan7a 2,3,4-Tetra-O-benzyl-D-mannono- $\delta$ -lactam und das entsprechende C5-Epimer AzMan7b



4.4 g **AzMan6** (8 mmol, 1 Äq.) wurden in einer Mischung aus 140 mL und 3.0 g Natriumcyanoborhydrid (48 mmol, 6 Äq.) gelöst und für fünf Minuten gerührt. Dann wurden 40 mL Ameisensäure hinzugefügt und die Reaktionsmischung für 1 h refluxiert. Dann wurde die Reaktion abgekühlt und mit 0.1 M HCl versetzt bis sich Schlieren bildeten (ca. 25 mL). Die Reaktionsmischung wurde zwischen 125 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 125 mL Ethylacetat verteilt. Die organische Phase wurde solange mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, bis diese neutral reagierte. Dann wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und die beiden Epimere voneinander getrennt (Flashsäule, Cyclohexan : Ethylacetat [3:1]).

**Ausbeute:** insgesamt: 3.87 g (7.2 mmol, 90 %)

---

5-Epi-Isomer: 1.18 g (2.2 mmol, 27%)

(AzMan7b)

AzMan7a: 2.25 g (4.2 mmol, 53%)

Mischung: 0.44 g (0.8 mmol, 10%)

**Habitus:** blassgelbes Harz

**R<sub>f</sub> :** AzMan7b 0.89 (Cyclohexan : Ethylacetat [1:1])

AzMan7a: 0.47 (Cyclohexan : Ethylacetat [1:1])

## Experimentalteil

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  7.42 – 7.39 (m, 2H, aromatisch), 7.39 – 7.27 (m, 16H, aromatisch), 7.01 (dd, J = 7.5, 1.8 Hz, 2H, aromatisch), 5.97 (s, 1H, =NH), 5.15 (d, J = 12.4 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>-), 4.89 (d, J = 12.1 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>-), 4.74 (d, J = 12.4 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>-), 4.62 (d, J = 12.1 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>-), 4.51 (d, J = 11.8 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>-), 4.47 (d, J = 11.7 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>-), 4.30 – 4.19 (m, 3H, H2, PhCH<sub>2</sub>-), 4.00 (dt, J = 8.4, 3.7 Hz, 1H, H5), 3.97 (dd, J = 4.6, 2.9 Hz, 1H, H3), 3.67 – 3.62 (m, 1H, H4), 3.55 (dd, J = 9.2, 9.2 Hz, 1H, H6), 3.45 (dd, J = 9.1, 4.2 Hz, 1H, H6') ppm.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  7.46 (d, J = 7.3 Hz, 2H, aromatisch), 7.41 – 7.29 (m, 16H, aromatisch), 7.19 (dd, J = 7.0, 2.3 Hz, 2H, aromatisch), 6.26 (s, 1H, =NH), 5.08 (d, J = 12.2 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>-), 4.77 (d, J = 12.2 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>-), 4.73 (d, J = 12.2 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>-), 4.63 (d, J = 12.1 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>-), 4.59 (d, J = 11.5 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>-), 4.53 – 4.46 (m, 2H, 2 x PhCH<sub>2</sub>-), 4.43 (d, J = 11.5 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>-), 4.21 (d, J = 3.0 Hz, 1H, H2), 3.98 (dd, J = 5.3, 3.0 Hz, 1H, H3), 3.71 (dd, J = 5.2, 5.2 Hz, 1H, H4), 3.63 – 3.54 (m, 2H, H5, H6), 3.48 – 3.42 (m, 1H, H6') ppm.

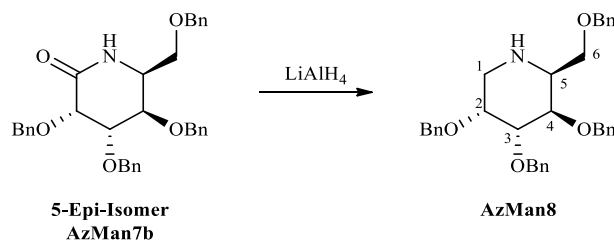
**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171.38 (C1), [138.28, 138.18, 137.56, 136.97 (4 x Ph(C1)CH<sub>2</sub>-)], [128.57, 128.56, 128.48, 128.45, 128.22, 127.99, 127.97, 127.95, 127.85, 127.84 (aromatisch)], 74.95 (C3), 74.12 (C2), 74.08 (PhCH<sub>2</sub>-), 73.66 (C4), 73.56 (2 x PhCH<sub>2</sub>-), 72.43 (PhCH<sub>2</sub>-), 70.22 (C6), 52.73 (C5) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  169.70 (C1), [137.98, 137.90, 137.44, 137.40 (4 x Ph(C1)CH<sub>2</sub>-)], [128.52, 128.48, 128.40, 128.38, 128.09, 128.00, 127.94, 127.91, 127.84, 127.79, 127.75 (aromatisch)], 77.64 (C3), 74.86 (C2), 74.80 (C4), 73.26 (PhCH<sub>2</sub>-), 73.13 (PhCH<sub>2</sub>-), 72.67 (2 x PhCH<sub>2</sub>-), 71.14 (C6), 55.32 (C5) ppm.

Die NMR-Daten entsprechen der Literatur<sup>153</sup>

## Experimentalteil

### 6.5.2.8 AzMan8 2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-L-1-Deoxygulonojirmicin



420 mg **AzMan7b 5-Epi-Isomer** (0.8 mmol, 1 Äq.) in 5 mL THF wurden bei 0 °C langsam mit 200 mg LiAlH<sub>4</sub> (5.3 mmol, 6.6 Äq.) versetzt und dann für 2.5 h refluxiert. Nach Abkühlen auf 0 °C wurde vorsichtig mit Wasser gequencht, mit Ethylacetat aufgegossen und solange mit verdünnter HCl versetzt, bis sämtliches zuvor gebildetes Aluminiumhydroxid gelöst war. Dann wurde die organische Phase abgetrennt, die wässrige mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen getrocknet und am Rotationsverdampfer entfernt. Dabei wurde das Produkt sauber erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

**Ausbeute:** 322 mg (0.61 mmol, 75 %)

**Habitus:** farbloses Öl

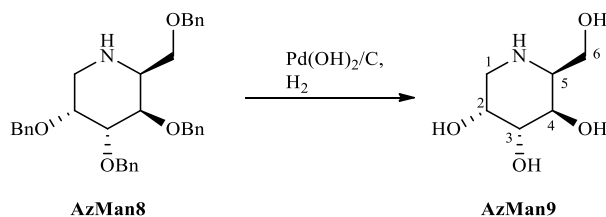
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-d) δ 7.48 – 7.28 (m, 18H, aromatisch), 7.26 – 7.15 (m, 2H, aromatisch), 4.80 (d, J = 12.2 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>-), 4.74 – 4.37 (m, 7H, 7 x PhCH<sub>2</sub>-), [3.90 – 3.86 (m, 1H), 3.83 (td, J = 7.8, 2.5 Hz, 1H), 3.62 (dd, J = 3.8, 1.5 Hz, 1H) (H<sub>2</sub>-4)], 3.56 (dd, J = 9.3, 1.1 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 3.44 (dd, J = 8.9, 6.3 Hz, 1H, H<sub>6</sub>'), 3.40 – 3.29 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 3.09 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2.60 (s, 1H, =NH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [138.84, 138.73, 138.27, 138.21 (4 x Ph(C1)CH<sub>2</sub>-)], 128.56 - 127.59 (aromatisch), [75.48, 75.05, 73.25 (C<sub>2</sub>-4)], 73.41 (PhCH<sub>2</sub>-), 72.95 (PhCH<sub>2</sub>-), 72.74 (PhCH<sub>2</sub>-), 71.02 (PhCH<sub>2</sub>-), 70.50 (C<sub>6</sub>), 53.63 (C<sub>5</sub>), 44.32 (C<sub>1</sub>) ppm.

Die NMR-Daten entsprechen der Literatur <sup>177</sup>

## Experimentalteil

### 6.5.2.9 AzMan9 L-1-Deoxygulonojirmicin



1.16 g (2.2 mol) **AzMan8** wurden in 45 mL Methanol dispergiert und mit 150 mg 20%igem Pd(OH)<sub>2</sub> auf Aktivkohle versetzt, mit 2 M HCl angesäuert und für 48h bei RT unter 20 bar Wasserstoffatmosphäre hydriert. Dann wurde die Aktivkohle über Celite abfiltriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

**Ausbeute:** 317 mg (1.8 mmol, 82 %)

**Habitus:** blassgelbes Öl

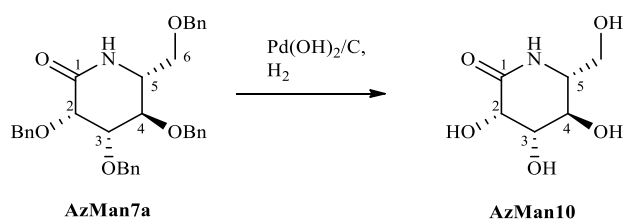
**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Methanol-d<sub>4</sub>) δ 4.20 (ddd, J = 11.0, 5.1, 2.2 Hz, 1H), 4.04 – 3.92 (m, 2H), 3.86 – 3.77 (m, 2H, H<sub>6</sub>, H<sub>6'</sub>), 3.46 (t, J = 6.7 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 3.42 – 3.30 (m, 1H), 3.21 – 2.99 (m, 2H, H<sub>1</sub>, H<sub>1'</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD) δ [70.33, 68.71, 63.93 (C<sub>2-4</sub>), 60.60 (C<sub>6</sub>), 57.08 (C<sub>5</sub>), 44.09 (C<sub>1</sub>) ppm.

Vgl. Lit.<sup>178</sup>

## Experimentaltteil

### 6.5.2.10 AzMan10 *D*-Manno- $\delta$ -lactam



1.06 g (1.1 mol) **AzMan7a** wurden in 45 mL Methanol dispergiert und mit 150 mg 20%igem Pd(OH)<sub>2</sub> auf Aktivkohle versetzt, mit 2 M HCl angesäuert und für 48 h bei RT unter 20 bar Wasserstoffatmosphäre hydriert. Dann wurde die Aktivkohle über Celite abfiltriert, das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand aus Methanol/Isopropanol umkristallisiert.

**Ausbeute:** 100 mg (0.6 mmol, 55 %)

**Habitus:** farblose Kristalle

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  6.83 (s, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.62 (s, 1H), 4.02 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 3.95 – 3.89 (m, 1H), 3.85 (s, 1H), 3.47 (dd, J = 18.6, 7.2 Hz, 3H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  172.90 (C1), [70.89, 67.00, 66.82 (C2-4)], 60.50 (C6), 54.35 (C5) ppm.

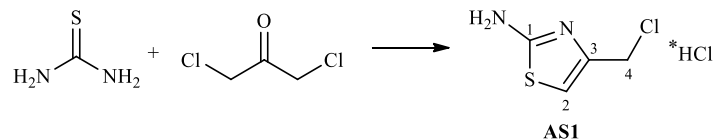
Vgl. Lit.<sup>179</sup>



## Experimentalteil

### 6.6 Potentielle allosterische Inhibitoren

#### 6.6.1 AS1: 4-(Chloromethyl)thiazol-2-amin Hydrochlorid



Nach WO2009015193 (A1) — 2009-01-29<sup>180</sup>

5.9 g 1,3-Dichloroacetone (46.44 mmol, 1 Äq) und 3.55 g Thiourea (46.44 mmol, 1 Äq) wurden in 60 mL Isopropanol bei 40 °C gerührt, bis eine klare Lösung entstand. Dann wurde die Reaktionslösung in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann langsam aufgetaut, wobei das Produkt kristallisierte.

**Ausbeute:** 7.7 g (41.6 mmol, 89.6 %)

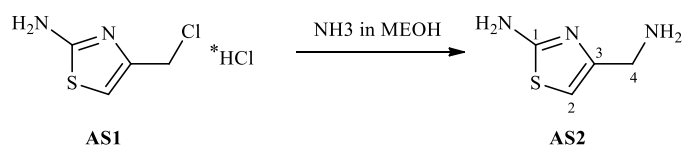
**Habitus:** weißer, feinkristalliner Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  6.88 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H, H2), 4.59 (s(br), 2H, 2xH4) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  170.65 (C1), 135.21 (C3), 107.05 (C2), 36.40 (C4) ppm.

## Experimentalteil

### 6.6.2 AS2: 4-(Aminomethyl)thiazol-2-amin



Nach *P. Cheuka et al.*<sup>181</sup>

9.4 g **AS 1** (50.8 mmol) wurden in 100 ml 7 M methanolischer Ammoniaklösung für 3 d im verschlossenen Kolben bei RT gerührt. Der dabei ausgefallenen Feststoff (Ammoniumchlorid) wurde abgetrennt und die verbleibende gelbe Lösung am Rotationsverdampfer evaporiert. Der verbleibende Rückstand hat eine ausreichende Reinheit (ca. 80 % lt.  $^1\text{H-NMR}$ -Integrationsverhältnissen), um weiter umgesetzt zu werden.

**Ausbeute:** quantitativ

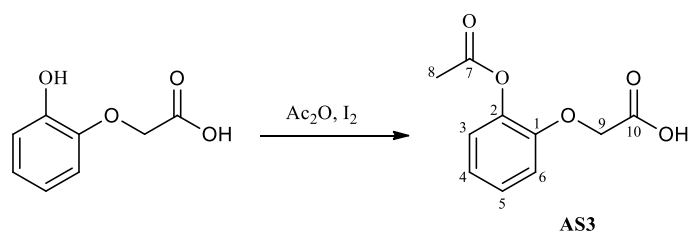
**Habitus:** okkerfarbener Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ : (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  6.63 (s, 1H, H2), 3.79 (s(br), 2H, 2x H4) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ : (75 MHz, DMSO)  $\delta$  169.17 (C1), 144.31 (C3), 104.82 (C2), 38.51 (C4) ppm.

## Experimentalteil

### 6.6.3 AS3: 2-(2-Acetoxyphenoxy)essigsäure



510 mg Hydroxyphenoxyessigsäure (3.0 mmol) wurden in 2 g Acetanhydrid (19.6 mmol, 3.3 Äq) mit ca. 100 mg Iod versetzt und 15 min bei RT gerührt. Dann wurde so viel wässrige Natriumthiosulfatlösung zugesetzt, bis die Lösung entfärbt war. Im Anschluss wurden 20 mL Wasser sowie 0.5 mL konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt, was zu einer starken Wärmeentwicklung führte. Nach wenigen Minuten klärte sich die Lösung auf und formte eine homogene Lösung. Diese wurde zur vollständigen Hydrolyse der Anhydridkomponentent über Nacht bei RT gerührt. Die sich bis dahin gebildete Suspension wurde filtriert und das Filtrat zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zu einem gelben Öl konzentriert. Aus diesem wurde das Produkt mit Pentan im Ultraschallbad trituriert und der so ausgefallenen Feststoff nochmals mit Pentan gewaschen.

**Ausbeute:** 476 mg (2.26 mmol, 75 %)

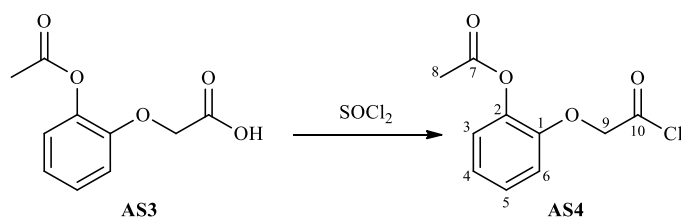
**Habitus:** weißer Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Chloroform-d) δ 9.80 (s, 1H, -OH), [7.21 (ddd, J = 8.1, 7.2, 2.0 Hz, 1H), 7.13 – 7.00 (m, 2H), 6.92 (dd, J = 8.2, 1.1 Hz, 1H) H3, H4, H5, H6], 4.70 (s, 2H, 2x H9), 2.35 (s, 3H, 3x H8) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.60, 169.77 (C7, C10), 148.94 (C1), 140.21 (C2), 127.23, 123.30, 122.85, 113.83 (C3, C4, C5, C6), 65.69 (C9), 20.87 (C8) ppm.

## Experimentalteil

### 6.6.4 AS4: 2-(2-Acetoxyphenoxy)essigsäurechlorid



615 mg **AS3** (2.9 mmol, 1 Äq.) wurden in 15 ml Thionylchlorid mit 4 Tropfen DMF versetzt und 4 h refluxiert. Die entstandene gelbe Lösung wurde destilliert, um Thionylchlorid zu entfernen. Dazu wurden zwei Mal 50 mL Ethylacetat aufgegossen und jeweils bei 40 °C und 10 mbar so weit wie möglich eingengt. Das so entstandene gelbe Öl wurde direkt weiter umgesetzt.

**Ausbeute:** quantitativ

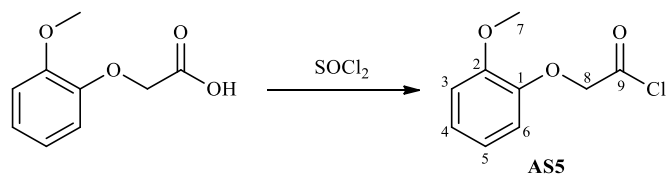
**Habitus:** gelbes Öl

**<sup>1</sup>H-NMR:** 1H (300 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  [7.21 (ddd,  $J = 8.2, 6.2, 3.0$  Hz, 1H), 7.12 – 7.03 (m, 2H), 6.92 – 6.88 (m, 1H) H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>], 4.93 (s, 2H, 2x H<sub>9</sub>), 2.33 (s, 3H, 3x H<sub>8</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** 13C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  169.81, 169.07 (C<sub>7</sub>, C<sub>10</sub>), 148.85 (C<sub>1</sub>), 140.55 (C<sub>2</sub>), 127.04, 123.65, 123.53, 115.00 (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>), 73.60 (C<sub>9</sub>), 20.72 (C<sub>8</sub>) ppm.

## Experimentalteil

### 6.6.5 AS5: 2-(2-Methoxyphenoxy)essigsäurechlorid



350 mg 2-(2-Methoxyphenoxy)essigsäure (1.9 mmol, 1 Äq.) wurden in 10 ml Thionylchlorid mit 2 Tropfen DMF versetzt und 3 h refluxiert. Die entstandene gelbe Lösung wurde destilliert, um Thionylchlorid zu entfernen. Dazu wurden zwei Mal 50 mL Ethylacetat aufgegossen und jeweils bei 40 °C und 10 mbar so weit wie möglich eingengt. Das so entstandene gelbe Öl wurde direkt weiter umgesetzt.

**Ausbeute:** quantitativ

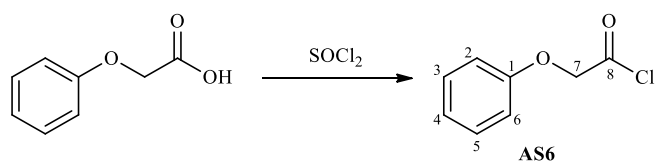
**Habitus:** gelbes Öl

**<sup>1</sup>H-NMR:** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  [7.09 – 6.99 (m, 1H), 6.97 – 6.80 (m, 3H) H3, H4, H5, H6], 4.99 (s, 2H, 2x H8), 3.88 (s, 3H, 3x H7) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.47 (C9), 150.04, 146.37 (C1, C2), 124.17, 121.05, 117.04, 112.66 (C3, C4, C5, C6), 74.50 (C8), 56.00 (C7) ppm.

## Experimentalteil

### 6.6.6 AS6: 2-Phenoxyessigsäurechlorid



2.5 g 2-Phenoxyessigsäure (16.4 mmol, 1 Äq) wurden in 15 ml Thionylchlorid mit 4 Tropfen DMF versetzt und 5 h refluxiert. Die entstandene gelbe Lösung wurde destilliert, um Thionylchlorid zu entfernen. Dazu wurden zwei Mal 50 mL Ethylacetat aufgegossen und jeweils bei 40 °C und 10 mbar so weit wie möglich eingengt. Das so entstandene gelbe Öl wurde direkt weiter umgesetzt.

**Ausbeute:** quantitativ

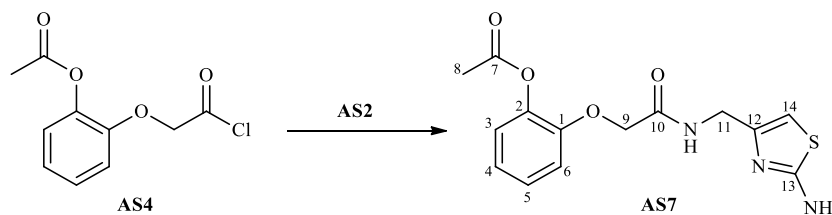
**Habitus:** gelbes Öl

**<sup>1</sup>H-NMR:** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 7.34 (ddd, *J* = 7.5, 6.3, 2.1 Hz, 2H, H3, H5), 7.13 – 7.02 (m, 1H, H4), 6.96 – 6.85 (m, 2H, H2, H6), 4.94 (s, 2H, H7) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.33 (C8), 156.93 (C1), 129.83 (C3, C5), 122.73 (C4), 114.87 (C2, C6), 72.61 (C7) ppm.

## Experimentaltteil

### 6.6.7 AS7: 2-(2-(((2-Aminothiazol-4-yl)methyl)amino)-2-oxoethoxy)phenyllessigsäure



Zu einer Lösung aus 600 mg ca. 80 %igem **AS2** (enthält ca. 480 mg, 3.6 mmol, 1.2 Äq.) und 210 mg KOH (3.8 mmol, 1.3 Äq) in 12 mL Wasser und 15 mL Acetonitril wurde unter Eiskühlung langsam eine Lösung aus **AS4** (663 mg, 2.9 mmol, 1 Äq. in 10 mL Acetonitril) zugetropft, gefolgt von einer Lösung aus 480 mg Natriumhydrogencarbonat (5.7 mmol, 2 Äq) in 7 ml Wasser. Dann wurde die Reaktionsmischung für 3 d bei RT gerührt und dann zwischen 100 mL Wasser und 100 mL Ethylacetat verteilt. Die wässrige Phase wurde nochmals mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt

(Flashhülle, Laufmittelgradient: Cyclohexan/Ethylacetat [1:1] → [0:1])

**Ausbeute:** 230 mg (0.7 mmol, 20 %)

**Habitus:** farbloser Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 760, 807, 838, 915, 939, 958, 1014, 1053, 1089, 1116, 1181, 1215, 1267, 1294, 1306, 1327, 1367, 1439, 1461, 1503, 1520, 1544, 1596, 1606, 1631, 1670, 1758, 2851, 2879, 2926, 3024, 3139, 3282, 3374, 3438.

**R<sub>f</sub> :** 0.21 (reines Ethylacetat)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Acetonitrile-d<sub>3</sub>)  $\delta$  7.28 (s(br), 1H, -**NH**), [7.27 – 7.19 (m, 1H), 7.14 – 6.94 (m, 3H) H3, H4, H5, H6], 6.15 (s, 1H, H14), 6.10 (s(br), 2H, -**NH<sub>2</sub>**), 4.53 (s, 2H, 2x H9), 4.20 (d, J = 5.9 Hz, 2H, 2x H11), 2.25 (s, 3H, 3x H8) ppm.

## Experimentaltteil

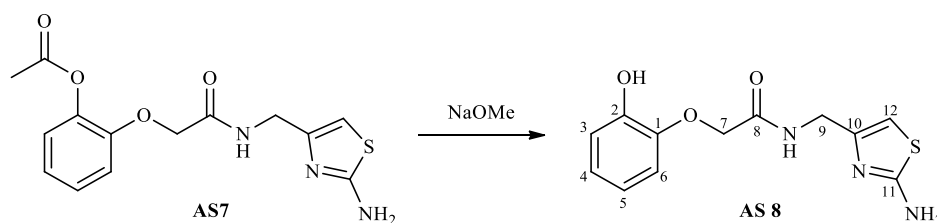
**<sup>13</sup>C-NMR:** 13C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 170.16, 169.95 (C7, C10), 168.27 (C13), 150.22 (C12), 149.44, 140.82 (C1, C2), 127.91, 124.01, 122.85, 115.07 (C3, C4, C5, C6), 103.06 (C14), 68.55 (C9), 39.80 (C11), 20.94 (C8).ppm.

**HPLC-MS** theoretisch 321.08 g/mol, gef. 322.1 g/mol [M+H]

**(ESI)**

92.11 % + 7.89 % deacetylierte Verbindung (Hydrolyse auf der Säule)

### 6.6.8 AS8 (ChBr7): *N*-((2-Aminothiazol-4-yl)methyl)-2-(2-hydroxyphenoxy)acetamid



104 mg AS7 (0.32 mmol, 1 Äq.) wurden in 15 ml abs. Methanol mit 300 mg Natriummethanolat (5.55 mmol, 20 Äq.) eine Stunde lang bei RT gerührt. Dann wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand dreimal mit jeweils 10 ml siedendem Acetonitril extrahiert. Die gesammelten Extrakte wurden unter vermindertem Druck verdampft und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Flashäule, Laufmittelgradient: Cyclohexan/Ethylacetat [1:1] → [0:1]).

**Ausbeute:** 78 mg (0.28 mmol, 86 %)

**Habitus:** blassgelbe Kristalle

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 670, 738, 798, 854, 917, 977, 1028, 1038, 1065, 1087, 1117, 1162, 1207, 1258, 1325, 1371, 1424, 1435, 1468, 1503, 1521, 1548, 1559, 1597, 1608, 1633, 1646, 2281, 2606, 2736, 2956, 3099, 3290, 3347.

**R<sub>f</sub> :** 0.17 (reines Ethylacetat)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN/CD<sub>3</sub>OD/DMSO) δ [7.02 – 6.67 (m, 4H) H3, 4, 5, 6], 6.26 (s, 1H, H12), 4.49 (s, 2H, 2x H7), 4.24 (s(br), 2H, 2x H9) ppm.



## Experimentalteil

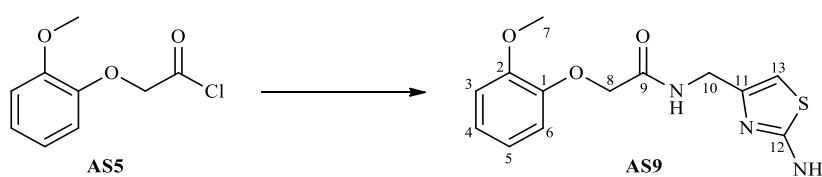
**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CD<sub>3</sub>CN/CD<sub>3</sub>OD/DMSO)  $\delta$  169.71 (C8), 168.88 (C11), 149.59 (C10), 147.08 (C2), 146.23 (C1), 123.05, 120.25, 116.78, 114.37 (C3, C4, C5, C6), 103.11 (C12), 68.54 (C7), 39.26 (C9) ppm.

**HPLC-MS** theoretisch 279.31 g/mol, gef. 322.1 g/mol [M+H]

**(ESI)**

Reinheit: 99.09 %

### 6.6.9 AS9: *N*-((2-Aminothiazol-4-yl)methyl)-2-(2-methoxyphenoxy)acetamid



Zu einer Lösung aus 500 mg ca. 80 %igem **AS2** (enthält 2.9 mmol, 1.1 Äq.) und 160 mg KOH (2.9 mmol, 1.1 Äq.) in 8 ml H<sub>2</sub>O und 10 ml ACN wurde tropfenweise eine Lösung aus 542 mg (2.7 mmol, 1 Äq.) **AS5** in wenigen ml ACN unter Eiskühlung bei 0 °C zugetropft, gefolgt von einer Lösung aus 230 mg Natriumhydrogencarbonat (2.7 mmol, 1 Äq.) in 5 ml Wasser. Dann wurde die Reaktionsmischung bei RT über Nacht gerührt. Im Anschluss wurde die Lösemittelmischung vollständig am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit siedendem Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden wiederum am Rotationsverdampfer eingetrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch weiter aufgereinigt (Flashsäule, Laufmittelgradient: Cyclohexan/Ethylacetat [1:1] → [0:1]). Das Produkt wurde letztendlich aus Acetonitril/Diisopropylether kristallisiert.

**Ausbeute:** 160 mg (0.55 mmol, 20 %)

**Habitus:** gelber, kristalliner Feststoff

**FT-IR**  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 705, 740, 780, 841, 891, 915, 972, 1020, 1049, 1104, 1122, 1185, 1223, 1244, 1259, 1295, 1325, 1337, 1381, 1422, 1441, 1462, 1506, 1531, 1550, 1588, 1619, 1652, 2723, 2845, 2908, 2952, 3110, 3325, 3459.

**R<sub>f</sub> :** 0.16 (reines Ethylacetat)

## Experimentalteil

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, Acetonitrile-d<sub>3</sub>) δ 7.57 (t, J = 5.8 Hz, 1H, NH), 7.00 – 6.94 (m, 3H, H3.5,6), 6.88 (ddd, J = 8.4, 6.2, 2.4 Hz, 1H, H4), 6.24 (s(br), 1H, H13), 6.01 (s(br), 2H, NH<sub>2</sub>), 4.50 (s, 2H, 2x H8), 4.25 (d, J = 5.8 Hz, 2H, 2x H10), 3.77 (s, 3H, 3x H7).ppm.

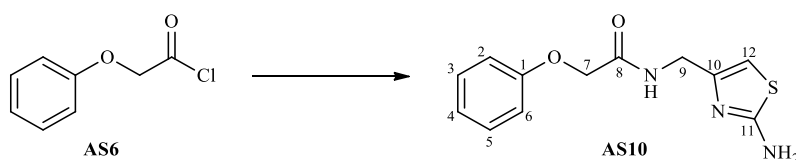
**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 170.04 (C9), 169.36 (C12), 150.82 (C2), 149.81 (C11), 148.38 (C1), 123.90 (C6), 121.89 (C4), 116.73 (C3), 113.28 (C5), 104.01 (C13), 70.35 (C8), 56.39 (C7), 39.89 (C10) ppm.

**HPLC-MS** theoretisch 293.08 g/mol, gef. 294.1 g/mol [M+H]

**(ESI)**

Reinheit: 98.47 %

### 6.6.10 AS10: *N*-((2-Aminothiazol-4-yl)methyl)-2-phenoxyacetamid



Zu einer Lösung aus 1.26 g ca. 80 %igem **AS2** (enthält 7.8 mmol, 0.6 Äq.) und 580 mg KOH (10.3 mmol, 0.9 Äq.) in 12 ml H<sub>2</sub>O und 15 ml ACN wurde tropfenweise eine Lösung aus 2.0 g (11.7 mmol, 1 Äq.) **AS6** in 30 ml ACN unter Eiskühlung bei 0 °C zugetropft, gefolgt von einer Lösung aus 1.5 g Natriumhydrogencarbonat (17.9 mmol, 1.5 Äq.) in 24 ml Wasser. Dann wurde die Reaktionsmischung bei RT über 2 d gerührt. Im Anschluss wurde die Lösemittelmischung vollständig am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Flashsäule, Laufmittelgradient: Cyclohexan/Ethylacetat [1:1] → [0:1]). Das so erhaltene gelbe Öl wird durch Aufschlänmen in Chloroform, langsames Einengen und Reiben mit einem Spatel zur Kristallisation gebracht.

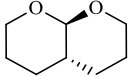
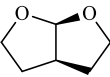
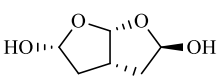
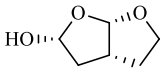
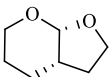
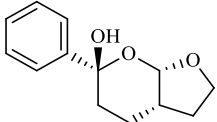
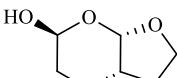
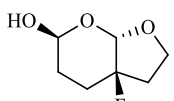
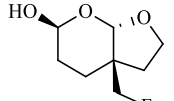
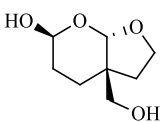
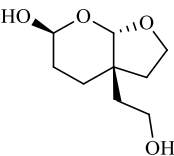
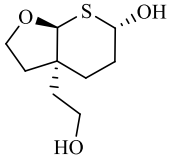
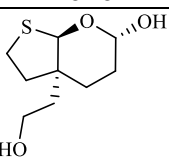
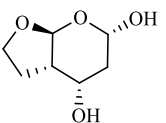
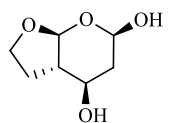
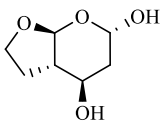
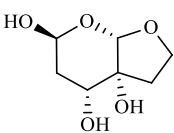
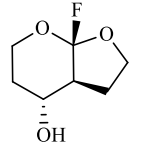
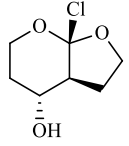
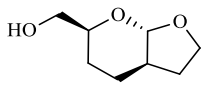
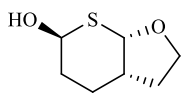
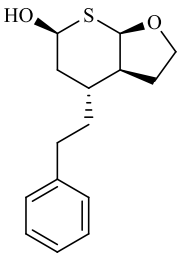
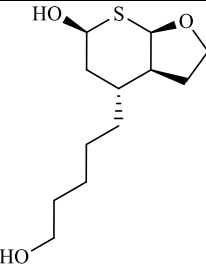
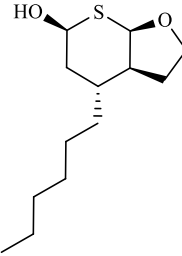
## Experimentalteil

<b>Ausbeute:</b>	443 mg (1.7 mmol, 21 %)
<b>Habitus:</b>	schwach gelber Feststoff
<b>FT-IR</b>	$\bar{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 687, 723, 756, 827, 842, 887, 950, 973, 993, 1016, 1059, 1084, 1118, 1139, 1154, 1175, 1227, 1292, 1306, 1333, 1352, 1373, 1438, 1492, 1527, 1599, 1644, 1664, 2765, 3100, 3286, 3432.
<b>R<sub>f</sub> :</b>	0.24 (reines Ethylacetat)
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(300 MHz, Acetonitrile-d <sub>3</sub> ) $\delta$ 7.94 (s, 1H, <u>NH</u> ), 7.38 – 7.29 (m, 2H, H3&5), 7.07 – 6.90 (m, 3H, H2&6, H4), 6.50 (s, 2H, <u>NH<sub>2</sub></u> ), 6.19 (s, 1H, H12), 4.54 (s, 2H, 2x H7), 4.23 (d, J = 5.9 Hz, 2H, 2x H9) ppm.
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(75 MHz, CD <sub>3</sub> CN) $\delta$ 168.91 (C8), 167.83 (C11), 157.82 (C1), 149.34 (C10), 129.60 (C3&5), 121.45 (C4), 114.78 (C2&6), 101.82 (C12), 67.08 (C7), 38.97 (C9) ppm.
<b>HPLC-MS (ESI)</b>	theoretisch 263.07 g/mol, gef. 264.0 g/mol [M+H] Reinheit: 99.04 %

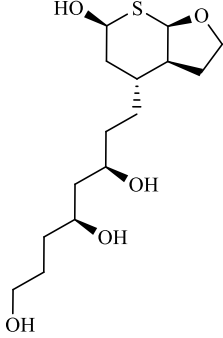
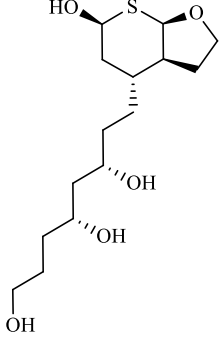
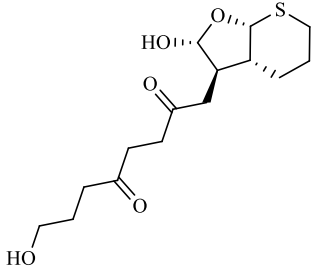
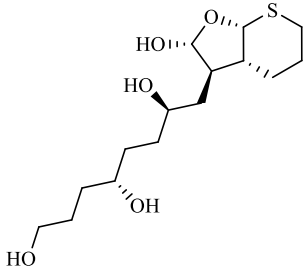
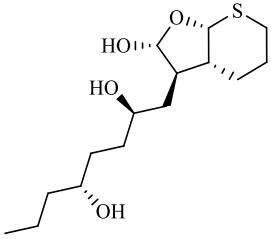
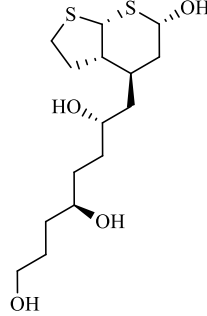
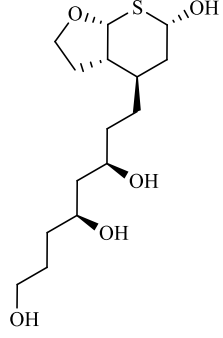
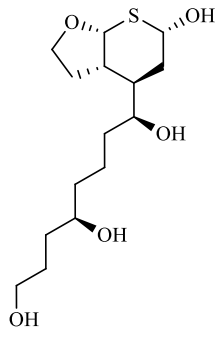
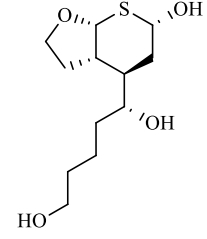
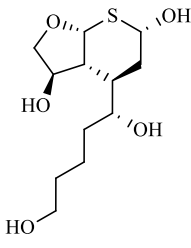
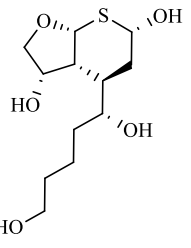
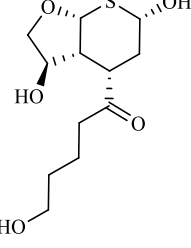
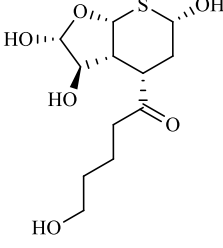
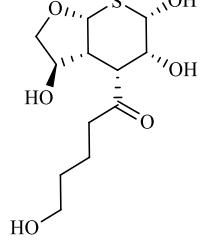
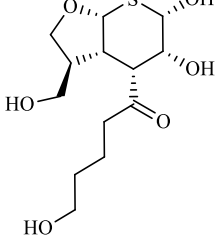
## 7 Anhang

### 7.1 Strukturen im Designprozess zu L039

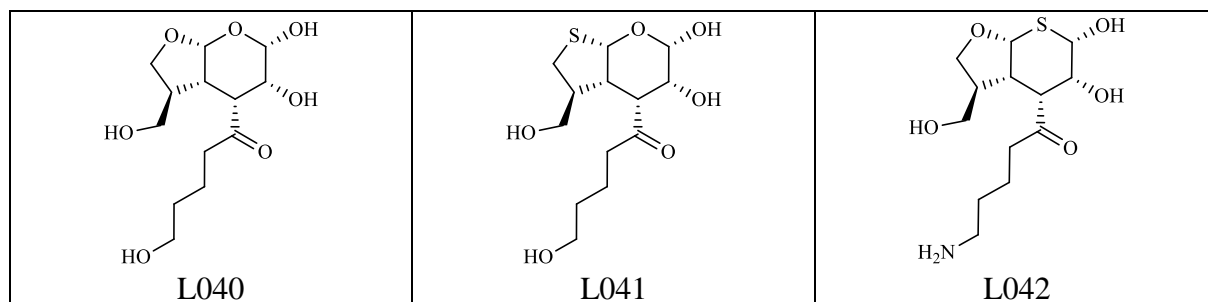
Tabelle 12: Alle Strukturen des Designprozesses von L039

 L001	 L002	 L003
 L004	 L005	 L006
 L007	 L008	 L009
 L010	 L011	 L012
 L013	 L014	 L015
 L016	 L017	 L018
 L019	 L020	 L021
 L022	 L023	 L024

# Anhang

 <p>L025</p>	 <p>L026</p>	 <p>L027</p>
 <p>L028</p>	 <p>L029</p>	 <p>L030</p>
 <p>L031</p>	 <p>L032</p>	 <p>L033</p>
 <p>L034</p>	 <p>L035</p>	 <p>L036</p>
 <p>L037</p>	 <p>L038</p>	 <p>L039</p>

## Anhang



## 7.2 Amin-Reste für die Dockingstudie mit monocyclischen *N,O*-Acetalen

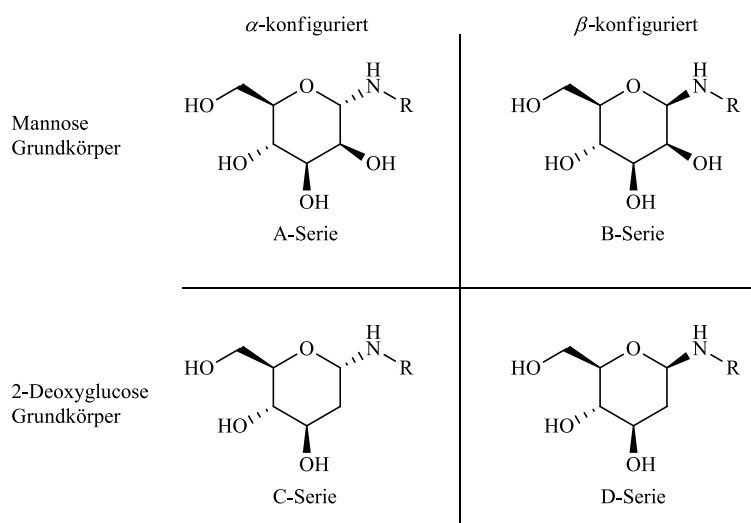
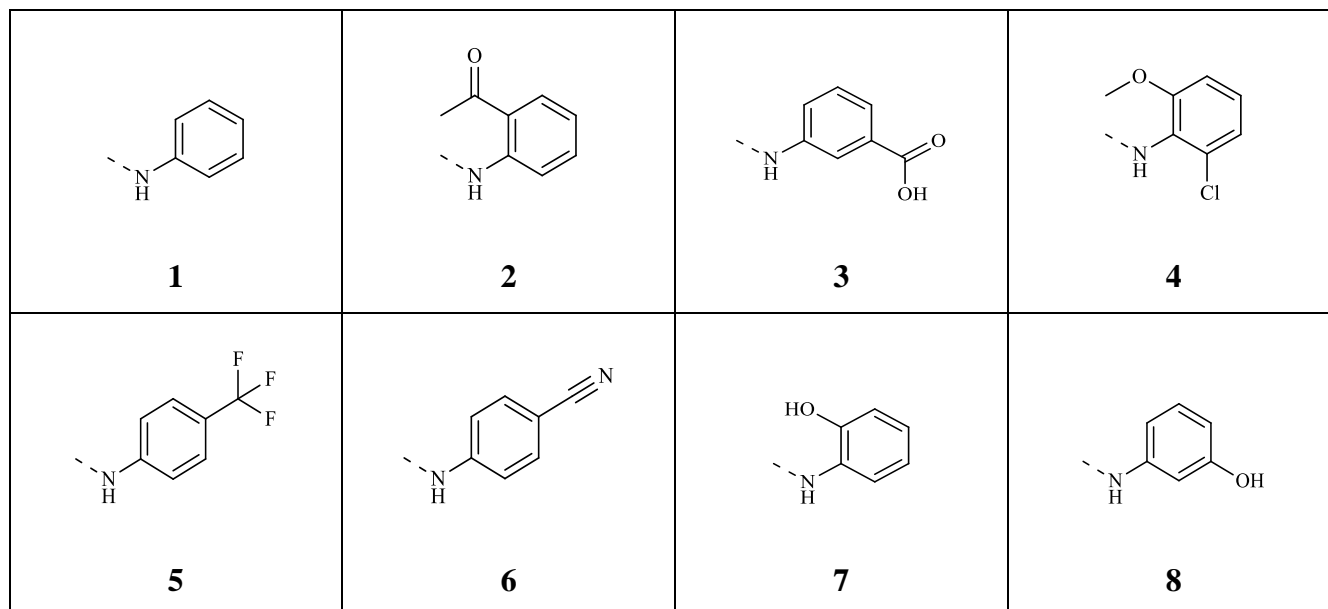
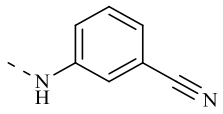
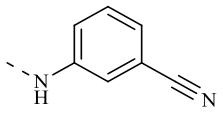
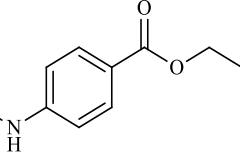
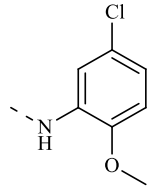
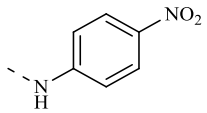
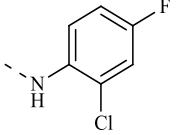
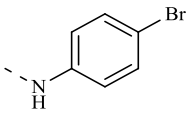
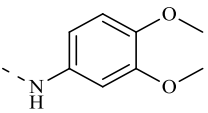
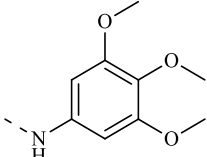
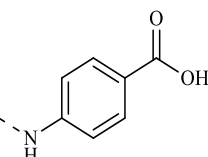
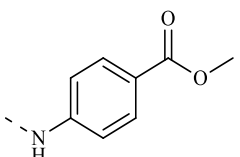
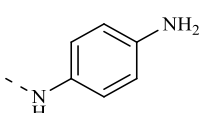
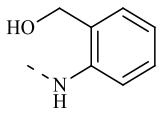
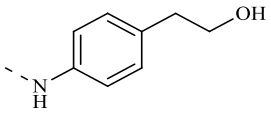
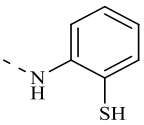
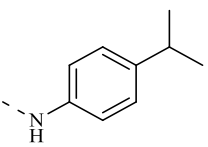
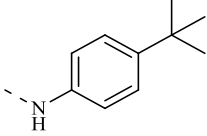
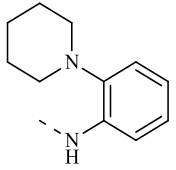
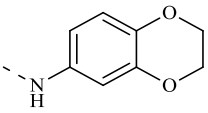
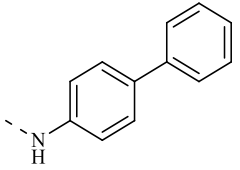
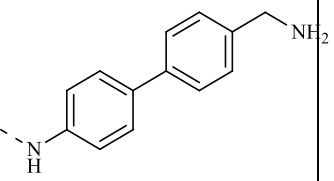
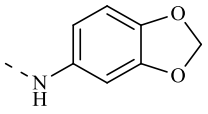
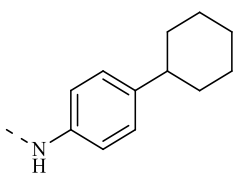
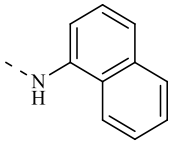


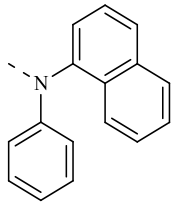
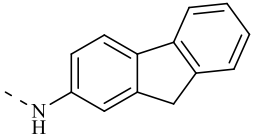
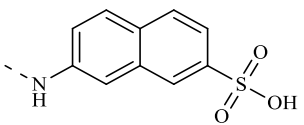
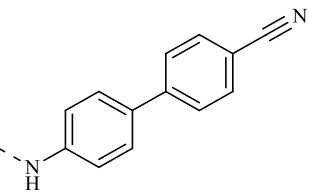
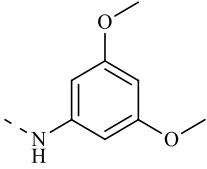
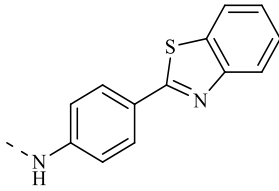
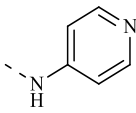
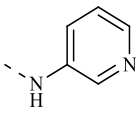
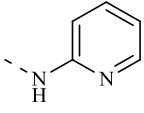
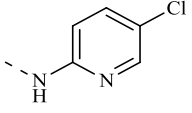
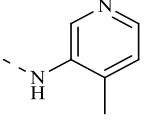
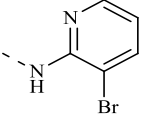
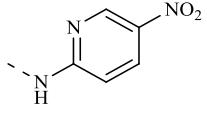
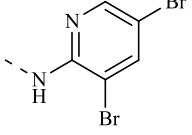
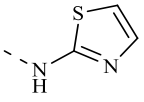
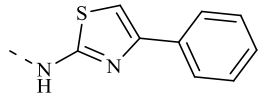
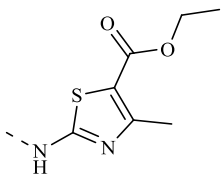
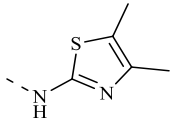
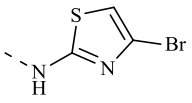
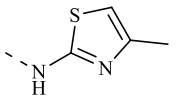
Tabelle 13: Übersicht der Amin-Reste für die Dockingstudie mit monocyclischen *N,O*-Acetalen



# Anhang

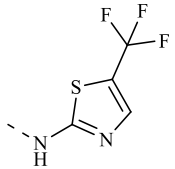
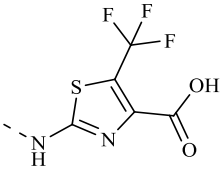
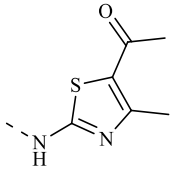
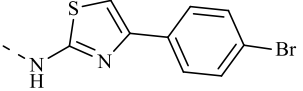
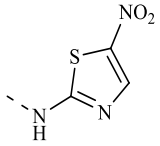
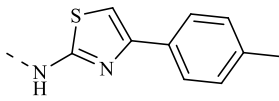
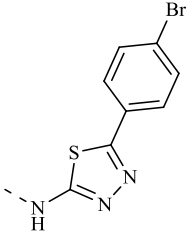
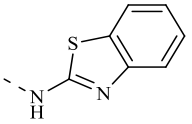
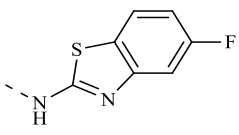
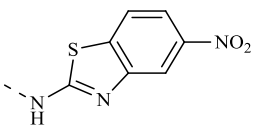
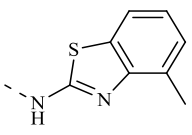
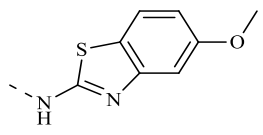
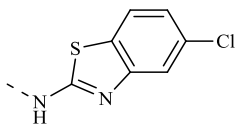
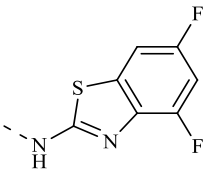
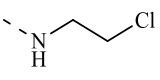
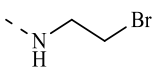
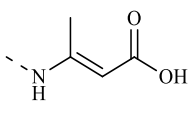
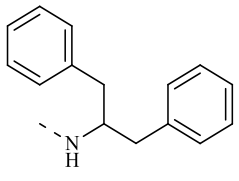
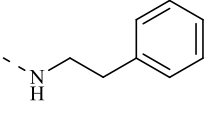
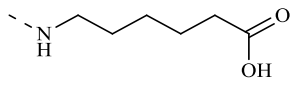
 <p style="text-align: center;"><b>9</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>10</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>11</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>12</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>13</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>14</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>15</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>16</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>17</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>18</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>19</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>20</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>21</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>22</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>23</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>24</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>25</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>26</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>27</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>28</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>29</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>30</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>31</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>32</b></p>

# Anhang

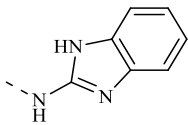
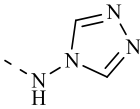
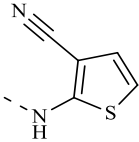
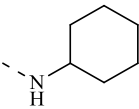
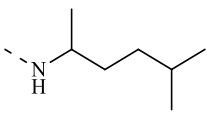
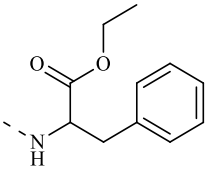
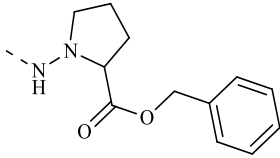
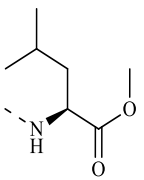
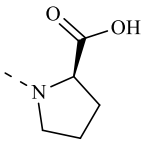
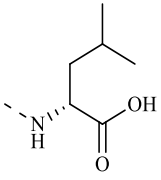
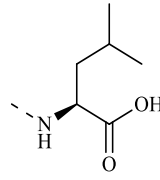
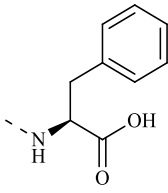
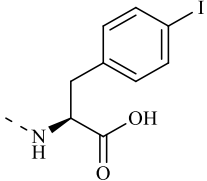
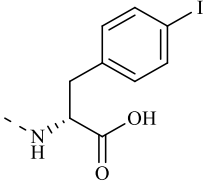
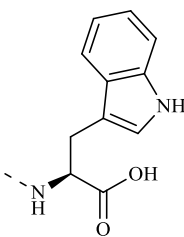
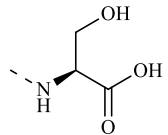
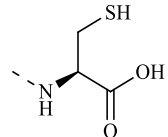
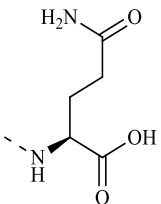
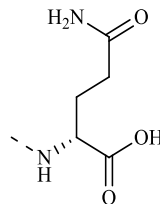
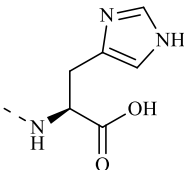
 <p><b>33</b></p>	 <p><b>34</b></p>	 <p><b>35</b></p>	 <p><b>36</b></p>
 <p><b>37</b></p>	 <p><b>38</b></p>	 <p><b>39</b></p>	 <p><b>40</b></p>
 <p><b>41</b></p>	 <p><b>42</b></p>	 <p><b>43</b></p>	 <p><b>44</b></p>
 <p><b>45</b></p>	 <p><b>46</b></p>	 <p><b>47</b></p>	 <p><b>48</b></p>
 <p><b>49</b></p>	 <p><b>50</b></p>	 <p><b>51</b></p>	 <p><b>52</b></p>



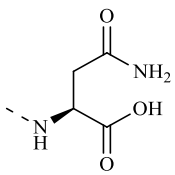
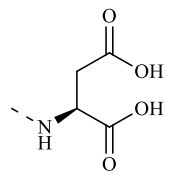
# Anhang

 <p><b>53</b></p>	 <p><b>54</b></p>	 <p><b>55</b></p>	 <p><b>56</b></p>
 <p><b>57</b></p>	 <p><b>58</b></p>	 <p><b>59</b></p>	 <p><b>60</b></p>
 <p><b>61</b></p>	 <p><b>62</b></p>	 <p><b>63</b></p>	 <p><b>64</b></p>
 <p><b>65</b></p>	 <p><b>66</b></p>	 <p><b>67</b></p>	 <p><b>68</b></p>
 <p><b>69</b></p>	 <p><b>70</b></p>	 <p><b>71</b></p>	 <p><b>72</b></p>

# Anhang

 <p><b>73</b></p>	 <p><b>74</b></p>	 <p><b>75</b></p>	 <p><b>76</b></p>
 <p><b>77</b></p>	 <p><b>78</b></p>	 <p><b>79</b></p>	 <p><b>80</b></p>
 <p><b>81</b></p>	 <p><b>82</b></p>	 <p><b>83</b></p>	 <p><b>84</b></p>
 <p><b>85</b></p>	 <p><b>86</b></p>	 <p><b>87</b></p>	 <p><b>88</b></p>
 <p><b>89</b></p>	 <p><b>90</b></p>	 <p><b>91</b></p>	 <p><b>92</b></p>

## Anhang

 <p><b>93</b></p>	 <p><b>94</b></p>		
--	--	--	--

### 7.3 Fluorimetrische Assays

Die Etablierung der fluorimetrischen Assays und die Testungen erfolgten, abgesehen von den monocyclischen *N,O*-Acetalen, in Kooperation mit Studenten der Johannes Gutenberg-Universität, namentlich Christina Gardiner und Vanessa Efinger im Rahmen ihrer Bachelorarbeiten sowie mit Malena dos Santos im Zusammenhang mit ihrer Diplomarbeit unter Anleitung von Lina Irsheid. Die detaillierten Ergebnisse sind der Dissertation „*New inhibitors of Golgi- $\alpha$ -mannosidase II*“ (L. Irsheid, 2018)<sup>121</sup> entnommen und der Vollständigkeit halber im Folgenden aufgeführt.

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem Tecan Reader Infinite F200 PRO Mikroplattenreader, ausgestattet mit einem Filtersystem (355 nm Anregung und 485 nm Emission) durchgeführt. Die Freisetzung von 4-Methylumbelliferon wurde über einen Zeitraum von 15 min durch Fluoreszenzspektroskopie unter Verwendung von schwarzen Greiner 96 Well Flachboden Polystyrolplatten gemessen. Studien über 4-Methylumbelliferylmannosid als Substrat und die Detektion der auftretenden Fluoreszenz durch Spaltung durch GMII-Enzyme sind bereits von *Coleman et al.* beschrieben<sup>159</sup>. Das dGMII Enzym wurde rekombinant exprimiert und aufgereinigt von Dr. Maria Ortiz Soto (Arbeitsgruppe Prof. Seibel, JMU, Würzburg). JBM und  $\beta$ -Glucosidase aus Süßmandeln wurden von Sigma Aldrich erhalten.

## Anhang

### 7.3.1 Enzymassay mit dGMII

Der Reaktionspuffer und das Enzym wurden wie folgt hergestellt:

#### Reaktionspuffer:

MES-Puffer (40 mM) versetzt mit Bovines Serumalbumin 1.1% (finale Konzentration im MES-Puffer = 0.1 %) und ZnSO<sub>4</sub>-Lösung 1.1 % (finale Konzentration im MES-Puffer = 0.1 %), pH = 5.75

#### Enzym:

GMII aus *Drosophila melanogaster*, in MES-Puffer versetzt mit 1.7% Bovinem Serumalbumin (finale Konzentration im MES-Puffer = 0.1 %) und 1.7 % ZnSO<sub>4</sub>-Lösung 1 (finale Konzentration im MES-Puffer = 0.1 %), Konzentration pro Well: 0.002 mg/mL

## Anhang

### 7.3.1.1 Bestimmung des $K_M$ -Werts

#### Substrat:

4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**4-MU-Man**) wurde im Reaktionspuffer zu folgenden Konzentrationen pro Well verdünnt: 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1.75 mM, 1.5 mM, 1 mM, 0.75 mM, 0.5 mM.

#### Pipettierschema:

Positiv-Kontrolle: 40 $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym

Negativ-Kontrolle: 40 $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Puffer

#### Experimentelle Durchführung:

Auf einer 96 Well Platte wurden 40  $\mu$ L der verschieden konzentrierten Substratlösungen in die Wells pipettiert. Darauf folgten 2 Minuten Inkubation der Substratlösungen bei 37 °C. Unter Verwendung einer Multikanalpipette wurden 10  $\mu$ L der Enzymlösung in jedes Well pipettiert (für die Negativ-Kontrolle stattdessen 10  $\mu$ L Puffer), das Reaktionsvolumen wurde mit der Multikanalpipette vermischt und die Platte für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Platte wurde für 10 Sekunden geschüttelt und anschließend alle 30-40 Sekunden die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37 °C gemessen.

Auf diese Weise wurden Der  $K_M$ -Wert und  $v_{max}$  zu folgenden Werten bestimmt:

Tabelle 14:  $K_M$ -Wert und  $v_{max}$  von dGMII mit 4-MU-Man

$$K_M \quad \mathbf{3.6 \pm 0.3 \text{ mM}}$$

$$v_{max} \quad 8.8 \pm 0.3 \text{ F/s}$$

## Anhang

### 7.3.1.2 IC<sub>50</sub> Bestimmung von Swainsonin

#### Substrat:

4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**4-MU-Man**) wurde im Reaktionspuffer zu folgenden Konzentrationen pro Well verdünnt: 2 mM, 1.5 mM, 1 mM, 0.5 mM.

#### Inhibitor:

Swainsonin wurde in Puffer zu folgenden Konzentrationen pro Well verdünnt: 600 nM, 450 nM, 300 nM, 150 nM, 120 nM, 60 nM, 48 nM, 45 nM, 36 nM, 30 nM, 24 nM, 15 nM, 12 nM, 6 nM

#### Pipettierschema:

30  $\mu$ L Inhibitor + 10  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym

Positiv-Kontrolle: 30  $\mu$ L Puffer + 10  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym

Negativ-Kontrolle: 30  $\mu$ L Inhibitor + 10  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Puffer

#### Experimentelle Durchführung:

Auf einer 96 Well Platte wurden 30  $\mu$ L der verschiedenen konzentrierten Swainsoninlösungen (Dreifachbestimmung) in die Wells pipettiert. Darauf folgten 2 Minuten Inkubation der Substratlösungen bei 37 °C. Unter Verwendung einer Multikanalpipette wurden 10  $\mu$ L der Enzymlösung in jedes Well pipettiert (für die Negativ-Kontrolle stattdessen 10  $\mu$ L Puffer) und die Reaktionsmischung für weitere 5 Minuten inkubiert. Zum Schluss wurden 10  $\mu$ L der Substratlösung zugefügt, das Reaktionsvolumen mit einer Multikanalpipette vermischt und die Platte für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde für 10 Sekunden geschüttelt und anschließend alle 30 Sekunden die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37 °C gemessen. Die Negativ-Kontrolle enthält 150 nM Swainsonin pro Well um eine zu hohe Autofluoreszenz des Inhibitors auszuschließen. Diese wurde ebenfalls dreifachbestimmt. Die Positiv-Kontrolle wurde vierfach vermessen, um die ungehemmte Enzymaktivität zu bestimmen.

Auf diese Weise wurden folgende IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt:

## Anhang

Tabelle 15: IC<sub>50</sub>-Werte von Swainsonin in anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Substrats 4-MU-Man

Konzentration von 4-Mu-Man [mM]	IC <sub>50</sub> -Werte [nM]
0.5	37 ± 4.3
1.0	34 ± 0.7
1.5	34 ± 1.4
2.0	33 ± 2.8

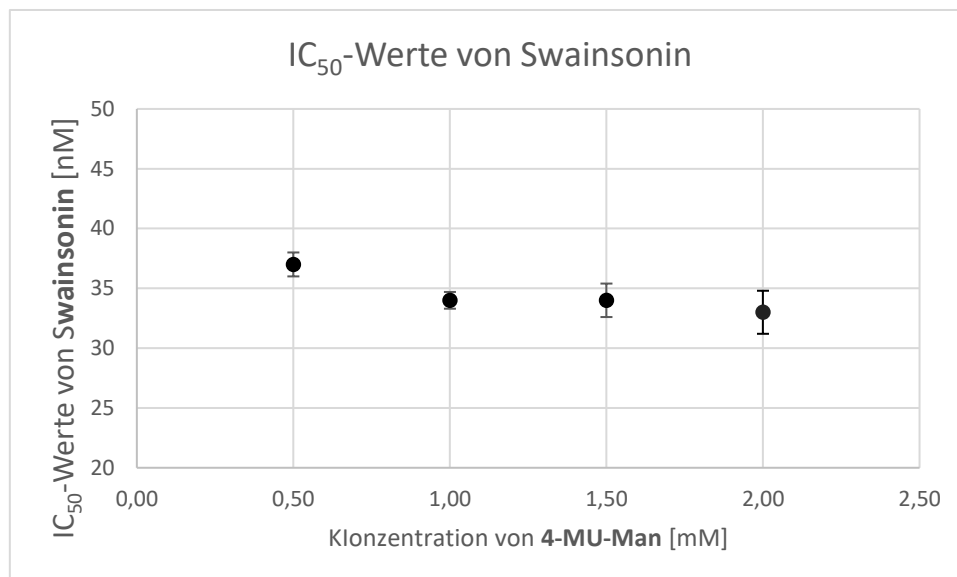


Abbildung 82: Darstellung der bestimmten IC<sub>50</sub>-Werte für den dGMII Inhibitor Swainsonin in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Substrats 4-MU-Man

## Anhang

### 7.3.1.3 IC<sub>50</sub> Bestimmung von Swainsonin als *slow binder*

#### Substrat:

4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**4-MU-Man**) wurde in Reaktionspuffer mit einer Konzentration im Well von 1 mM eingesetzt.

#### Inhibitor:

Swainsonin wurde in Puffer zu folgenden Konzentrationen pro Well verdünnt: 1000 nM, 750 nM, 600 nM, 500 nM, 250 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 10 nM

#### Pipettierschema:

30  $\mu$ L Inhibitor + 10  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym

Positiv-Kontrolle: 30  $\mu$ L Puffer + 10  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym

Negativ-Kontrolle: 30  $\mu$ L Inhibitor + 10  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Puffer

#### Experimentelle Durchführung:

Auf einer 96 Well Platte wurden 30  $\mu$ L der verschiedenen konzentrierten Swainsoninlösungen in die Wells pipettiert (Dreifachbestimmung). Für die Positiv-Kontrolle stattdessen 30  $\mu$ L Puffer verwendet. Darauf folgten 2 Minuten Inkubation der Substratlösungen bei 37 °C. Unter Verwendung einer Multikanalpipette wurden 10  $\mu$ L der Enzymlösung in jedes Well pipettiert (Negativ-Kontrolle: 10  $\mu$ L Puffer), das Reaktionsvolumen wurde mit der Multikanalpipette vermischt und die Platte nochmals für **10** Minuten, **5** Minuten bzw. **0** Minuten bei 37 °C inkubiert. Zum Schluss wurden 10  $\mu$ L der Substratlösung zugefügt und das Reaktionsvolumen mit einer Multikanalpipette vermischt. Die Platte wurde für 10 Sekunden geschüttelt und anschließend alle 30 Sekunden die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37 °C gemessen.

Auf diese Weise wurden folgende IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt:



## Anhang

Tabelle 16: IC<sub>50</sub>-Werte von Swainsonin mit dGMII bei unterschiedlichen Inkubationszeiten

Inkubationszeit [min]	IC <sub>50</sub> Werte [nM]
10	51 ± 3
5	44 ± 4
0	111 ± 6

### 7.3.1.4 Bestimmung des K<sub>i</sub>-Werts von Swainsonin

#### Substrat:

4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**4-MU-Man**) wurde im Reaktionspuffer zu folgenden Konzentrationen pro Well verdünnt: 10 mM, 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1.75 mM, 1.5 mM, 1 mM

#### Inhibitor:

Swainsonin wurde in Puffer zu einer Konzentration von 40 nM pro Well verdünnt

#### Pipettierschema:

10  $\mu$ L Inhibitor + 30  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym

10  $\mu$ L Puffer + 30  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym (für den K<sub>M</sub>-Wert)

#### Experimentelle Durchführung:

Auf einer 96 Well Platte wurden das Enzym und der Inhibitor oder der Puffer (Dreifachbestimmung) vorgelegt. Dann wurde für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 30  $\mu$ L der unterschiedlich konzentrierten Substratlösungen mit einer Multikanalpipette zugefügt und das Reaktionsvolumen mit derselben Multikanalpipette durchmischt. Die Platte wurde für 10 Sekunden geschüttelt und anschließend alle 30 Sekunden die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37 °C gemessen.

## Anhang

Auf diese Weise wurden folgende Werte für  $K_M$  (bzw.  $K_M'$ ) und  $v_{max}$  bestimmt:

Tabelle 17:  $K_M$ - und  $v_{max}$ -Werte der dGMII

	$K_M$ ( $K_M'$ mit Swainsonin)	$v_{max}$
Ohne Swainsonin	$2.3 \pm 0.2$ mM	$8.5 \pm 0.2$ F/s
Mit Swainsonin	$2.9 \pm 0.6$ mM	$4.3 \pm 0.4$ F/s

Daraus wurden folgende  $K_M$ -,  $v_{max}$ - und  $K_i$ -Werte sowohl unter der Annahme kompetitiver als auch nicht-kompetitiver Hemmung errechnet:

Tabelle 18:  $K_M$ -,  $v_{max}$ - und  $K_i$ -Werte der dGMII

	kompetitive Hemmung nach Gleichung 6	nicht-kompetitive Hemmung nach Gleichung 7
$K_M$	$2.1 \pm 0.3$ mM	$2.4 \pm 0.2$ mM
$v_{max}$	$8.2 \pm 0.4$ F/s	$8.6 \pm 0.3$ F/s
$K_i$	$12.0 \pm 1.0$ nM	$34.0 \pm 2.0$ nM

Unter der Annahme, dass Swainsonin ein slow-binder ist, wurden für die dGM zudem die Dissoziationskonstante  $K_i$  für den [EI]-Komplex und  $K_i^*$  für den isomeren [E\*I]-Komplex über die Anfangsgeschwindigkeit ( $v_i$ ) und die Gleichgewichtsgeschwindigkeit ( $v_s$ ) berechnet. Die Werte für  $v_i$  und  $v_s$  wurden aus den  $IC_{50}$ -Werten (Tabelle 16) bestimmt. Die Werte für  $K_i$  und  $K_i^*$  sind in Tabelle 19: angegeben.

## Anhang

Tabelle 19: Liste der  $K_i$ - und  $K_i^*$ -Werte berechnet aus den  $IC_{50}$ -Werten in Tabelle 16 nach Gleichung 11

[4-MU-Man]	$K_i$	$K_i^*$
0.5 mM	$32 \pm 6$ nM	$15 \pm 2$ nM
1.0 mM	$28 \pm 2$ nM	$16 \pm 1$ nM
1.5 mM	$37 \pm 4$ nM	$14 \pm 2$ nM
2.0 mM	$35 \pm 4$ nM	$15 \pm 2$ nM

### 7.3.2 Enzymassays mit der Jack Bean Mannosidase

Der Reaktionspuffer und das Enzym wurden wie folgt hergestellt:

#### Reaktionspuffer:

MES-Puffer (40 mM) versetzt mit Bovinem Serumalbumin 1.1 % (finale Konzentration im MES-Puffer = 0.1 %) und  $ZnSO_4$ -Lösung 1.1 % (finale Konzentration im MES-Puffer = 0.1 %), pH = 5.75

#### Enzym:

*Jack Bean*-Mannosidase, in MES-Puffer, versetzt mit 1.7 % Bovinem Serumalbumin (finale Konzentration im MES-Puffer = 0.1 %) und 1.7 %  $ZnSO_4$ -Lösung 1 (finale Konzentration im MES-Puffer = 0.1 %), Konzentration pro Well: 0.04 U/mL

## Anhang

### 7.3.2.1 Bestimmung des $K_M$ -Werts

#### Substrat:

4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**4-MU-Man**) wurde im Reaktionspuffer zu folgenden Konzentration pro Well verdünnt: 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1.75 mM, 1.5 mM, 1.25 mM, 1 mM, 0.8 mM, 0.6 mM, 0.4 mM, 0.2 mM, 0.1 mM, 0.05 mM, 0.01 mM

#### Pipettierschema:

Positiv-Kontrolle: 40 $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym

Negativ-Kontrolle: 40 $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Puffer

#### Experimentelle Durchführung:

Auf einer 96 Well Platte wurden 40  $\mu$ L der verschieden konzentrierten Substratlösungen in die Wells pipettiert (Dreifachbestimmung). Darauf folgten 2 Minuten Inkubation der Substratlösungen bei 37 °C. Unter Verwendung einer Multikanalpipette wurden 10  $\mu$ L der Enzymlösung in jedes Well pipettiert (für die Negativ-Kontrolle stattdessen 10  $\mu$ L Puffer), das Reaktionsvolumen wurde mit der Multikanalpipette vermischt und die Platte für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Platte wurde für 10 Sekunden geschüttelt und anschließend alle 30-40 Sekunden die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37 °C gemessen.

Auf diese Weise wurden der  $K_M$ -Wert und  $v_{\max}$  zu folgenden Werten bestimmt:

Tabelle 20:  $K_M$ -Wert und  $v_{\max}$  der JBM mit 4-MU-Man

$$K_M \quad 0.4 \pm 0.05 \text{ mM}$$

$$v_{\max} \quad 10.6 \pm 0.4 \text{ F/s}$$

## Anhang

### 7.3.2.2 IC<sub>50</sub> Bestimmung von Swainsonin

#### Substrat:

4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (**4-MU-Glc**) wurde im Reaktionspuffer zu folgenden Konzentrationen pro Well verdünnt: 0.7 mM, 0.3 mM, 0.2 mM, 0.1 mM, 0.05 mM

#### Inhibitor:

Swainsonin wurde in Puffer zu folgenden Konzentrationen pro Well verdünnt: 1000 nM, 750 nM, 500 nM, 250 nM, 200 nM, 100 nM, 80 nM, 75 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 25 nM, 20 nM, 10 nM

#### Pipettierschema:

30  $\mu$ L Inhibitor + 10  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym

Positiv-Kontrolle: 30  $\mu$ L Puffer + 10  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym

Negativ-Kontrolle: 30  $\mu$ L Inhibitor + 10  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Puffer

#### Experimentelle Durchführung:

Auf einer 96 Well Platte wurden 30  $\mu$ L der verschieden konzentrierten Swainsoninlösungen (Dreifachbestimmung) in die Wells pipettiert. Darauf folgten 2 Minuten Inkubation der Substratlösungen bei 37 °C. Unter Verwendung einer Multikanalpipette wurden 10  $\mu$ L der Enzymlösung in jedes Well pipettiert (für die Negativ-Kontrolle stattdessen 10  $\mu$ L Puffer) und die Reaktionsmischung für weitere 5 Minuten inkubiert. Zum Schluss wurden 10  $\mu$ L der Substratlösung zugefügt, das Reaktionsvolumen mit einer Multikanalpipette vermischt und die Platte für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde für 10 Sekunden geschüttelt und anschließend alle 30 Sekunden die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37 °C gemessen. Die Negativ-Kontrolle enthält 150 nM Swainsonin pro Well, um eine zu hohe Autofluoreszenz des Inhibitors auszuschließen. Diese wurde ebenfalls dreifach bestimmt. Die Positiv-Kontrolle wurde vierfach bestimmt, um die ungehemmte Enzymaktivität zu messen.

Auf diese Weise wurden folgende IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt:

## Anhang

Tabelle 21: IC<sub>50</sub>-Werte von Swainsonin in anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Substrats 4-MU-Man

Konzentration von 4-Mu-Man [mM]	IC <sub>50</sub> Werte [nM]
0.05	141 ± 9
0.1	160 ± 4
0.2	160 ± 16
0.3	207 ± 16
0.7	278 ± 15

### 7.3.2.3 Bestimmung des K<sub>i</sub>-Werts von Swainsonin als *slow binder*

#### Substrat:

4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**MS3**) wurde im Reaktionspuffer zu folgenden Konzentrationen pro Well verdünnt: 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1.75 mM, 1.5 mM, 1 mM, 0.8 mM, 0.6 mM, 0.4 mM, 0.2 mM, 0.1 mM, 0.05 mM, 0.01 mM

#### Inhibitor:

Swainsonin wurde in Puffer zu einer Konzentration von 150 nM pro Well verdünnt.

#### Pipettierschema:

10  $\mu$ L Inhibitor + 30  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym

10  $\mu$ L Puffer + 30  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym (für den K<sub>M</sub>-Wert)

#### Experimentelle Durchführung:

Auf einer 96 Well Platte wurden das Enzym und der Inhibitor oder der Puffer (Dreifachbestimmung) vorgelegt. Dann wurde für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 30  $\mu$ L der unterschiedlich konzentrierten Substratlösungen mit einer Multikanalpipette zugefügt und das Reaktionsvolumen mit derselben Multikanalpipette durchmischt. Die Platte

## Anhang

wurde für 10 Sekunden geschüttelt und anschließend alle 30 Sekunden die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37 °C gemessen.

Auf diese Weise wurden folgende Werte für  $K_M$  (bzw.  $K_M'$ ) und  $v_{max}$  bestimmt:

Tabelle 22:  $K_M$ - und  $v_{max}$ -Werte der JBM

	$K_M$ ( $K_M'$ mit Swainsonin)	$v_{max}$
Ohne Swainsonin	$0.7 \pm 0.2$ mM	$11 \pm 1.2$ F/s
Mit Swainsonin	$1.1 \pm 0.2$ mM	$3.7 \pm 0.3$ F/s

Daraus wurden folgende  $K_M$ -,  $v_{max}$ - und  $K_i$ -Werte sowohl unter der Annahme kompetitiver als auch nicht-kompetitiver Hemmung errechnet:

Tabelle 23:  $K_M$ -,  $v_{max}$ - und  $K_i$ -Werte der dGMII

	kompetitive Hemmung nach Gleichung 6	nicht-kompetitive Hemmung nach Gleichung 7
$K_M$	$0.67 \pm 0.14$ mM	$0.70 \pm 0,14$ mM
$v_{max}$	$10.5 \pm 0.9$ F/s	$10.7 \pm 0.9$ F/s
$K_i$	$18 \pm 4$ nM	$58 \pm 9$ nM

Unter der Annahme, dass Swainsonin ein slow-binder ist, wurden für die JBM zudem die Dissoziationskonstante  $K_i$  für den [EI]-Komplex und  $K_i^*$  für den isomeren [E\*I]-Komplex über die Anfangsgeschwindigkeit ( $v_i$ ) und die Gleichgewichtsgeschwindigkeit ( $v_s$ ) berechnet. Die Werte für  $v_i$  und  $v_s$  wurden aus den  $IC_{50}$ -Werten (siehe Tabelle 21) bestimmt. Die Werte für  $K_i$  und  $K_i^*$  sind in Tabelle 24 angegeben.

## Anhang

Tabelle 24: Liste der  $K_i$ - und  $K_i^*$ -Werte berechnet aus den  $IC_{50}$ -Werten in Tabelle 21 nach Gleichung 11

[4-MU-Man]	$K_i$	$K_i^*$
0.05 mM	$173 \pm 14$ nM	$112 \pm 6$ nM
0.1 mM	$197 \pm 11$ nM	$128 \pm 7$ nM
0.2 mM	$151 \pm 9$ nM	$115 \pm 8$ nM
0.3 mM	$169 \pm 13$ nM	$147 \pm 8$ nM
0.7 mM	$194 \pm 10$ nM	$135 \pm 9$ nM

### 7.3.3 Enzymassay mit der $\beta$ -Glucosidase aus Süßmandeln

Die  $K_M$ -Wertbestimmung und die  $IC_{50}$ -Wert Messung wurden von Malena dos Santos Guilherme (im Rahmen ihrer Diplomarbeit) und Evelin Schmid (im Rahmen ihrer Bachelorarbeit) im Arbeitskreis Schirmeister an der JGU Mainz durchgeführt. Dabei wurden sie betreut von Lina Irsheid. Für die fluoreszenzbasierten Assays mit der  $\beta$ -Glucosidase wurden der Reaktionspuffer und das Enzym wie folgt hergestellt:

#### Reaktionspuffer:

Citrat-Puffer, pH = 5.0

#### Enzym:

$\beta$ -Glucosidase aus Süßmandeln wurde in Citrat-Puffer mit einer Konzentration pro Well von  $40 \mu\text{g/mL}$  ( $0.748 \text{ U/mL}$ ) verwendet.



## Anhang

### 7.3.3.1 Bestimmung des $K_M$ -Werts

#### Substrat:

4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**MS3**) wurde im Reaktionspuffer zu folgenden Konzentration pro Well verdünnt: 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0.75 mM, 0.5 mM, 0.25 mM

#### Pipettierschema:

Positiv-Kontrolle: 40  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym

Negativ-Kontrolle: 40  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Puffer

#### Experimentelle Durchführung:

Auf einer 96 Well Platte wurden 40  $\mu$ L der verschiedenen konzentrierten Substratlösungen in die Wells pipettiert (Dreifachbestimmung). Darauf folgten 2 Minuten Inkubation der Substratlösungen bei 37 °C. Unter Verwendung einer Multikanalpipette wurden 10  $\mu$ L der Enzymlösung in jedes Well pipettiert (für die Negativ-Kontrolle stattdessen 10  $\mu$ L Puffer), das Reaktionsvolumen wurde mit der Multikanalpipette vermischt und die Platte für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Platte wurde für 10 Sekunden geschüttelt und anschließend alle 30-40 Sekunden die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37 °C gemessen.

Auf diese Weise wurden der  $K_M$ -Wert und  $v_{\max}$  zu folgenden Werten bestimmt:

Tabelle 25:  $K_M$ -Wert und  $v_{\max}$  der  $\beta$ -Glucosidase aus Süßmandeln mit 4-MU-Glc

$$K_M \quad 2.9 \pm 0.4 \text{ mM}$$

$$v_{\max} \quad 4.4 \pm 0.2 \text{ F/s}$$

### 7.3.3.2 $IC_{50}$ Bestimmung von Isofagomin

#### Substrat:

4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-mannopyranosid (**MS3**) wurde in Reaktionspuffer bei einer Konzentration von 0.1 mM pro Well verwendet.

## **Anhang**

### Inhibitor:

Swainsonin wurde in Puffer zu folgenden Konzentrationen pro Well verdünnt: 1000 nM, 900 nM, 800 nM, 700 nM, 600 nM, 500 nM, 400 nM, 300 nM, 100 nM

### Pipettierschema:

30  $\mu$ L Inhibitor + 10  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym

Positiv-Kontrolle: 30  $\mu$ L Puffer + 10  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Enzym

Negativ-Kontrolle: 30  $\mu$ L Inhibitor + 10  $\mu$ L Substrat + 10  $\mu$ L Puffer

### Experimentelle Durchführung:

Auf einer 96 Well Platte wurden 30  $\mu$ L der verschiedenen konzentrierten Swainsoninlösungen (Dreifachbestimmung) in die Wells pipettiert. Darauf folgten 2 Minuten Inkubation der Substratlösungen bei 37 °C. Unter Verwendung einer Multikanalpipette wurden 10  $\mu$ L der Enzymlösung in jedes Well pipettiert (für die Negativ-Kontrolle stattdessen 10  $\mu$ L Puffer) und die Reaktionsmischung für weitere 5 Minuten inkubiert. Zum Schluss wurden 10  $\mu$ L der Substratlösung zugefügt, das Reaktionsvolumen mit einer Multikanalpipette vermischt und die Platte für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde für 10 Sekunden geschüttelt und anschließend wurde alle 30 Sekunden die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37 °C gemessen. Die Negativ-Kontrolle enthält 150 nM Swainsonin pro Well um eine zu hohe Autofluoreszenz des Inhibitors auszuschließen. Diese wurde ebenfalls dreifach bestimmt. Die Positiv-Kontrolle wurde vierfach bestimmt, um die ungehemmte Enzymaktivität zu messen.

Auf diese Weise wurden der  $IC_{50}$ -Wert zu  $174.7 \pm 73.4$  nM bestimmt

### 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die in dieser Arbeit behandelten Forschungsprojekte an der Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II **A)** Kristallstruktur pdb: 1HWW, darin markiert sind die Größe und Position der aktiven Bindetasche in lila und einer potentiellen allosterischen Bindetasche in grün; **B)** computergestützte Methoden zum Design und zur Beurteilung neuer Inhibitorstrukturen; **C)** durchgeführte Syntheseprojekte. .... XI

Abbildung 2: Schematischer Metastasierungsprozess in Anlehnung an Kannagi *et al.*<sup>17</sup> ..... 2

Abbildung 3: Mögliche Interaktionen zwischen (Tumor)Zellen, Selectinen und Selectinliganden während des Metastasierungsprozesses nach Läubli *et al.*<sup>24</sup> ..... 3

Abbildung 4: Schematische Darstellung des *N*-Glycosylierungswegs und der Funktion der GMII (angelehnt an die Darstellung von Rose *et al.*<sup>51</sup> und Dwek *et al.*<sup>46</sup>) mit verschiedenen therapeutischen Ansatzpunkten<sup>52</sup> ..... 5

Abbildung 5: oben: Molekülstruktur der Golgi- $\alpha$ -Mannosidase II aus *Drosophila melanogaster* (dGMII) aus der Röntgenstruktur pdb: 1HWW<sup>53</sup>. Das zentrale Zink<sup>2+</sup>-Ion ist in blau dargestellt; unten: Oberfläche derselben Kristallstruktur, bei der lösemittelzugängliche Bereiche in grün, hydrophobe Bereiche in hellblau und polare Bereiche in gelb eingefärbt sind. Die aktive Bindetasche ist in rot angedeutet. .... 7

Abbildung 6: Oktaedrische Sechsfachkoordination des zentralen Zinkions in der Kristallstruktur pdb 1HWW ..... 8

Abbildung 7: Schematischer Hydrolysemechanismus der GMII nach Shah *et al.*<sup>61</sup> ..... 9

Abbildung 8: Zweidimensionale Übersicht der Interaktionen zwischen dem Substrat und der dGMII, bestimmt durch einen LigPlot+ (erhalten aus der Kristallstruktur pdb: 3CZN) nach Shah *et al.*<sup>61</sup>. .... 11

Abbildung 9: Das natürliche Substrat GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> im Komplex mit der D204A-Mutante der dGMII (pdb: 3CZN) mit farblicher Markierung der drei beteiligten Zucker-Bindepositionen: M5 im katalytischen Zentrum (rot), M4 in der Halteposition (blau) und G3 in der Ankerposition (grün). .... 12

Abbildung 10: Hydrolysemechanismus der dGMII nach Reilly<sup>40</sup> und Koshland<sup>62</sup> ..... 13

Abbildung 11: Strukturen von Conduritol-B-Epoxid (die Stereozentren an C1 und C6 können dabei sowohl 1*R*, 6*S*- als auch 1*S*, 6*R*-konfiguriert sein) und Isofagomin ..... 14

Abbildung 12: *Anti*- und *syn*-Protonierung, wie sie in  $\beta$ -Glycosidasen erfolgen kann, nach Heightmann und Vasella<sup>80</sup> ..... 15

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 13: Vergleich der Übergangszustände in $\alpha$ - und $\beta$ -Glycosidasen mit Inhibitoren für diese Enzymklassen und das Additionsprodukt von Conduritol-Epoxid nach kovalenter Anbindung an das katalytische Nucleophil nach <i>Melo et al.</i> <sup>81</sup> .....	15
Abbildung 14: Strukturen verkehrsfähiger Glucosidase-Inhibitoren .....	16
Abbildung 15: Ansatzpunkte für Arzneistoffe mit Beispielen im <i>N</i> -Glycosylierungsweg nach <i>Dwek</i> <sup>46</sup> .....	18
Abbildung 16: Wechselwirkungen von Swainsonin in der aktiven Tasche der dGMII aus der Kristallstruktur pdb 1HWW .....	19
Abbildung 17: Inhibitorische Strategien: a) reversible Inhibition durch chemisch inerte Liganden, b) irreversible Inhibition über reaktive Liganden und c) reversible und kovalente Inhibition durch reaktive Liganden nach <i>Grossmann</i> <sup>116</sup> .....	24
Abbildung 18: Energieprofile nicht-kovalenter (rot), kovalent-irreversibler (blau, gepunktet) und kovalent-reversibler (blau, durchgezogen) Inhibitoren. ....	25
Abbildung 19: Mögliche Reaktionswege für die reversibel kovalente Inhibition durch bicyclische Acetale. Die Ringgröße ist variabel. ....	26
Abbildung 20: Mechanismus der kovalent reversiblen Anbindung von Spiroverbindungen an Aspartate und Struktur der untersuchten Modellverbindung pMSP (para-MercaptoSPiroacetal). ....	27
Abbildung 21: Postulierte Ringöffnungen von monocyclischen <i>N,O</i> -Acetalen durch Asp204. Im Falle einer Protonierung entweder des Alkoholats (Weg A) oder des Amids (Weg B), ist keine Rückreaktion mehr, sondern nur noch die Hydrolyse der Asp-Inhibitor-Bindung möglich. Die Rückreaktion von Weg B ist zudem sehr unwahrscheinlich, da das abgespaltene Amid abdifferenzieren und sich nicht mehr in räumlicher Nähe zum acetalischen Kohlenstoff befinden dürfte. ....	28
Abbildung 22: A) Struktur von Isofagomin und 5- <i>epi</i> -Isofagomin, B) Derivatisierungsoptionen für Isofagomin und dessen 5-Epimer .....	29
Abbildung 23: Azamannose als Vorläuferverbindung zu kovalent reversiblen Inhibitoren der GMII.....	29
Abbildung 24: Vier strukturell eng verwandte, potentiell allosterische Inhibitoren der GMII zur Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen .....	30
Abbildung 25: Überlagerte Strukturen von Swainsonin im Redocking (gelbe Struktur) sowie des Referenzliganden in der Kristallstruktur der GM II mit dem PDB-Code 1HWW. Das zentrale Zinkion ist in blau dargestellt. ....	32

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 26: Fließschema des Designprozesses zu <b>L039</b> . Dargestellt sind ausgewählte Verbindungen aus dem Strukturfindungsprozess, welche auch in Tabelle 2 beschrieben sind. Bis auf die Endverbindung sind nicht immer alle von FlexX berechneten Wechselwirkungen dargestellt. Grüne Haken zeigen eine Verbesserung des Dockingergebnisses, rote Kreuze eine Verschlechterung und Fragezeichen Indifferenz bezüglich der Erfüllung der notwendigen Parameter (vgl. Kapitel 3.1.1.1). .....	34
Abbildung 27: Dockingposen ausgesuchter Verbindungen im Designprozess zu L039 .....	41
Abbildung 28: Berechnete Bindepose von <b>L039</b> in der Bindetasche der GMII (pdb: 1HWW), <b>A</b> ) zur Veranschaulichung der Wechselwirkungen und der räumlichen Lage, <b>B</b> ) zur Veranschaulichung der Raumfüllung der Bindetasche. Dabei ist die Oberfläche der Bindetasche in blau, die von <b>L039</b> in orange dargestellt.....	43
Abbildung 29: Retrosynthetische Zerlegung von L039 in zwei Bausteine <b>A</b> und <b>B</b> .....	44
Abbildung 30: Beschriebene Kondensationsreaktion als Modellreaktion zur Kombination der Blöcke <b>A</b> und <b>B</b> nach <i>Talinli</i> <sup>123</sup> .....	44
Abbildung 31: Geplante Syntheseroute von Baustein B sowie die Verknüpfung von Baustein A und B zu L039 .....	45
Abbildung 32: Syntheseroute zum Baustein <b>A</b> von L039 (rot, vgl. Abbildung 31) .....	46
Abbildung 33: Vergleich von berechneten <sup>13</sup> C-Spektren (4, in lila): der Verbindung <b>A0</b> , (3, in türkis): dem zu <b>B0</b> analogen <i>S,O</i> -Acetal, (2, in grün) der Verbindung <b>B0</b> sowie dem gemessenen Spektrum (1, in rot). Die Berechnung der Spektren erfolgte durch den <i>Mnova Best</i> -Algorithmus für eine Frequenz von 75 MHz, wie er in MestReNova 12.0.4 implementiert ist. ....	47
Abbildung 34: Alternative Ringschlussreaktion im Sinne einer <i>Barbier</i> -Reaktion <sup>125</sup> .....	48
Abbildung 35: Versuche der Darstellung des Precursors für die <i>Barbier</i> -Reaktion.....	49
Abbildung 36: Syntheseroute zur <i>S, O</i> -acetalischen, bicyclischen Verbindung <b>C4</b> .....	50
Abbildung 37: Vergleich der theoretischen Ringformen für das <i>O, S</i> -Acetal mit zwei Sechsringen (links) und der Kombination Sechsring/Fünfring (rechts).....	52
Abbildung 38: A) Berechnete Wechselwirkungen von <b>pMSP</b> in der aktiven Tasche der dGMII in der Kristallstruktur 1HWW; B) Beiträge der einzelnen Atome zur Gesamtenergie, berechnet durch das HYDE-Assessment in LeadIT. Dabei spiegeln grüne Bereiche günstige Wechselwirkungen und rote Bereiche ungünstige Wechselwirkungen wieder. C) Dockingpose der Verbindung <b>pMSP</b> im aktiven Zentrum der GM II mit angegebenem Abstand des acetalischen Kohlenstoffs zum Asp204. ....	54

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 39: Dockingpose der Verbindung pMSP im aktiven Zentrum der GM II mit angegebenem Abstand des acetalischen Kohlenstoffs zum Asp204.....	55
Abbildung 40: Syntheseroute zu <b>pMSP</b> .....	55
Abbildung 41: Verbindungsserien der <i>N,O</i> -Acetale für die Docking Studie.....	56
Abbildung 42: Oktaedrische Koordination des Zn <sup>2+</sup> in der GM- Bindetasche im Komplex mit Swainsonin .....	57
Abbildung 43: Schematischer Reaktionsbefehl für das kovalente Docking der monocyclischen <i>N,O</i> -Acetale in MOE. Dabei sind die individuellen Reste der Zuckerstruktur (blau) nicht gezeigt. Das Acetat-Ion (rot) stellt das Asp204 dar. Das Proton (grün) wird benötigt, um der Vorgabe Rechnung zu tragen, dass Sauerstoff 6 nach der Reaktion direkt protoniert vorliegen soll. ....	58
Abbildung 44: Auftragung der jeweils 20 besten Scores der monocyclischen <i>N,O</i> -Acetale (LeadIT: (L-Scores) und HYDE-Scores, MOE: kovalent = M-K-Scores; nicht-kovalent = M-nK-Scores sowie die Scores von Swainsonin (SWA) in MOE und LeadIT. Die Strukturen sind im Anhang in Kapitel 7.2 aufgeführt.....	59
Abbildung 45: Darstellung der Beiträge zum HYDE-Score der einzelnen Atome in der Bindetasche der GMII. Dabei sind wünschenswerte Beiträge mit negativem $\Delta G$ in grün, positive Beiträge in rot dargestellt. Die Beiträge des jeweils markierten Bereichs sind zusätzlich jeweils aus Sicht des Liganden und des Rezeptors hinsichtlich Desolvatation (D) und Interaktionen (I) aufgeführt. Die einzelnen energetischen Beiträge sind teilweise außerhalb der Skala, welche der Übersicht halber von -3 bis +3 gewählt wurde. ....	62
Abbildung 46: Darstellung der prinzipiellen Unterschiede in den Wechselwirkungen von Mannose- <i>N,O</i> -acetalen und 2-Deoxy- <i>N,O</i> -acetalen in der Bindetasche der GMII (1HWW). Die Gitteroberfläche der aktiven Tasche ist farblich nach elektrostatischem Potenzial eingefärbt. Dabei kennzeichnen rote Bereiche hohe elektrostatische Potenziale. Die Bereiche von Interesse für diese Betrachtung sind in gelb markiert. ....	63
Abbildung 47: Syntheseroute für die monocyclischen <i>N,O</i> -Acetale der Reihen HAM und HAdG .....	66
Abbildung 48: Veranschaulichung des NOE-Effekts in den monocyclischen <i>N,O</i> -Acetalen zur Bestimmung der Konfiguration an C1. Die Übertragung des magnetischen Moments von dem Wasserstoff an C1 auf den Wasserstoff an C5 ist aus geometrischen Gründen nur in $\beta$ -konfigurierten Verbindungen möglich. ....	69

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 49: XRD-Kristallstrukturen der Verbindungen HAM-B1 und HAM-B9 inklusive Wasserstoffe nach Hirshfeld Atom Refinements (HAR) <sup>143</sup> mit einer Auflösung von 0.64/0.65 Å sowie R-Werten nach HAR von 3.07/2.82 %. Die Elektronrestdichten betragen in beiden Strukturen unter $\pm 0.3 \text{ e}/\text{Å}^3$ .....	70
Abbildung 50: Zeitlicher Verlauf der Anomerisierung von <b>HAM-B1</b> anhand von NMR-Daten .....	73
Abbildung 51: Beispiele für Screening-Treffer in der Dockingstudie von Lina Irsheid an der potentiellen allosterischen Bindetasche der GKII (mit freundlicher Genehmigung entnommen aus: L. Irsheid, New inhibitors of Golgi- $\alpha$ -mannosidase II <sup>121</sup> ) .....	75
Abbildung 52: <b>A)</b> Lage der potentiellen allosterischen Bindetasche (grün) sowie der aktiven Tasche (magenta) in der GMII, <b>B)</b> Compound <b>12</b> in der allosterischen Bindetasche mit farbcodierter Oberfläche des Rezeptors (rot: saure Reste blau: basische Reste grau: polare und unpolare Reste sowie Rückgrat) (mit freundlicher Genehmigung entnommen aus: L. Irsheid, New inhibitors of Golgi- $\alpha$ -mannosidase II <sup>121</sup> ) .....	76
Abbildung 53: Syntheschema der potentiellen allosterischen Inhibitoren <b>AS7-AS10</b> .....	77
Abbildung 54: Syntheseroute für die Darstellung der Fluoreszenzsubstrate .....	78
Abbildung 55: Syntheseroute für das Substrat des Fluoreszenzassays für $\beta$ -Glucosidasen.....	79
Abbildung 56: Syntheseroute zu dem Substrat für Fluoreszenzassays mit $\alpha$ -Mannosidasen ..	80
Abbildung 57: Syntheseroute zu Isofagomin nach <i>Andersch</i> und <i>Bols</i> <sup>150</sup> .....	81
Abbildung 58: Geplante Syntheseroute für die Azamannose nach <i>Overkleeft et al.</i> <sup>153</sup> und <i>Rajanikanth</i> <sup>154</sup> sowie Derivatisierungen .....	82
Abbildung 59: Synthetisierte Verbindungen im Rahmen der geplanten Synthese von Azamannose und deren geplanten Derivatisierungen zu bicyclischen Acetalen (in grau) .....	84
Abbildung 60: Umsatzkurve einer typischen Enzymreaktion nach <i>Bisswanger</i> <sup>155</sup> .....	86
Abbildung 61: Bildung der photometrisch detektierbaren Spezies Natrium-p-Nitrophenolat im photometrischen Essaysystem.....	87
Abbildung 62: Konversion der Fluoreszenz-Substrate durch Glycosidasen, hier beispielhaft anhand der Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs 4-Methylumbelliferon aus 4-MU-Glc durch $\beta$ -Glucosidasen .....	87
Abbildung 63: Umsetzung eines Substrats S durch ein Enzym E zu einem Produkt P über den Enzym-Substrat-Komplex [ES] und die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten k.....	88
Abbildung 64: <i>Michaelis-Menten</i> Sättigungskurve.....	89

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 65: Lineweaver-Burk Auftragung der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit über der reziproken Substratkonzentration mit den daraus erhältlichen Kenngrößen $1/K_M$ aus dem x-Achsenabschnitt, $1/v_{max}$ aus dem y-Achsenabschnitt sowie dem Verhältnis von $K_M/v_{max}$ aus der Steigung.....	90
Abbildung 66: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Hemmtypen: A) keine Hemmung; B) kompetitive Hemmung; C) nicht-kompetitive Hemmung; D) unkompetitive Hemmung .....	91
Abbildung 67: Kinetische Betrachtung kompetitiver Inhibitoren .....	92
Abbildung 68: <i>Lineweaver-Burk</i> Auftragung für kompetitive Inhibitoren .....	93
Abbildung 69: Kinetische Betrachtung nicht-kompetitiver Inhibitoren .....	94
Abbildung 70: Lineweaver-Burk Auftragung für nicht-kompetitive Inhibitoren .....	95
Abbildung 71: Kinetische Betrachtung unkompetitiver Inhibitoren .....	95
Abbildung 72: Lineweaver-Burk Auftragung für unkompetitive Inhibition .....	96
Abbildung 73: Umsatzkurve für einen langsam bindenden Inhibitor .....	97
Abbildung 74: A) Simplex reversibler slow binder; B) Enzymisomerisierung .....	98
Abbildung 75: Substratkonversion von 4-MU-Man durch $\alpha$ -Mannosidasen.....	101
Abbildung 76: Konversion des Substrats 4-MU-Man durch $\beta$ -Glucosidasen.....	102
Abbildung 77: Katalytische Spaltung von Resorufin- $\alpha$ -D-mannopyranosid durch $\alpha$ -Mannosidasen.....	105
Abbildung 78: Identifizierte Verbindungen/Verbindungsklassen als potentielle Inhibitoren der GMII.....	110
Abbildung 79: Synthetisierte Substrate für die Fluoreszenzassays.....	111
Abbildung 80: Angewandte Strategien zur Synthese des Grundgerüsts von L039.....	112
Abbildung 81: Umweg über das acetalgeschützte Thiol, direkt durch Umsetzung mit Natriumhydrogensulfid und über das entsprechende Xanthogenat.....	113
Abbildung 82: Darstellung der bestimmten $IC_{50}$ -Werte für den dGMII Inhibitor Swainsonin in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Substrats 4-MU-Man .....	215



### 9 Literaturverzeichnis

1. Lozano, R. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**, 2095–128 (2012).
2. Goss, P. E., Baptiste, J., Fernandes, B., Baker, M. & Dennis, J. W. A phase I study of swainsonine in patients with advanced malignancies. *Cancer Res.* **54**, 1450–1457 (1994).
3. Goss, P. E., Reid, C. L., Bailey, D. & Dennis, J. W. Phase IB clinical trial of the oligosaccharide processing inhibitor swainsonine in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* **3**, 1077–1086 (1997).
4. Sporn, M. B. The war on cancer. *Lancet* **347**, 1377–1381 (1996).
5. Aznavoorian, S., Stracke, M. L., Krutzsch, H., Schiffmann, E. & Liotta, L. a. Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells. *J. Cell Biol.* **110**, 1427–1438 (1990).
6. Humphries, M. J., Olden, K. & Yamada, K. M. A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* **233**, 467–470 (1986).
7. Hynes, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**, 549–54 (1987).
8. Rao, C. N. *et al.* Evidence for a precursor of the high-affinity metastasis-associated murine laminin receptor. *Biochemistry* **28**, 7476–86 (1989).
9. Sherr, C. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev* **12**, 2984–2991 (1998).
10. Folkman, J. & Klagsbrun, M. Angiogenic Factors Angiogenic Heparin-Binding Endothelial. *Science (80-. )*. **235**, 442–447 (1987).
11. Pepper, M. S., Belin, D., Montesano, R., Orci, L. & Vassalli, J. D. Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J. Cell Biol.* **111**, 743–55 (1990).
12. Fidler, I. J. Origin and biology of cancer metastasis. *Cytometry* **10**, 673–680 (1989).

## Literaturverzeichnis

13. Leber, M. F. & Efferth, T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (Review). *International Journal of Oncology* **34**, 881–895 (2009).
14. Valastyan, S, Weinberg, R. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **14;147(2)**, 275–292 (2011).
15. Yoshida, K., Fujikawa, T., Tanabe, a & Sakurai, K. Quantitative analysis of distribution and fate of human lung cancer emboli labeled with 125I-5-iodo-2'-deoxyuridine in nude mice. *Surg. Today* **23**, 979–83 (1993).
16. Luzzi, K. J. *et al.* Multistep nature of metastatic inefficiency: Dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.* **153**, 865–873 (1998).
17. Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K. & Kimura, N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Science* **95**, 377–384 (2004).
18. Kannagi, R. Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconj. J.* **14**, 577–584 (1997).
19. Phillips, M. L. *et al.* ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science (80-. )*. **250**, 1130–2 (1990).
20. Tyrrell, D. *et al.* Structural requirements for the carbohydrate ligand of E-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10372–10376 (1991).
21. Berg, E. L., Robinson, M. K., Mansson, O., Butcher, E. C. & Magnani, J. L. A carbohydrate domain common to both sialyl leaand sialyl le(x) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J. Biol. Chem.* **266**, 14869–14872 (1991).
22. Takada, A. *et al.* Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 713–9 (1991).
23. Kansas, G. S. Selectins and Their Ligands: Current Concepts and Controversies. *Blood* **88**, 3259–3278 (1996).

## Literaturverzeichnis

24. Läubli, H. & Borsig, L. Selectins promote tumor metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **20**, 169–177 (2010).
25. Rivinoja, A., Pujol, F. M., Hassinen, A. & Kellokumpu, S. Golgi pH, its regulation and roles in human disease. *Ann Med* 1–13 (2011).
26. Demetriou, M., Nabi, I. R., Coppolino, M., Dedhar, S. & Dennis, J. W. Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V. *J. Cell Biol.* **130**, 383–392 (1995).
27. Dennis, J. W., Laferte, S., Waghorne, C., Breitman, M. L. & Kerbel, R. S. Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science (80-. )*. **236**, 582–585 (1987).
28. Granovsky, M. *et al.* Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nat. Med.* **6**, 306 (2000).
29. Lu, Y., Pelling, J. C. & Chaney, W. G. Tumor cell surface  $\beta$ 1–6 branched oligosaccharides and lung metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **12**, 47 (1994).
30. Pierce, M. & Arango, J. Rous Sarcoma Virus-Transformed Baby Hamster Kidney Cells Express Higher Levels of Asparagine-Linked Tri- and Tetraantennary Glycopeptides Containing [GlcNAc $\beta$ (1 6)Man] and PolyN-acetyllactosamine Sequences Than Baby Hamster Kidney Cells. *J. Biol. Chem.* **261**, 10772–10777 (1986).
31. Seberger, P. J., Scholar, E. M., Kelsey, L., Chaney, W. G. & Talmadge, J. E. N-linked oligosaccharides and metastatic propensity in in vivo selected mouse mammary adenocarcinoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* **17**, 437–444 (1999).
32. Seberger, P. J. & Chaney, W. G. Control of metastasis by Asn-linked,  $\beta$ 1–6 branched oligosaccharides in mouse mammary cancer cells. *Glycobiology* **9**, 235 (1999).
33. Yamashita, K., Tachibana, Y., Ohkura, T. & Kobata, A. Enzymatic basis for the structural changes of asparagine-linked sugar chains of membrane glycoproteins of baby hamster kidney cells induced by polyoma transformation. *J. Biol. Chem.* **260**, 3963–3969 (1985).
34. Sperandio, M., Gleissner, C. A. & Ley, K. Glycosylation in immune cell trafficking.

## Literaturverzeichnis

- Immunol Rev.* **230**, 97–113 (2009).
35. Ogawa, J., Inoue, H. & Koide, S. Expression of alpha-1,3-fucosyltransferase type IV and VII genes is related to poor prognosis in lung cancer. *Cancer Res.* **56**, 325–329 (1996).
36. Compain, P. & Martin, O. R. Carbohydrate mimetics-based glycosyltransferase inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **9**, 3077–3092 (2001).
37. Zou, W. C-Glycosides and Aza-C-Glycosides as Potential Glycosidase and Glycosyltransferase Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **5**, 1363–1391 (2005).
38. Walker-Nasir, E., Ahmad, I., Saleem, M. & Hoessli, D. Glycosyltransferase and glypiation inhibitors. *Curr. Org. Chem.* **11**, 591–607 (2007).
39. Mellquist, J. L., Kasturi, L., Spitalnik, S. L. & Shakin-Eshleman, S. H. The amino acid following an Asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry* **37**, 6833–6837 (1998).
40. Petersen, L., Ardèvol, A., Rovira, C. & Reilly, P. J. Molecular Mechanism of the Glycosylation Step Catalyzed by Golgi  $\alpha$ -Mannosidase II: A QM/MM Metadynamics Investigation. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 8291–8300 (2010).
41. Numao, S., Kuntz, D. a, Withers, S. G. & Rose, D. R. Insights into the mechanism of *Drosophila melanogaster* Golgi alpha-mannosidase II through the structural analysis of covalent reaction intermediates. *J. Biol. Chem.* **278**, 48074–83 (2003).
42. Moremen, K. W. Golgi  $\alpha$ -mannosidase II deficiency in vertebrate systems: implications for asparagine-linked oligosaccharide processing in mammals. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1573**, 225–235 (2002).
43. Moremen, K. W. & Nairn, A. V. Mannosidase, Alpha, Class 2a1 (MAN2A1, Golgi  $\alpha$ -Mannosidase II). in *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes* (eds. Taniguchi, N. et al.) 1313–1326 (Springer Japan, 2014). doi:10.1007/978-4-431-54240-7\_85
44. Nemčovičová, I. *et al.* Characterisation of class I and II  $\alpha$ -mannosidases from *Drosophila melanogaster*. *Glycoconj. J.* **30**, 899–909 (2013).

## Literaturverzeichnis

45. Hadwiger-Fangmeier, A., Niemann, H. & Tamura, T. Inhibition of glycosylation processing alters the growth parameters of cells transformed by the oncogene of Simian Sarcoma virus. *Arch. Virol.* **104**, 339–345 (1989).
46. Dwek, R. A., Butters, T. D., Platt, F. M. & Zitzmann, N. Targeting Glycosylation As a Therapeutic Approach. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 65–75 (2002).
47. Dennis, J. W., Granovsky, M. & Warren, C. E. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta* **1473**, 21–34 (1999).
48. Elbein, A. D., Kerbacher, J. K., Schwartz, C. J. & Sprague, E. A. Kifunensine inhibits glycoprotein processing and the function of the modified LDL receptor in endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 177–184 (1991).
49. Elbein, A. D., Pan, Y. T., Solf, R. & Vosbeck, K. Effect of swainsonine, an inhibitor of glycoprotein processing, on cultured mammalian cells. *J. Cell. Physiol.* **115**, 265–275 (1983).
50. Elbein, A. D., Dorling, P. R., Vosbeck, K. & Horisberger, M. Swainsonine prevents the processing of the oligosaccharide chains of influenza virus hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* **257**, 1573–1576 (1982).
51. Rose, D. R. Structure , mechanism and inhibition of Golgi a -mannosidase II. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 558–562 (2012).
52. Valencia, J. C. & Hearing, V. J. The Role of Glycosylation in the Control of Processing and Cellular Transport of the Functional Amyloid PMEL17. in *Glycosylation* (2012). doi:10.5772/48265
53. van den Elsen, J. M., Kuntz, D. a & Rose, D. R. Structure of Golgi alpha-mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells. *EMBO J.* **20**, 3008–3017 (2001).
54. Rabouille, C. *et al.* The Drosophila GMII gene encodes a Golgi [alpha]-mannosidase II. *J Cell Sci* **112**, 3319–3330 (1999).
55. Howard, S., He, S. & Withers, S. G. Identification of the active site nucleophile in jack bean alpha-mannosidase using 5-fluoro-beta-L-gulosyl fluoride. *J. Biol. Chem.* **273**,

## Literaturverzeichnis

- 2067–2072 (1998).
56. Gnanesh Kumar, B. S., Pohlentz, G., Schulte, M., Mormann, M. & Siva Kumar, N. Jack bean -mannosidase: Amino acid sequencing and N-glycosylation analysis of a valuable glycomics tool. *Glycobiology* **24**, 252–261 (2014).
  57. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M. & Henrissat, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **42**, (2014).
  58. Bateman, A. *et al.* UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45**, D158–D169 (2017).
  59. Fiaux, H. *et al.* Functionalized pyrrolidine inhibitors of human type II alpha-mannosidases as anti-cancer agents: optimizing the fit to the active site. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 7337–46 (2008).
  60. Moremen, K. W. & Touster, O. Biosynthesis and modification of Golgi mannosidase II in HeLa and 3T3 cells. *J Biol Chem* **260**, 6654–6662 (1985).
  61. Shah, N., Kuntz, D. A. & Rose, D. R. Golgi alpha-mannosidase II cleaves two sugars sequentially in the same catalytic site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 9570–9575 (2008).
  62. Koshland, D. E. STEREOCHEMISTRY AND THE MECHANISM OF ENZYMATIC REACTIONS. *Biol. Rev.* **28**, 416–436 (1953).
  63. Suggs, J. W. Stereoelectronic effects in organic chemistry. *J. Pharm. Sci.* **74**, 499 (1985).
  64. Vasella, A., Davies, G. J. & Böhm, M. Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 619–629 (2002).
  65. Snaith, S. M. Characterization of Jack-Bean alpha-D-Mannosidase as a Zinc Metalloenzyme. *Biochem J* **147**, 83–90 (1975).
  66. Howard, S. *et al.* Human lysosomal and jack bean  $\alpha$ -mannosidases are retaining glycosidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 896–898 (1997).
  67. Howard, S., He, S. & Withers, S. G. Identification of the Active Site Nucleophile in Jack

## Literaturverzeichnis

- Bean alpha -Mannosidase Using 5-Fluoro-beta -L-Gulosyl Fluoride. *J. Biol. Chem.* **273**, 2067–2072 (1998).
68. Kang, M. S. & Elbein, a D. Mechanism of Inhibition of Jack Bean alpha-Mannosidase by Swainsonine. *Plant Physiol.* **71**, 551–554 (1983).
69. Ogawa, S. & Yuming, Y. Synthesis of mannostatins A and B from myo-inositol. *Bioorganic Med. Chem.* **3**, 939–943 (1995).
70. Jeng, W. Y. *et al.* Structural and functional analysis of three  $\beta$ -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *J. Struct. Biol.* **173**, 46–56 (2011).
71. Kacher, Y. *et al.* Acid beta-glucosidase: insights from structural analysis and relevance to Gaucher disease therapy. *Biol. Chem.* **389**, 1361–9 (2008).
72. Farrer, M. J. *et al.* Glucosidase-beta variations and Lewy body disorders. *Park. Relat. Disord.* **15**, 414–416 (2009).
73. He, S. & Withers, S. G. Assignment of sweet almond  $\beta$ -glucosidase as a family 1 glycosidase and identification of its active site nucleophile. *J. Biol. Chem.* **272**, 24864–24867 (1997).
74. Dalziel, M. *et al.* The Relative Activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I Glycosyltransferases Determine O-Glycan Structure and Expression of a Tumor-associated Epitope on MUC1. *J. Biol. Chem.* **276**, 11007–11015 (2001).
75. Wang, Q., Trimbur, D., Graham, R., Warren, R. A. J. & Withers, S. G. Identification of the Acid/Base Catalyst in *Agrobacterium faecalis*  $\beta$ -Glucosidase by Kinetic Analysis of Mutants. *Biochemistry* **34**, 14554–14562 (1995).
76. Gloster, T. M., Madsen, R. & Davies, G. J. Structural basis for cyclophellitol inhibition of a  $\beta$ -glucosidase. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 444–446 (2007).
77. Acta, B., Retardation, M. & Road, T. P-Glucosidase inhibition in murine peritoneal macrophages by conduritol-B-epoxide : an in vitro model of the Gaucher cell David S . Newburg \*, Shaul Yatziv \*\*, Robert H . McCluer. **877**, 121–126 (1986).

## Literaturverzeichnis

78. Jespersen, T. M. *et al.* Isofagomin, ein wirksamer neuer Glycosidaseinhibitor. *Angew. Chemie* **106**, 1858–1860 (1994).
79. Zechel, D. L. *et al.* Iminosugar Glycosidase Inhibitors: Structural and Thermodynamic Dissection of the Binding of Isofagomine and 1-Deoxynojirimycin to  $\beta$ -Glucosidases. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14313–14323 (2003).
80. Heightman, T. D. & Vasella, A. T. Recent Insights into Inhibition, Structure, and Mechanism of Configuration-Retaining Glycosidases. *Angew. Chemie Int. Ed.* **38**, 750–770 (1999).
81. Borges de Melo, E., da Silveira Gomes, A. & Carvalho, I.  $\alpha$ - and  $\beta$ -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron* **62**, 10277–10302 (2006).
82. Lillelund, V. H., Jensen, H. H., Liang, X. & Bols, M. Recent developments of transition-state analogue glycosidase inhibitors of non-natural product origin. *Chem. Rev.* **102**, 515–553 (2002).
83. Kim, C. U. *et al.* Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: Design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 681–690 (1997).
84. Katsilambros, N. *et al.* A double-blind study on the efficacy and tolerance of a new alpha-glucosidase inhibitor in type-2 diabetics. *Arzneimittelforschung*. **36**, 1136–1138 (1986).
85. Compain, P. & Martin, O. R. *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*. *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications* (2008). doi:10.1002/9780470517437
86. Zechel, D. L. & Withers, S. G. Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.* **33**, 11–18 (2000).
87. Paulsen, H. Carbohydrates Containing Nitrogen or Sulfur in the Hemiactal Ring. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **5**, 495–510 (1966).
88. Inouye, S., Tsuruoka, T., Ito, T. & Niida, T. Structure and synthesis of nojirimycin.



## Literaturverzeichnis

- Tetrahedron* **24**, 2125–2144 (1968).
89. Yagi M, Kouno T, Aoyagi Y, M. H. The structure of moranoline, a piperidine alkaloid from *Morus* species. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*. **50**, 571–572 (1976).
90. Hohenschutz, L. D. *et al.* Castanospermine, A 1,6,7,8-tetrahydroxyoctahydroindolizine alkaloid, from seeds of *Castanospermum australe*. *Phytochemistry* **20**, 811–814 (1981).
91. Saul, R., Chambers, J. P., Molyneux, R. J. & Elbein, A. D. Castanospermine, a tetrahydroxylated alkaloid that inhibits  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -glucocerebrosidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **221**, 593–597 (1983).
92. Saul, R., Ghidoni, J. J., Molyneux, R. J. & Elbein, a D. Castanospermine inhibits alpha-glucosidase activities and alters glycogen distribution in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 93–97 (1985).
93. Irvine, F. R. *Woody Plants of Ghana: with special references to their uses*. (Oxford University Press, 1961).
94. Fuhrmann, U., Bause, E., Legler, G. & Ploegh, H. Novel mannosidase inhibitor blocking conversion of high mannose to complex oligosaccharides. *Nature* **307**, 755–758 (1984).
95. Colegate, S., Dorling, P. & Huxtable, C. A Spectroscopic Investigation of Swainsonine: An  $\alpha$ -Mannosidase Inhibitor Isolated from *Swainsona canescens*. *Aust. J. Chem.* **32**, 2257 (1979).
96. Tulsiani, D., Broquist, H. & Touster, O. Marked Differences in the Swainsonine Inhibition of Rat Liver Lysosomal Rat Liver Golgi Mannosidase II, and Jack Bean  $\alpha$ -D-Mannosidase but has no inhibition of several mannosidases is reversible but “quite complex.” Subsequently, Kang and Elbein (*Arch. Biochem. Biophys.* **236**, 427–434 (1985).
97. Tulsiani, D. R. P., Harris, T. M. & Touster, O. Swainsonine inhibits the biosynthesis of complex glycoproteins by inhibition of Golgi mannosidase II. *J. Biol. Chem.* **257**, 7936–7939 (1982).
98. Dorling, P. R., Huxtable, C. R. & Colegate, S. M. Inhibition of lysosomal alpha-mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona*

## Literaturverzeichnis

- canescens. *Biochem. J.* **191**, 649–651 (1980).
99. Hegnauer, R. *Chemotaxonomie der Pflanzen: Band XIb-2: Leguminosae Teil 3: Papilionoideae.* (Birkhäuser Verlag, 2001).
100. Hamaguchi, J. *et al.* Swainsonine reduces 5-fluorouracil tolerance in the multistage resistance of colorectal cancer cell lines. *Mol. Cancer* **6**, (2007).
101. Santos, F. M. *et al.* Increased antitumor efficacy by the combined administration of swainsonine and cisplatin in vivo. *Phytomedicine* **18**, 1096–1101 (2011).
102. You, N. *et al.* Swainsonine inhibits growth and potentiates the cytotoxic effect of paclitaxel in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. in *Oncology Reports* **28**, 2091–2100 (2012).
103. Singh, D. & Kaur, G. The antileukaemic cell cycle regulatory activities of swainsonine purified from *Metarhizium anisopliae* fermentation broth. *Nat. Prod. Res.* **28**, 2044–2047 (2014).
104. Humphries, M. J., Matsumoto, K., White, S. L. & Olden, K. Oligosaccharide modification by swainsonine treatment inhibits pulmonary colonization by B16-F10 murine melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 1752–6 (1986).
105. Sun, J. Y. *et al.* Inhibition of the growth of human gastric carcinoma in vivo and in vitro by swainsonine. *Phytomedicine* **14**, 353–359 (2007).
106. Ren, Z. *et al.* The biosynthesis pathway of swainsonine, a new anticancer drug from three endophytic fungi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 1897–1906 (2017).
107. Liu W, Zhang XB, Li Y, Yang FZ, X. R. Anti-tumor and immune enhancement of swainsonine. *NW Pharm. J* **6**, 258–260 (2006).
108. Leach, A. R. & Gillet, V. J. *An Introduction To Chemoinformatics. An Introduction To Chemoinformatics* (Springer Netherlands, 2007). doi:10.1007/978-1-4020-6291-9
109. Lyne, P. D. Structure-based virtual screening: An overview. *Drug Discov. Today* **7**, 1047–1055 (2002).

## Literaturverzeichnis

110. Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T. & Klebe, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.* **261**, 470–489 (1996).
111. Corbeil, C. R., Williams, C. I. & Labute, P. Variability in docking success rates due to dataset preparation. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **26**, 775–786 (2012).
112. Schneider, N., Lange, G., Hindle, S., Klein, R. & Rarey, M. A consistent description of HYdrogen bond and DEhydration energies in protein-ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **27**, 15–29 (2013).
113. Bindu, P. H., Sastry, G. M., Murty, U. S. & Sastry, G. N. Structural and conformational changes concomitant with the E1-E2 transition in H<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase: A comparative protein modeling study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 312–320 (2004).
114. Hevener, K. E. *et al.* Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. *J. Chem. Inf. Model.* **49**, 444–460 (2009).
115. Cole, J. C., Murray, C. W., Nissink, J. W. M., Taylor, R. D. & Taylor, R. Comparing protein-ligand docking programs is difficult. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **60**, 325–332 (2005).
116. Lee, C.-U. & Grossmann, T. N. Reversible und kovalente Inhibition eines Zielproteins. *Angew. Chemie* **124**, 8829–8831 (2012).
117. Tosco, P. & Lazzarato, L. Mechanistic insights into cyclooxygenase irreversible inactivation by aspirin. *ChemMedChem* **4**, 939–945 (2009).
118. Tóth, L., Muszbek, L. & Komáromi, I. Mechanism of the irreversible inhibition of human cyclooxygenase-1 by aspirin as predicted by QM/MM calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **40**, 99–109 (2013).
119. Goss, P. E., Baker, M. A., Carver, J. P. & Dennis, J. W. Inhibitors of carbohydrate processing: A new class of anticancer agents. *Clin. Cancer Res.* **1**, 935–944 (1995).
120. Bowen, D. *et al.* A preliminary pharmacokinetic evaluation of the antimetastatic immunomodulator swainsonine: clinical and toxic implications. *Anticancer Res.* **13**, 841–844 (1993).

## Literaturverzeichnis

121. Irsheid, L. *New inhibitors of Golgi  $\alpha$ -mannosidase II*. (2018).
122. Hopkins, A. L., Groom, C. R. & Alex, A. Ligand efficiency: A useful metric for lead selection. *Drug Discov. Today* **9**, 430–431 (2004).
123. Ergunes, D., Kumbaraci, V., Karliga, B. & Talinli, N. A New Method For the Synthesis of Bicyclic Pyran Acetals. *J. Heterocycl. Chem.* **44**, 1493–1495 (2007).
124. Pelter, A., Ward, R. & Little, G. Approaches to 2, 6-diaryl-3, 7-dioxabicyclo octane lignans via asymmetric synthesis of dihydro-and tetrahydro-furan derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin ...* 2775–2790 (1990).
125. Ivkovi, A., Matovi, R. & Sai, R. N. Intramolecular Barbier reaction in water: cyclopentane and cyclohexane ring closure. *J.Serb.Chem.Soc.* **67**, 141–148 (2002).
126. E. L. Eliel, M. Manoharan & Pietrusiewicz, K. M. Carbon-13 NMR Spectra of Saturated Heterocycles XI-Tetrahydropyrans (Oxanes). *Org. Mag. Reson.* **21**, 94–107 (1983).
127. Hromatka, O. & Haberl, R. Über das 2,5-Dioxy-1,4-dithian. *Chem. Ber.* **86**, 1088 (1955).
128. Djerassi, C. & Gorman, M. Studies in Organic Sulfur Compounds. VII. 1 Lithium Aluminum Hydride Reduction of Xanthates to Mercaptans. Synthesis of Substituted  $\beta$ -Mercaptoethanols. *J. Am. Chem. Soc.* **I**, 841–844 (1955).
129. Wang, J.-X. *et al.* Sugar-bearing tetraphenylethylene: novel fluorescent probe for studies of carbohydrate-protein interaction based on aggregation-induced emission. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 2219–2226 (2011).
130. Karplus, M. Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2870–2871 (1963).
131. Halgren, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **17**, 490–519 (1996).
132. Bott, H. G. & Harworth, W. N. The structure of carbohydrates and their Optical Rotary Power. Part IV. Derivatives of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Methylmannopyranoside. *J. Chem. Soc.* 2653–2659 (1930). doi:10.1002/hlca.19280110166

## Literaturverzeichnis

133. Miethchen, R. & Gabriel, T. Organofluorine compounds and fluorinating agents. Part 11. Glycosyl fluorides from acetal-protected sugars. *J. Fluor. Chem.* **67**, 11–15 (1994).
134. Juchum, M. SYNTHESE UND TESTUNG BIZYKLISCHER ACETALE ALS POTENTIELLE GLYCOSIDASE-INHIBITOREN. (2012).
135. Helferich, B. & Werner, J. Über die Verfestigung der Glykosid-Bindung durch Anhydrid-Bildung. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.* **75**, 949–951 (1942).
136. Böhm, H. J. The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **8**, 243–256 (1994).
137. Jonas, D. Synthese potentieller Glycosidase-Inhibitoren. (Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2017).
138. Courcot, B. & Bridgeman, A. J. Modeling the interactions between polyoxometalates and their environment. *J. Comput. Chem.* **32**, 3143–3153 (2011).
139. Scholz, C., Knorr, S., Hamacher, K. & Schmidt, B. DOCKTITE-A highly versatile step-by-step workflow for covalent docking and virtual screening in the molecular operating environment. *J. Chem. Inf. Model.* **55**, 398–406 (2015).
140. Wang, L., Maniglia, C. A., Mella, S. L. & Sartorelli, A. C. JV-(Substituted-phenyl)-D-glycopyranosylamines and Their O-Acetyl Derivatives as Potential Modifiers of the Formation of Glycosaminoglycans. *J. Med. Chem.* **26**, 1323–1326 (1983).
141. Overhauser, A. W. Polarization of Nuclei in Metals. *Phys. Rev.* **92**, 411–415 (1953).
142. Anet, F. A. L. L. & Bourn, A. J. R. R. Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments from Nuclear Overhauser Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 5250–5251 (1965).
143. Capelli, S. C., Bürgi, H. B., Dittrich, B., Grabowsky, S. & Jayatilaka, D. Hirshfeld atom refinement. *IUCrJ* **1**, 361–379 (2014).
144. Labute, P. & Santavy, M. Locating Binding Sites in Protein Structures.

## Literaturverzeichnis

145. Soga, S., Shirai, H., Kobori, M. & Hirayama, N. Use of Amino Acid Composition to Predict Ligand-Binding Sites. *J. Chem. Inf. Model.* **47**, 400–406 (2007).
146. Volkamer, A., Kuhn, D., Grombacher, T., Rippmann, F. & Rarey, M. Combining Global and Local Measures for Structure-Based Druggability Predictions. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 360–372 (2012).
147. Lehmann, J. *Lehmann, J. 1976. Chemie der Kohlenhydrate. Monosaccharide u. Derivate. Thieme, Stuttgart.* (Thieme, 1976).
148. Rodebaugh, R. & Fraser-Reid, B. Evidence for cyclic bromonium ion transfer in electrophilic bromination of alkenes: Reaction of  $\omega$ -alkenyl glycosides with aqueous N-bromosuccinimide. *Tetrahedron* **52**, 7663–7678 (1996).
149. Touisni, N. *et al.* Glycosyl coumarin carbonic anhydrase IX and XII inhibitors strongly attenuate the growth of primary breast tumors. *J. Med. Chem.* **54**, 8271–8277 (2011).
150. Andersch, J. & Bols, M. Efficient synthesis of isofagomine and noeuromycin. *Chemistry* **7**, 3744–7 (2001).
151. EP1860101 (A1) — 2007-11-28. 1–35 (2007).
152. Tsuda, Y., Hanajima, M., Matsuhira, N., Okuno, Y. & Kanemitsu, K. Regioselective Mono-oxidation of Non-protected Carbohydrates by Brominolysis of the Tin Intermediates. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2344–2350 (1989).
153. Overkleeft, H. S. & Pandit, U. K. A Facile Transformation of Sugar Lactones to Azasugars. *Tetrahedron* **50**, 4215–4224 (1994).
154. Rajanikanth, B. & Seshadri, R. B. Rajanikanth and R. Seshadri Department. *Tetrahedron Lett.* 755–758 (1989).
155. Bisswanger, H. Enzyme assays. *Perspect. Sci.* **1**, 41–55 (2014).
156. McNaught, A. D. & Wilkinson, A. *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology.* **1077**, (Blackwell Scientific Publications, 1997).
157. Copeland, a. R. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data*

## Literaturverzeichnis

- Analysis. Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki* (2000).  
doi:10.1002/0471220639
158. Yung-Chi, C. & Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108 (1973).
159. Coleman, D. J. *et al.* A long-wavelength fluorescent substrate for continuous fluorometric determination of  $\alpha$ -mannosidase activity: Resorufin  $\alpha$ -d-mannopyranoside. *Anal. Biochem.* **399**, 7–12 (2010).
160. Strachan, H. A. Expression, purification and characterization of *Drosophila Melanogaster* orthologous to *Drosophila Melanogaster* Golgi Mannosidase II. (2009).
161. Brooks, H. B. *et al.* Basics of Enzymatic Assays for HTS. *Assay Guid. Man.* 3–4 (2012).  
doi:NBK92007
162. Li, Y.-T. Studies on the Glycosidases in Jack Bean Meal: I. ISOLATION AND PROPERTIES OF  $\alpha$ -MANNOSIDASE. *J. Biol. Chem.* **242**, 5474–5480 (1967).
163. Dale, M. P., Ensley, H. E., Kern, K., Sastry, K. A. R. & Byers, L. D. Reversible Inhibitors of  $\beta$ -Glucosidase. *Biochemistry* **24**, 3530–3539 (1985).
164. Hudlicky, T., Rouden, J., Luna, H. & Allen, S. Microbial Oxidation of Aromatics in Enantiocontrolled Synthesis. 2.1 Rational Design of Aza Sugars (endo-Nitrogenous). Total Synthesis of (+)-Kifunensine, Mannojuirimycin, and Other Glycosidase Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 5099–5107 (1994).
165. Floyd, N., Vijayakrishnan, B., Koeppe, J. R. & Davis, B. G. Thiyl glycosylation of olefinic proteins: S-linked glycoconjugate synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 7798–802 (2009).
166. St-Pierre, G., Dafik, L., Klegraf, E. & Hanessian, S. Stereocontrolled Synthesis of Phenolic  $\alpha$ -d-Glycopyranosides. *Synth.* **48**, 3575–3588 (2016).
167. Su, Y., Xie, J., Wang, Y., Hu, X. & Lin, X. Synthesis and antitumor activity of new shikonin glycosides. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 2713–2718 (2010).

## Literaturverzeichnis

168. Wei, X. *et al.* An improved Helferich method for the  $\alpha/\beta$ -stereoselective synthesis of 4-methylumbelliferyl glycosides for the detection of microorganisms. *Molecules* **20**, 21681–21699 (2015).
169. Wang, W., Liu, H., Xu, S. & Gao, Y. Esterification Catalysis by Pyridinium p-Toluenesulfonate Revisited-Modification with a Lipid Chain for Improved Activities and Selectivities. *Synth. Commun.* **43**, 2906–2912 (2013).
170. Jung, M. E., Toyota, A., de Clercq, E. & Balzarini, J. Synthesis and Biological Activity of a Series of Methylene-Expanded Oxetanocin Nucleoside Analogues. *Monatshefte für Chemie / Chem. Mon.* **133**, 499–520 (2002).
171. Kruger, A., Pyplo-Schnieders, J., Redlich, H. & Winkelmann, P. 2-haloethyl 1-thioglycosides as new tools in glycoside syntheses. Part 1: Preparation, characteristics, general reactions. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **69**, 1843–1876 (2004).
172. Schetlick, K. *Organikum*. (Wiley-VCH, 2009).
173. Capaccio, C. A. I. & Varela, O. Synthesis of Optically Active 2-Alkoxy-2H-pyran-3 (6H) -ones . Their Use as Dienophiles in Diels-Alder Cycloadditions. *J. Org. Chem.* **66**, 8859–8866 (2001).
174. Kulkarni, M. G. *et al.* Synthesis of (+)-isofagomine. *Tetrahedron Asymmetry* **23**, 1234–1237 (2012).
175. Giordano, M. & Iadonisi, A. Tin-mediated regioselective benzylation and allylation of polyols: Applicability of a catalytic approach under solvent-free conditions. *J. Org. Chem.* **79**, 213–222 (2014).
176. Wei, P. *et al.* Iodine Monochloride (ICl) as a Highly Efficient, Green Oxidant for the Oxidation of Alcohols to Corresponding Carbonyl Compounds. *Synth. Commun.* **45**, 1457–1470 (2015).
177. Sawada, D., Takahashi, H. & Ikegami, S. Efficient synthesis of 1-deoxy-azasugars as useful synthetic tools. *Tetrahedron Lett.* **44**, 3085–3088 (2003).
178. Singh, A., Kim, B., Lee, W. K. & Ha, H. J. Asymmetric synthesis of 1-deoxyazasugars from chiral aziridines. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 1372–1380 (2011).



## Literaturverzeichnis

179. Knight, J. G. & Tchabanenko, K. Total synthesis of deoxymannojirimycin and D-mannolactam via carbonylation of 5-vinyloxazolidin-2-ones. *Tetrahedron* **59**, 281–286 (2003).
180. JOSEPH, G. *et al.* ANTIBACTERIAL SULFONE AND SULFOXIDE SUBSTITUTED HETEROCYCLIC UREA COMPOUNDS. 1–73 (2009).
181. Cheuka, P. M., Cabrera, D. G., Paquet, T. & Chibale, K. Structure-activity relationship studies of antiplasmodial aminomethylthiazoles. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **24**, 5207–5211 (2014).

# Lebenslauf

## 10 Lebenslauf

[REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]