

**Entwicklung von Fluoreszenzpolarisations-
Sonden und affinitätsbasierten Photomarkierern
für Sialyltransferasen sowie
HT-Screening einer Sialyltransferase**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

JOHANNES JONAS PREIDL

aus Berlin

Berlin 2011

Die Promotionsarbeit wurde im Zeitraum vom März 2007 bis Juli 2011 unter der Leitung von Prof. Jörg Rademann am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP-Berlin) durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Jörg Rademann
2. Gutachter: Prof. Hans-Ulrich Reißig

Disputation am 24.10.2011

Danksagung

Für das sehr interessante Thema und die Betreuung meiner Promotionsarbeit danke ich meinem Doktorvater Prof. Jörg Rademann. Bei Herrn Reißig möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Anne Harduin-Lepers und Philippe Delanoy der französischen Universität Lille¹ danke ich für die Vollängen-Sialyltransferasen. Für die Ratschläge sowie die Möglichkeit, die Geräte der Screening Unit zu nutzen, danke ich Dr. Jens von Kries. Besonders möchte ich mich bei Carola Seyffarth, Dr. Martin Neuenschwander und Dr. Edgar Specker für die Hilfe bei der Durchführung des Screens, Chris Eckert für die Einweisung in die SDS-Page und Christoph Erdmann für die Einweisung in die Screening Unit bedanken.

Für die Unterstützung am NMR danke ich Dr. Peter Schmieder, Brigitte Schlegel und Monika Beerbaum und bei Michael Lisurek bedanke ich mich für die Docking Experimente. Für exakte Massen und NMR-Messungen danke ich außerdem Dr. Andreas Springer und Dr. Andreas Schäfer sowie ihren Mitarbeitern. Bei Dr. Reinhold Zimmer möchte ich mich ganz herzlich für die hervorragende Betreuung während des Studiums und für die Beratungen und Hilfestellungen auch in der Zeit danach bedanken.

Für die konstruktiven und kritischen Anmerkungen möchte ich ganz besonders den Korrekturlesern Katharina Koschek, Dr. Vera Martos, Jörn Saupe, Martin Neuenschwander und Dr. Kai Holland-Nell danken. Meinem Kommilitonen Torsten Schwich danke ich für die Korrektur des Abstracts und die allgemeinen Beratschlagungen und Diskussionen. Für die praktische Unterstützung im Labor danke ich Keven Mallow und meinen Forschungspraktikanten Jason Heier und Stefan Wagner.

Für allerlei Unsinn aber auch fachliche Diskussionen über z.B. die Enantiomerenanreicherung mittels asymmetrischer Zentrifugation gebührt André Horatscheck mein Dank.

Für die tolle Zeit im Labor und außerhalb danke ich Katharina Koschek, André Horatscheck, Dr. Viviane Uryga-Polowy, Franziska Gottschalk, Dr. Gesa Schäfer, Dr. Isabel Fernández, Dr. Kai Holland-Nell, Dr. Boo Geun Kim, Dr. Vera Martos, Keven Mallow, Richard Raz, Dr. Martin Richter, Jörn Saupe, Dr. Sina Meyer, Dr. Stefanie Grosskopf, Dr. Adeeb El-Dahshan, Dr. Samuel Beligny und ganz ganz besonders meiner langjährigen Abzugsnachbarin Dr. Liudmila Perepelitchenko!

Zu guter letzt danke ich meinen Eltern und meiner Familie für die langjährige Unterstützung und dass mir das Interesse an Naturwissenschaften in die Wiege gelegt wurde. Außerdem danke ich _____ und _____ und _____ und _____!
(alle Vergessenen bitte hier eintragen)

Abstract

Whereas primary tumors can often be treated successfully if detected at an early stage, the main reason for malignant tumors being lethal is their capacity to metastasize. Various independent studies showed that a high extent of sialylated cell surface molecules is related to an increased tendency of tumor cells to undergo invasion and formation of metastases. There is also a correlation between an increased expression of sialyltransferases and poor prognoses. However, biomolecular mechanisms responsible for the observed effects have not been studied in great detail due to the lack of appropriate techniques for *in vivo* experiments.

In this work, highly affine fluorescence polarization (FP) probes were developed that bind to sialyltransferases reversibly. This was achieved through modification of a donor substrate based transition state analogon for sialyltransferases with fluorescein. The probes were tested with two mammalin (rST3Gal II and hST6Gal I) and two bacterial (Pd2,6ST(N) and PmST1) sialyltransferases. Furthermore, the probes were used to establish the first fluorescence polarization assay for sialyltransferase suitable for high-throughput. This allows facile testing of inhibitors against sialyltransferases and makes acceptor and donor substrates redundant.

The developed high-throughput fluorescence probe (HT-FP) assay was used to carry out a high-throughput-screening (HTS, > 100 000 compounds/24h) of a sialyltransferase (rST3Gal II) against a library of 28 864 chemical compounds. The assay was found to be robust under HTS conditions and delivered excellent Z-values (> 0.93). The validation of 149 primary hits gave 11 substances that reached the purity and activity threshold, showed higher inhibition potentials than cytidine diphosphate and are promising candidates for the development of new sialyltransferase inhibitors.

The photoreactive benzophenone moiety was incorporated in the fluorescence probes to develop photoaffinity markers. Radiation with UV light allowed affinity based marking of the two mammalin and the two bacterial sialyltransferases. The detection of these markers in SDS gels was carried out by excitation of the fluorescein moiety followed by photography. First attempts to label human full-length sialyltransferases in complex proteomes proved to be promising.

Zusammenfassung

Die Fähigkeit zu metastasieren ist hauptsächlich für die hohe Letalität bösartiger Tumoren, während Primärtumoren bei rechtzeitiger Erkennung oft erfolgreich behandelt werden können. Zahlreiche unabhängige Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Sialylierung von Zelloberflächenmolekülen und der Invasions- und Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen. Außerdem besteht häufig eine Korrelation zwischen einer erhöhten Expression von Sialyltransferasen und einer schlechten Prognose. Jedoch sind die zugrundeliegenden biomolekularen Mechanismen nur wenig erforscht, da es an Werkzeugen für *in vivo* Experimente mangelt.

In dieser Arbeit wurden hochaffine und reversibel bindende Fluoreszenzpolarisations-Sonden (FP-Sonde) für Sialyltransferasen entwickelt, indem ein Donorsubstrat-basierter Übergangszustandsanaloger Inhibitor von Sialyltransferasen mit Fluorescein markiert wurde. Die Sonden wurden mit zwei Säugetier- (rST3Gal II und hST6Gal I) sowie zwei bakteriellen Sialyltransferasen (Pd2,6ST(N) und PmST1) getestet. Mit ihnen wurde der erste Fluoreszenzpolarisations-Assay (FP-Assay) für Sialyltransferasen etabliert, der Hochdurchsatz-fähig ist. Dies erlaubt das schnelle und einfache Testen von Inhibitoren gegen Sialyltransferasen und macht darüber hinaus Akzeptor- und Donorsubstrat überflüssig.

Mit dem entwickelten Hochdurchsatz-FP-Assay (HT-FP-Assay) wurde erstmalig ein Hochdurchsatz-Screen (HTS, > 100.000 Compounds/24 h) einer Sialyltransferase (rST3Gal II) gegen eine umfangreiche chemische Bibliothek, bestehend aus 28.864 Substanzen, durchgeführt. Der HT-FP-Assay erwies sich unter HTS-Bedingungen als überaus robust mit exzellenten Z-Werten (> 0.93). Die Validierung von 149 Primärhits ergab 11 Substanzen, die den Schwellenwert für die Aktivität und Reinheit erreichten und ein höheres Inhibitionspotential als Cytidindiphosphat aufwiesen. Sie stellen vielversprechende Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Sialyltransferaseinhibitoren dar.

Durch Einbau einer photoreaktiven Benzophenongruppe in die FP-Sonden wurde ein Photoaffinitätsmarker entwickelt. Die Bestrahlung mit UV-Licht (~ 366 nm) erlaubte die affinitätsbasierte Markierung der beiden Säugetier- und der beiden bakteriellen Sialyltransferasen. Die Detektion der Markierungsprodukte in SDS-Gelen erfolgte durch Anregung des Fluoresceinrestes gefolgt von Fotografie. Erste Experimente, Vollständig-Sialyltransferasen auch in komplexen Proteomen zu markieren, waren vielversprechend.

Inhaltsverzeichnis

I. Allgemeiner Teil	IX
1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil	3
2.1. Einführung in die Glycobiologie	3
2.2. Sialinsäuren	6
2.3. Sialyltransferasen	8
2.4. Sialyltransferasen und Metastase	18
2.5. Fluoreszenzpolarisationsassays	25
2.6. Photoaffinitätsmarker für die Proteomanalyse	28
3. Zielsetzung und Planung der Arbeit	31
II. Ergebnisse und Diskussion	33
4. Entwicklung einer FP-Sonde für Sialyltransferasen	35
4.1. Design der Fluoreszenzpolarisations-Sonden	35
4.2. Synthese diastereomergemischter fluoresceinmarkierter Inhibitoren	37
4.3. Stereoselektive Synthese fluoresceinmarkierter Inhibitoren	44
4.4. Synthese unmarkierter Inhibitoren	54
5. Entwicklung eines HT-fähigen FP-Assays für Sialyltransferasen	57
5.1. Theorie von Fluoreszenzpolarisations-Assays	58
5.2. Assaydurchführung	63
5.3. Direkter FP-Bindungsassay	64
5.4. FP-Verdrängungsassay	74

5.5. Ergebnisse der HT-FP-Assay Entwicklung	80
6. Fluoreszenzpolarisation-basiertes HT-Screening einer Sialyltransferase	83
6.1. Primärscreen	83
6.2. Hit-Validierung	91
6.3. Selektion der Leitstrukturen	96
6.4. Ergebnisse des Screenings	96
7. Entwicklung von Photomarkierern für Sialyltransferasen	99
7.1. Design der Photomarkierer	99
7.2. Synthese der Photoaffinitätsmarker	101
7.3. FP-Bindungsassay der PAL-Sonden	106
7.4. Photomarkierungsexperimente	109
7.5. Ergebnisse der Photomarkiererentwicklung	122
8. Zusammenfassung	123
8.1. FP-Sondenentwicklung	123
8.2. Entwicklung des Hochdurchsatz FP-Assays	125
8.3. HT-Screening einer Sialyltransferase	127
8.4. Entwicklung der Photomarkierer	129
8.5. Ausblick	131
III. Experimenteller Teil	133
9. Chemische Synthesen	135
9.1. Materialien und Methoden	135
9.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAVs)	138
9.3. Reagenzien und Edukte	141
9.4. Synthese der diastereomergemischten FP-Sonden	146
9.5. Synthese der diastereomerreinen FP-Sonden	167
9.6. Synthese unmarkierter Inhibitoren	192
9.7. Synthese der PAL-Sonden	197
10. Fluoreszenzpolarisationsassays	215
10.1. Materialien und Methoden	215
10.2. FP-Bindungsassays	216

10.3. FP-Verdrängungsassays	216
10.4. Einfluss von DMSO auf die FP-Verdrängungsassays	217
11. HT-Screening der rST3Gal II	219
11.1. Materialien und Methoden	219
11.2. Primärscreen	219
11.3. Validierung	220
12. Photomarkierungsexperimente	221
12.1. Materialien und Methoden	221
12.2. Allgemeine Vorschrift	222
12.3. Photomarkierung gereinigter Sialyltransferasen	223
12.4. Photomarkierung von Sialyltransferasen in einem komplexem Proteom .	227
A. Anhang	229
A.1. Spektren	229
A.2. Formeln für die K_i -Berechnung	269
A.3. Screening	271
A.4. Photomarkierung - Gelbilder	280
Literaturverzeichnis	292

Abkürzungsverzeichnis

A	Anisotropie
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
All	Allyl
AS	Aminosäuren
AU	Arbitrary Unit
BMT	5-Benzylthio-1 <i>H</i> -tetrazol
Bn	Benzyl
BP	Benzophenon
Bpa	Benzoylphenylalanin
cDNA	komplementäre DNS
DCM	Dichlormethan
DMB	1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol
DMP	Dess-Martin-Periodinan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4-Dimethoxytrityl
EDC-HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
EE	Essigsäureethylester
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELLA	Enzyme-linked lectin assay

ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
Flu/Fluo	Fluorescein
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FP	Fluoreszenzpolarisation
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FTICR	Fourier transform ion cyclotron resonance
G	Glycin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GP	Glycoprotein
Hex	Hexan
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HT-Assay	High-Throughput
HTS	High-Throughput-Screening
i.V.	Im Vakuum
Kdn	2-Keto-3-desoxy-nonulonsäure
LC	Liquid-Chromatography
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MTPA	α -Methoxy- α -trifluormethylphenylsäure
NaHMDS	Sodium hexamethyldisilazane
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule

Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	<i>N</i> -Glycolylneuraminsäure
O-GP	O-Glycosylprotein
P	Polarisation
PAL	Photoaffinity Labeling
Ph	Phenyl
Poly-LN	Poly- <i>N</i> -acetyllactosamin
ppm	Parts per million
PSA	Polysialinsäure
R	Arginin
RFU	Relative fluorescence unit
RT	Raumtemperatur
SAR	Structure-Affinity-Relationship
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese
SNA	<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin
TEAB	Triethylammoniumbicarbonatpuffer
TFA	Trifluoressigsäure
Tfmd	3-Trifluormethyl-3-phenyldiazirin
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time-of-flight
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
uHTS	ultra-High-Throughput-Screening
UV	Ultraviolett
W	Tryptophan

Teil I.

Allgemeiner Teil

1. Einleitung

Die Fähigkeit bösartiger Tumoren aus ihrem Verband auszuwandern und in fremden Geweben Metastasen zu bilden, ist massgeblich für ihre Letalität verantwortlich. Während Primärtumoren bei frühzeitiger Erkennung oft erfolgreich operativ und mit Radio- oder Chemotherapie behandelt werden können, verbleibt die Heilung von metastasiven Krebserkrankungen eine große Herausforderung der Onkologie^[1]. Die molekularen und zellulären Mechanismen der Tumorausbreitung sind daher Gegenstand intensiver Forschungsanstrengungen, die Metstasierung besser vorhersagen, identifizieren und heilen zu können^[2].

Zahlreiche Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Sialylierung von Zelloberflächenmolekülen und der Invasions- und Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen, die häufig mit einer erhöhten Sialyltransferasenaktivität einhergeht. Die zugrundeliegenden Mechanismen, mit denen sialylierte Strukturen das Zellverhalten modulieren, sind bisher jedoch unzureichend erforscht^[3].

Der Grund dafür ist der Mangel an geeigneten Werkzeugen zur Untersuchung der Struktur-Funktions-Beziehungen im lebenden Organismus. Dies war die Motivation für die Entwicklung zahlreicher und sehr effizienter Inhibitoren für Sialyltransferasen innerhalb der vergangenen zwei Jahrzehnte. Sie basieren überwiegend auf Cytidinmonophosphat, so dass die für *in vivo* Untersuchungen notwendige Zellpermeabilität nicht gewährleistet ist. Alleinige Ausnahme stellen das weniger potente, aber zellgängige Soyasaponin I^[4] und die daraus abgeleiteten Litocholderivate^[5,6] dar. Jüngste *in vivo* Untersuchungen mit einem der Litocholderivate zeigten, dass mit Inhibitoren der Sialyltransferasen die Metastasierung von Krebszellen hemmbar ist^[6]. Dies bestätigt, dass Sialyltransferaseinhibitoren zur Aufklärung der Beteiligung der Sialyltransferasen an dem Prozess der Metastasierung geeignet sind und möglicherweise auch als Grundlage für eine Therapieentwicklung dienen könnten.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Einführung in die Glycobiologie

2.1.1. Glycokonjugate

Glycokonjugate spielen fundamentale Rollen in sehr unterschiedlichen Prozessen wie der Immunantwort, der interzellulären Erkennung und der Proteinfaltung^[7-9]. Der Begriff umfasst Oligosaccharidstrukturen (Glycane), die meist kovalent an Lipide oder Proteine (Glycolipide und Glycoproteine) gebunden sind. Glycane können sowohl schützende Funktionen haben und z.B. das Polypeptid-Rückgrad eines Glycoproteins vor der Erkennung durch Proteasen und Antikörper verbergen, als auch als Bindungsstellen für Protein-Rezeptoren (Lektine und Selektine) dienen. Diese Wechselwirkungen bilden die Grundlagen vieler biologischer Prozesse wie der Zelladhäsion und Zell-Zell-Kommunikation, dem intrazellulären Transport von Glycoproteinen, Adhäsions- und Infektionsprozessen bei Viren und Bakterien sowie der Tumormetastasis^[10]. Die Glycosylierung von Enzymen ist für Zellen neben der Expression und Phosphorylierung eine weitere Möglichkeit der Aktivitätsregulation^[11,12]. Für den Aufbau der Glycane werden überwiegend nur eine kleine Auswahl der in der Natur vorkommenden Monosaccharid-Bausteine verwendet (Abbildung 2.1 A), die zusätzlich modifiziert sein können (z. B. phosphoryliert, sulfatiert, methyliert oder *N/O*-acetyliert). Dennoch sind selbst kleine Strukturen durch die Oligofunktionalität der Saccharide äußerst komplex und können nicht vorhergesagt werden, da ihre Sequenzen ein sekundäres Genprodukt sind.

Die Mehrzahl der Glycokonjugate lassen sich in *N*- und *O*-Glycoproteine und Glycolipide einteilen, deren Glycanketten aus wenigen bis hin zu hunderten Zuckereinheiten bestehen können. In *N*-Glycoproteinen ist eine allen gemeinsame pentasaccharidische Kernstruktur *N*-glycosidisch an die Seitenkette eines Asparaginrestes gebunden. Durch weitere Zuckeranheftungen an die Kernstruktur werden zunächst die drei Klassen der *N*-Glycane *Oligomannose*, *Complex* und *Hybrid* gebildet (Abbildung 2.1 B), von denen ausgehend sich die Oligosaccharidketten antennenartig weiterverzweigen. *O*-Glycane

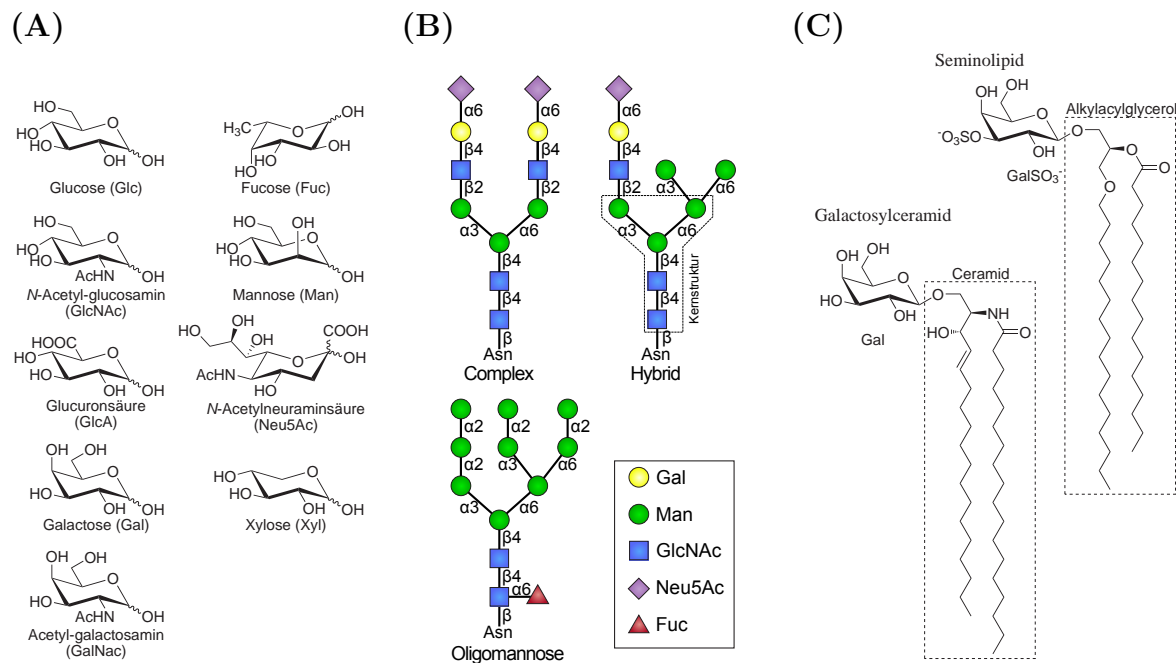


Abb. 2.1.: (A) Die häufigsten in Glycokonjugaten vorkommenden Monosaccharide; (B) Die drei Typen der *N*-Glycane; (C) Strukturen eines Glycosphingolipides (GalCer) und eines Glycoglycerolipides (Seminolipid).^[13]

beginnen in der Regel mit einem α -GalNAc-Rest, der an Serin oder Threonin gebunden ist und die Basis zahlreicher Kernstrukturen bildet. Die wichtigsten Träger sind hochglycosylierte Mucine, die zahlreiche Glycosylierungsstellen aufweisen. Glycolipide bestehen aus 1,2-Di-*O*-Diacylglycerin (Glycoglycerolipide) oder *N*-Acylsphingosin (Glycosphingolipide), an die *O*-glycosidisch mehrere Mono- oder Oligosaccharide gebunden sind (Abbildung 2.1 C). Alle sialylierten Glycosphingolipide werden als Ganglioside bezeichnet.

2.1.2. Biosynthese von Glycokonjugaten

Der *N*-Glycanaufbau beginnt im Endoplasmatischen Reticulum (ER) mit der kotranslationalen Übertragung des Vorläufersaccharid $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ von Dolicholphosphat auf ein Asparagin des naszierenden Polypeptides im Lumen des ER. Durch weitere Prozessierungen mit Glycosidasen und Transglycosidasen sowie den Transfer in den Golgi-Apparat wird das Vorläufersaccharid getrimmt und auf der Basis der Kernstruktur die Typen *Oligomannose*, *Complex* und *Hybrid* aufgebaut. Der weitere Glycanaufbau erfolgt im trans-Golgi-Kompartiment und die endgültige Struktur der Glycane

hängt von der Verweilzeit der Glycoproteine im ER und Golgi-Apparat-Netzwerk sowie den Aktivitäten der beteiligten Glycosyltransferasen ab. Daraus ergibt sich die für die Glycanstrukturen typische Mikroheterogenität^[14]. Der *O*-Glycanaufbau findet posttranslational im Golgi-Apparat statt und beginnt mit dem Transfer eines *N*-Acetylgalactosaminrestes auf ein Serin oder Threonin des Proteinrückgrats. Nach Abschluss des Glycanaufbaus werden die Glycoproteine sekretiert oder zu der Plasmamembran transportiert.

Der Aufbau der Glycosphingolipide erfolgt schrittweise im ER und beginnt mit der Knüpfung von Glucose oder Galactose an Ceramid. Nach Transport in den Golgi-Apparat werden durch Glycosyltransferasen weitere Zucker angeheftet.

2.1.3. Glycosyltransferasen

Die Glycosyltransferasen katalysieren die Bildung der glycosidischen Bindungen und übertragen eine Monosaccharideinheit von einem aktivierten Donorzucker (UDP-Glu/Glc/Gal/GlcNAc/GalNAc/GlcA/Xyl, GDP-Man/Fuc und CDP-Neu5Ac) stereo- und regiospezifisch unter Inversion oder Retention der Stereochemie des anomeren Kohlenstoffs auf ein Akzeptorsubstrat (Oligosaccharide, Proteine, Lipide, etc.)^[10]. Die Glycosyltransferasen agieren sequenziell und überwiegend strikt verknüpfungs-, donorsubstrat- und akzeptorsubstratspezifisch. Das Produkt einer Zuckeranheftung kann wiederum das Akzeptorsubstrat für eine weitere Glycosyltransferase bilden. Die Glycosyltransferasen des ER sind überwiegend Multitransmembranproteine, die im Golgi-Komplex lokalisiert sind dagegen Typ-II Membranproteine. Sie setzen sich aus einem kurzen cytoplasmatischen N-Terminus und einer einzelnen kurzen Signal-Transmembran-Domäne zusammen, gefolgt von einer Stamm-Region und der großen globulären C-terminalen katalytischen Domäne. Wird die Signal-Anker-Domäne durch proteolytische Spaltung entfernt, können Glycosyltransferasen in biologische Flüssigkeiten sekretiert werden^[15,16]. Die 30.000 bekannten Glycosyltransferasesequenzen sind in der CAZy-Datenbank¹ anhand der Homologien ihrer Primärsequenzen in Familien gruppiert. Zwischen Mitgliedern unterschiedlicher Familien liegen keine wesentlichen Sequenzähnlichkeiten vor, aber dennoch gibt es Sequenzmotive, die Glycosyltransferasen gleicher Donorsubstratspezifität miteinander teilen. Die Glycosyltransferasen weisen

¹CAZy: carbohydrate-active enzymes; www.cazy.org

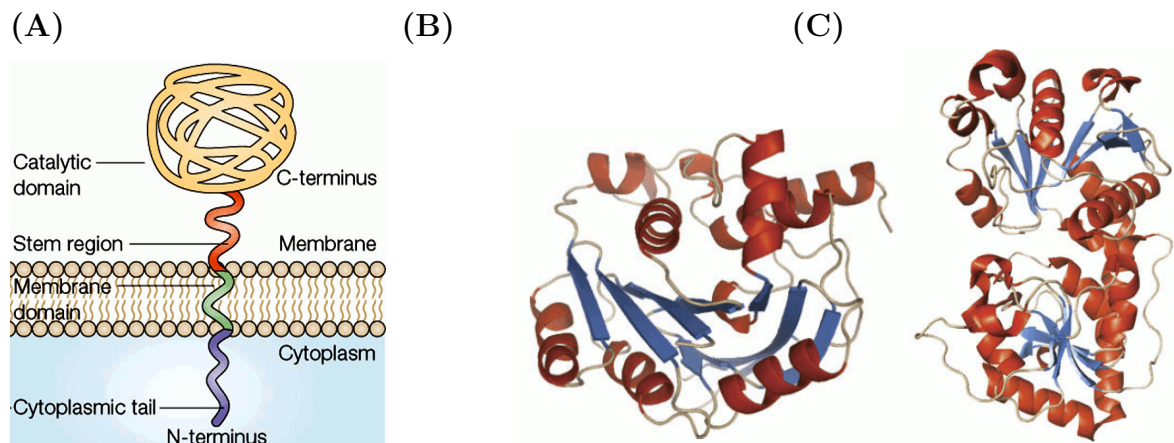


Abb. 2.2.: Typ-II Transmembranproteine: (A) Schematische Struktur der membranassoziierten Proteine und representative Strukturen einer (B) GT-A (SpsA von *Bacillus subtilis*) und (C) GT-B (Bakteriophage T4 β -Glucosyltransferase) gefalteten Glycosyltransferase^[19].

des Weiteren vorwiegend zwei Faltungstypen auf, die als GT-A² und GT-B³ bezeichnet werden.

2.2. Sialinsäuren

Sialinsäuren⁴ repräsentieren eine Zuckerfamilie aus über 50 natürlichen Derivaten der Neuraminsäure mit einer ungewöhnlich variablen chemischen Struktur^[21]. Ihre Strukturbesonderheiten umfassen die Carboxylgruppe (pK_S 2.2) am anomeren Zentrum, die bei physiologischem pH negativ geladen ist, und eine Aminogruppe am C-5, die bei der häufigsten Form, der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), acetyliert ist. Durch Hydroxylierung dieser Acetylgruppe wird die in vielen Tieren auftretende *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) gebildet, deren Biosynthese beim Menschen im Laufe der Evolution vollständig aufgehoben wurde^[22] und nur im Falle bestimmter Krebsarten vorkommt^[23]. Die meisten anderen Sialinsäureformen gehen aus Neu5Ac oder 2-Keto-3-desoxy-nonulonsäure (Kdn) hervor (Abbildung 2.3)^[21].

²Die GT-A haben eine einzelne katalytische Domäne, die Ähnlichkeit zur Rossmann-Faltung (Paar von $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Motiven) aufweist und den Nucleosidphosphatzucker bindet. Sie besitzen ein DXD-Motiv und sind metallionenabhängig (Mn^{2+} oder Mg^{2+})^[17].

³Die GT-B haben zwei sich gegenüberliegende Rossmann-Faltung-ähnliche Domänen, zwischen denen das Akzeptorsubstrat gebunden wird. Das Donorsubstrat wird durch eine carboxyterminale Domäne gebunden. Die GT-B besitzen kein DXD Motiv und sind metallionenunabhängig^[18,19].

⁴Aus dem griechischen: *sialon* für *Speichel*; Entdeckt von G. Blix in Mucinen des Speichels^[20] und von E. Klenk in cerebralen Glycolipiden.

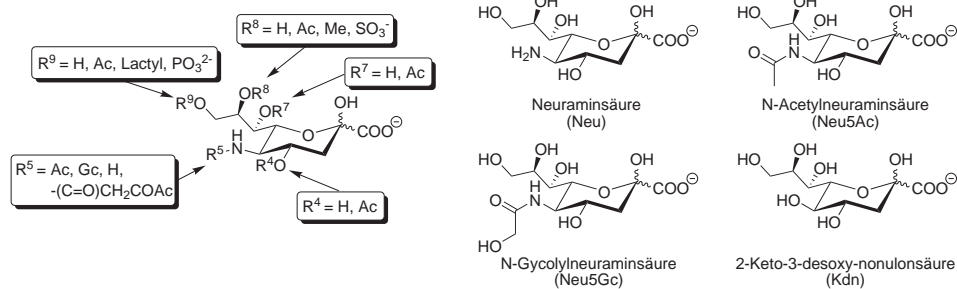


Abb. 2.3.: Derivate der Neuraminsäure.

Die Sialinsäuren sind α 2,3- oder α 2,6-glycosidisch an Galactose, α 2,6-glycosidisch an *N*-Acetylgalactosamin oder α 2,8-glycosidisch an sich selbst gebunden und nehmen die terminale Position der Glycane ein. Nur bei der Oligo- oder Polysialinsäure wird sie in internen Positionen gefunden. Sialinsäurehaltige Glycane treten in den meisten Körperflüssigkeiten, den Zelloberflächen und den Nervenzellen auf. Durch ihre exponierte Position als terminale Saccharide und ihre negative Ladung haben sie massgeblichen Einfluss auf die Eigenschaften ihrer Glycane und weisen eine enorme Funktionsvielfalt auf. Dabei nehmen sie häufig duale Rollen ein. Sie maskieren antigene Strukturen und Rezeptoren und können so Zellen und Moleküle vor Abbau und Erkennung durch das Immunsystem schützen. Andererseits agieren sie selbst als Liganden für zahlreiche mikrobielle oder tierische Lektine. Bei der Immunantwort und Hämostase⁵ sind sie die Schlüsselkomponente bei den Interaktionen von Liganden mit Selektinen und Siglecs⁶ der Leukozyten, Thrombozyten und Endotheliumzellen^[24,25]. Bei der Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe binden die Selektine der Endothelzellen an das Antigen Sialyl Lewis^x⁷, welches von den Leukozyten in hoher Zahl auf ihrer Oberfläche präsentiert wird. Viele pathogene Wirkstoffe wie Toxine (z. B. Cholera toxin^[26]), Viren (z. B. Influenza) und Bakterien (z. B. *Escherichia Coli*, *Helicobacter pylori*) binden ebenfalls über sialinsäurehaltige Rezeptoren an ihre Wirtszellen^[27].

Das Maskieren von Epitopen kann nachteilige Folgen haben, wenn bösartige Zellen durch Übersialylierung dem humoralen und zellulären Verteidigungssystem verborgen bleiben und so ihre Malignität steigern. Auch Mikroorganismen nutzen die Sialylierung, um im Wirtsorganismus länger zu überleben.

⁵Hämostase ist der Prozess der Blutstillung und Blutgerinnung, der bei Verletzungen der Blutgefäße entstehende Blutungen zum Stehen bringt.

⁶Siglec: Sialic acid binding Ig-like Lectins

⁷SiaLe^x: Neu5Ac(α 2,3)-Gal(β 1,4)-[Fuc(α 1,3)]-GlcNAc, gebunden an *O*-Glycane.

2.3. Sialyltransferasen

Sialyltransferasen sind eine Familie der Glycosyltransferasen, die in der Biosynthese von sialylierten Glycolipiden und Glycoproteinen involviert sind. Die Sialyltransferasen katalysieren den Transfer der Sialinsäure vom gemeinsamen Donor CMP-Neu5Ac unter Inversion des anomeren Zentrums auf Akzeptorzuckerstrukturen. Als Mechanismus wird ein direkter Substitutionsmechanismus über einen oxocarbeniumähnlichen Übergangszustand mit Beteiligung einer Base angenommen (Abbildung 2.4 A) [28,29]. Die Informationen aus Mutageneseexperimenten und Kristallstrukturen stützen einen solchen Mechanismus [30–34].

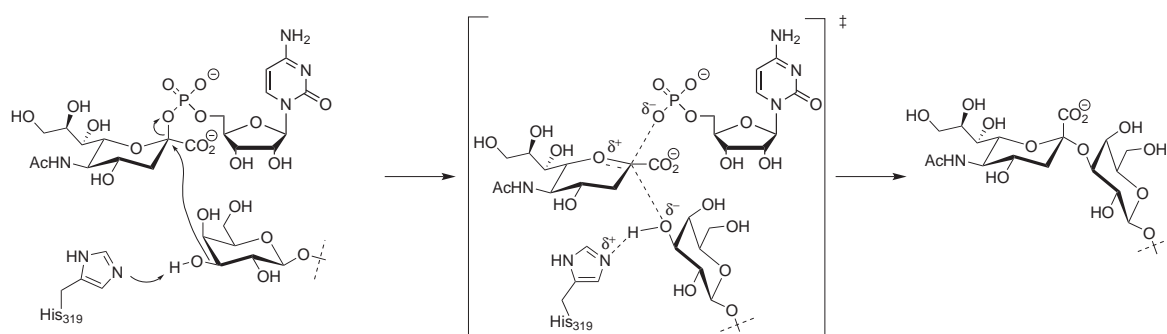


Abb. 2.4.: Wahrscheinlicher Übergangszustand der pST3Gal I mit Histidin als generelle Base.

2.3.1. Aufbau und Struktur der Sialyltransferasen

Die Sialyltransferasen der Wirbeltiere sind gemäß ihrer katalysierten Bindungsknüpfung in vier Familien gruppiert: ST3Gal, ST6Gal, ST6GalNAc und ST8Sia [35]. Sie können bei den Säugetieren in 20 und bei den niederen Wirbeltieren in 25 Unterfamilien unterteilt werden. Wie die meisten Glycosyltransferasen sind die Sialyltransferasen Typ-II Membranproteine (Abbildung 2.2 A) und golgimembrangebunden [36]. Alle bislang identifizierten tierischen Sialyltransferasen sind in die Familie GT29 der CAZy-Datenbank eingeordnet. Dies reflektiert ihre gemeinsame modulare Organisation und Abstammung. Der Sequenzabgleich von klonierten Säugetier-Sialyltransferasen zeigt geringe Gesamtsequenzübereinstimmungen mit der bedeutenden Ausnahme von vier konservierten Peptidmotiven in der katalytischen Domäne, genannt „Sialyl-Motive“ (Abbildung 2.5 A). Die Funktionen der Motive wurden mit ortsspezifischer Mutagenese von konservierten Aminosäureresten [37–42] und der Aufklärung der Struktur der schweini-schen pST3Gal I im Komplex mit CMP und einem Akzeptorzucker (Gal β 1,3GalNAc α -

PhNO₂)^[30], bestimmt. Die pST3Gal I gehört zur GT-A Strukturgruppe, die das Nucleotid CMP in einer tiefen Spalte neben der Rossmann-Faltung bindet. In der Struktur der pST3Gal I im Komplex mit Gal β 1,3GalNAc α -PhNO₂ befindet sich der Stickstoff eines Histidins des Sialylmotivs VS nahe (2.8 Å) der C3 Hydroxylgruppe der Galactose und kann das Akzeptorsubstrat deprotonieren (Abbildung 2.5 B). Dieses wird durch zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen für die Katalyse ausgerichtet. Die invarianten Cysteine der Motive L und S bilden eine Disulfidbrücke, die für die enzymatische Aktivität essentiell ist^[40–42].

- **Sialylmotiv L** (*large*; 48-49 Aminosäuren, 5 strikt konserviert, 1 invariantes Cystein) bindet das Donorsubstrat
- **Sialylmotiv S** (*small*; 23 Aminosäuren, 2 unveränderlich, 1 invariantes Cystein) formt eine α -Helix, dessen positives Helixdipolende auf den negativ geladenen Donorzucker ausgerichtet ist und zur Bindung beitragen kann; eine konservierte Disulfidbrücke fixiert die Ausrichtung der α -Helix zum Sialyl-Motiv L
- **Sialylmotiv III** (4 Aminosäuren, 1 hoch konserviert) ist nahe der Phosphatbindungsstelle lokalisiert (ein Histidin interagiert direkt mit dem Donorphosphat)
- **Sialylmotiv VS** (*very short*; 6 Aminosäuren, 2 hoch konserviert) trägt die katalytische Base Histidin

Die Sialyltransferasen der Prokaryoten sind auf vier GT-Familien verteilt und besitzen zwei kurze konservierte Motive, das D/E-D/E-G und das HP Motiv^[43]. Dies legt den Schluss nahe, dass sich die prokaryotischen Sialyltransferasen unabhängig von denen der Eukaryoten entwickelt haben^[13]. Die Kristallstrukturen der Cst-I¹⁻²⁸⁵^[33] und Δ 32Cst-II^[34] des Bakteriums *Campylobacter Jejuni* zeigen je ein Histidin, welches die Rolle der katalytischen Base zur Deprotonierung der Hydroxylgruppe übernehmen könnte. Sie gehören zwar zur GT-A Strukturgruppe, besitzen aber kein DXD-Motiv und die katalytische Aktivität ist metallionenunabhängig. Die ebenfalls prokaryotischen Sialyltransferasen Δ 24PmST1 von *Pasteurella multocida*^[31,32] und Δ 16psp26ST von *Vibrionaceae Photobacterium* sp. JT-ISH-224^[44] gehören zur GT-B Familie und zeigen eine Asparaginsäure in einer Position, in der sie als katalytische Base fungieren könnte.

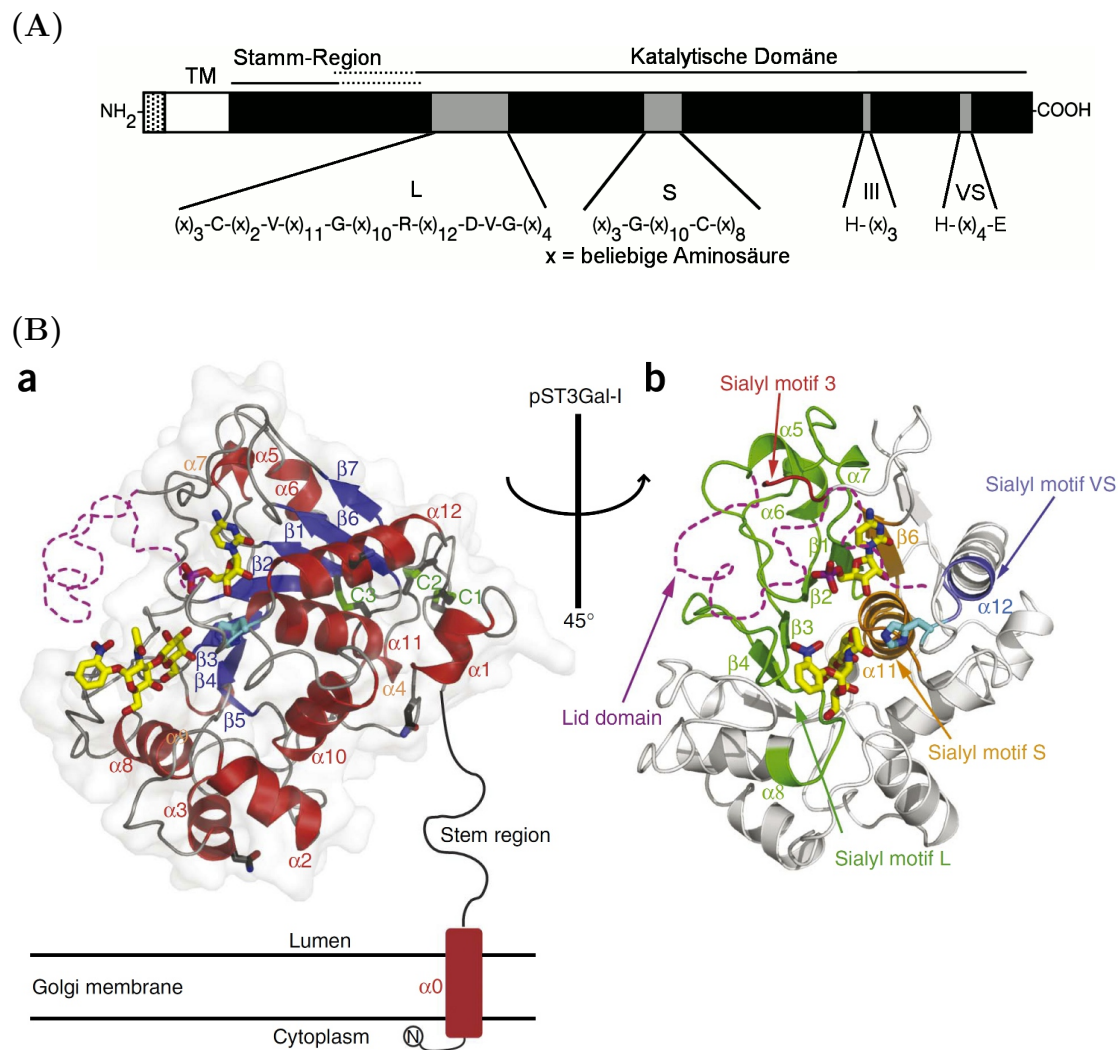


Abb. 2.5.: (A) Domänen-Struktur einer Säugetiersialyltransferase mit den Sialyl-Motiven; (B) pST3Gal I im Komplex mit CMP und dem Disaccharidakzeptor (gelbe Stäbchenmodelle): (a) Schematische Struktur und (b) die vier konservierten Sialylmotive (katalytische Base His319 ist cyan gefärbt) [30].

2.3.2. Sialyltransferaseassays

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurden zahlreiche Assaysysteme für Sialyltransferasen entwickelt (Abbildung 2.6). Grundsätzlich kann dabei zwischen Assays unterschieden werden, die markierte Substrate einsetzen, deren Reaktionsprodukte derivatisiert werden oder die gänzlich ohne Markierungen auskommen. Da es sich ausnahmslos um Aktivitätsassays handelt, werden Donorsubstrat als auch Akzeptorsubstrat benötigt. Als Akzeptorsubstrate genügen kleine Oligosaccharide wie *N*-Acetyllactosamin oder

Glycoproteine, die die entsprechende Akzeptorsaccharidstruktur tragen.

Assays mit markierten Substraten

Die Sialyltransferasen tolerieren modifizierte Donorsubstrate^[45], so dass markierte Sialinsäuren eingesetzt werden können. Alternativ ist eine Markierung der Akzeptoroligosaccharide möglich. Die am häufigsten verwendeten Assays verwenden radiomarkierte (z.B. CMP-^[14C]Neu5Ac)^[46-48] oder farbstoffmarkierte Substrate^[49-55]. Die Farbstoffmarkierung des Akzeptor- oder Donorsubstrates erfolgt mit einem Absorptions- (Benzyl, *p*-Nitrophenyl^[53], 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl^[54]) oder Fluoreszenzmarker (Fluoresceinyl^[50,52,56], 2-Aminopyridin^[49]). Bei beiden Methoden müssen die Produkte der Enzymreaktion von den unreaktierten markierten Substraten getrennt werden. Bei der autoradiographischen Methode erfolgt dies durch Gelfiltration^[46] oder Präzipitation^[47] vom radioaktiven Katalyseprodukt, bevor das Produkt mittels Szintillationsmessung quantifiziert wird. Farbstoffmarkierte Substrate werden per HPLC vom Produkt abgetrennt, dessen Quantifizierung dabei mit einem UV-Detektor möglich ist (Abbildung 2.6 A-I).

Die kontinuierliche Verfolgung der Enzymreaktion ist mit einem FRET-Assay möglich^[57]. Der Donorzucker Sialinsäure wird an der C-9 Position mit einer Naphthylmethylgruppe substituiert und der Akzeptorzucker *N*-Acetyllactosamin trägt eine Dansylgruppe. Durch die Aktion einer Sialyltransferase werden die Fluorophore zu einem FRET-Paar zusammengeführt und die zeitliche Änderung der Fluoreszenz wird detektiert. Einer Reinigung der Reaktionsprodukte bedarf es nicht (Abbildung 2.6 A-II).

Ebenfalls keiner Aufreinigung bedarf ein MALDI-TOF-Massenspektrometrie unterstützter Assay zur Inhibitoridentifizierung^[58]. Die Ionensensitivität wird durch Markierung des Akzeptoroligosaccharids mit Tryptophanylarginin (WR-OCH₃) erhöht und als Referenz dient ein zweites stabiles, isotoopenmarkiertes Substrat (-OCD₃ statt -OCH₃). Hat eine Verbindung einen inhibitorischen Effekt, reduziert sie die Übertragung der Sialinsäure auf das WR-OCH₃-konjugierte Akzeptorsubstrat, während in einem zweiten Ansatz die Sialinsäure ungehemmt auf das isotoopenmarkierte (WR-OCD₃) Akzeptorsubstrat übertragen wird. Die beiden Enzymansätze werden 1:1 gemischt und einer Massenanalyse unterzogen: Durch das Isotoopenlabel sind die Massensignale der gehemmt und ungehemmt gebildeten Produkte separiert und können quantifiziert werden. Aus dem Verhältnis der beiden Massen lässt sich das Maß der Hemmung ermitteln. Diese Verfahren sind sehr empfindliche Methoden, beinhalten aber sehr teure oder modifizierte Substrate, deren Synthesen bisweilen sehr aufwendig ist. Durch die Ver-

änderung der Substrate mit Absorptions- oder Fluoreszenzmarkern kann es zu einer Beeinträchtigung ihrer Affinitäten und kinetischen Parameter kommen^[56].

Assays mit Produktderivatisierung

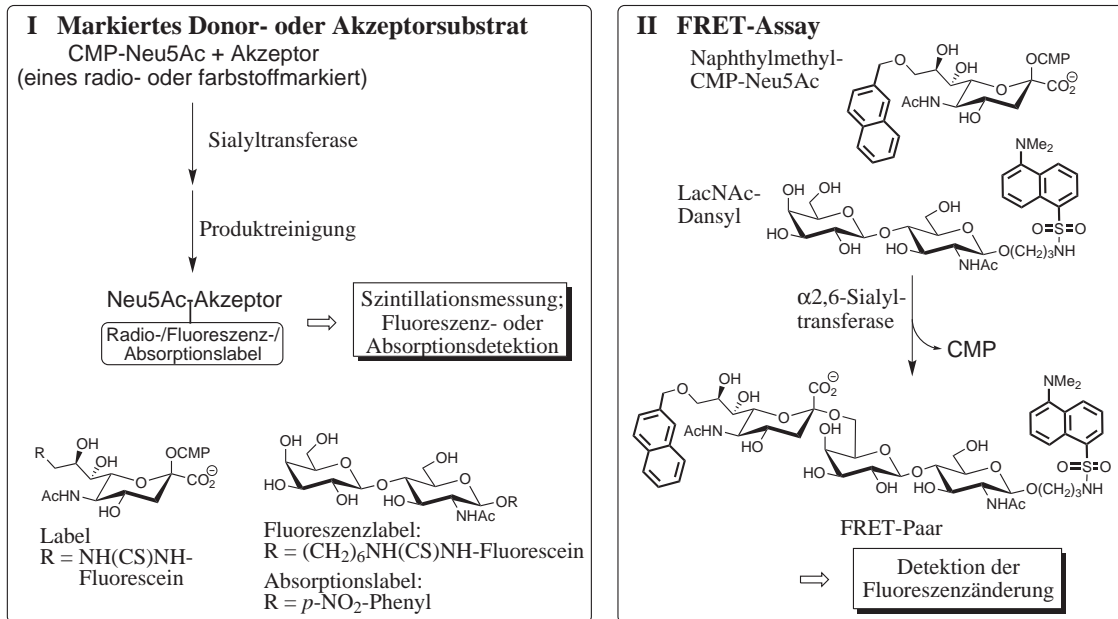
Bei dem kolorimetrischen Assay nach der Thiobarbitursäuremethode^[59,60] werden unmarkierte Substrate eingesetzt. Unreagiertes und hydrolysiertes Donorsubstrat werden mit einem Ionenaustauscher entfernt^[61] und vom verbliebenen Sialosid das Neu5Ac unter saurer Hydrolyse abgespalten. Neu5Ac wird mit dem Fluorophor 1,2-Diamino-4,5-methylen-dioxibenzol (DMB) derivatisiert^[55] und mit einem Fluoreszenzdetektor in einer HPLC quantifiziert. (Abbildung 2.6 B-I). Der Assay erreicht die Sensitivität der Radioisotopmethode.

Assays ohne Markierung

Die Kopplung des Sialyltransfers an die Oxidation von NADH zu NAD⁺ in einem Multienzymassay ermöglicht die direkte kontinuierliche photometrische Verfolgung der Enzymreaktion, ganz ohne Substratmarkierung oder Produktderivatisierung. Die benötigte Nukleotidmonophosphat Kinase ist allerdings kommerziell nicht verfügbar (Abbildung 2.6 B-II)^[62].

Ein lektinbasierender Festphasenassay (enzyme-linked lectin assay (ELLA) – im Konzept dem ELISA-System sehr ähnlich^[63]) ist in der Lage, zwischen den Aktivitäten einer α 2,3- und α 2,6-Sialyltransferase zu unterscheiden. Als Substrate dienen auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisierte Glycoproteinakzeptoren wie Asialofetuin. Die gebildeten α 2,3- oder α 2,6-Sialinsaccharidstrukturen werden spezifisch durch die biotinylierten Lektine *Maackia amurensis* Leukoagglutinin^[64] (für α 2,3-Verknüpfung) und *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA)^[65] (für α 2,6-Verknüpfung) erkannt und mit streptavidinkonjugierten, farb- oder lichtgebenden Enzymen quantifiziert. Bei einer Modifikation des Assays wird das Lektin SNA auf der Oberfläche eines Sensorchips für die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie immobilisiert. Die Reaktionsmischung wird injiziert und die Bindung des Katalyseprodukts an das Lektin gemessen (Abbildung 2.6 B-III). Mit dieser roboterautomatisierten Methode können 150 Assaymischungen in einer Nacht getestet werden^[66], aber der Assay erreicht nicht die Empfindlichkeiten der Radioisotopmethode.

(A) Assays mit Substratmodifikationen



(B) Assays ohne Substratmodifikationen

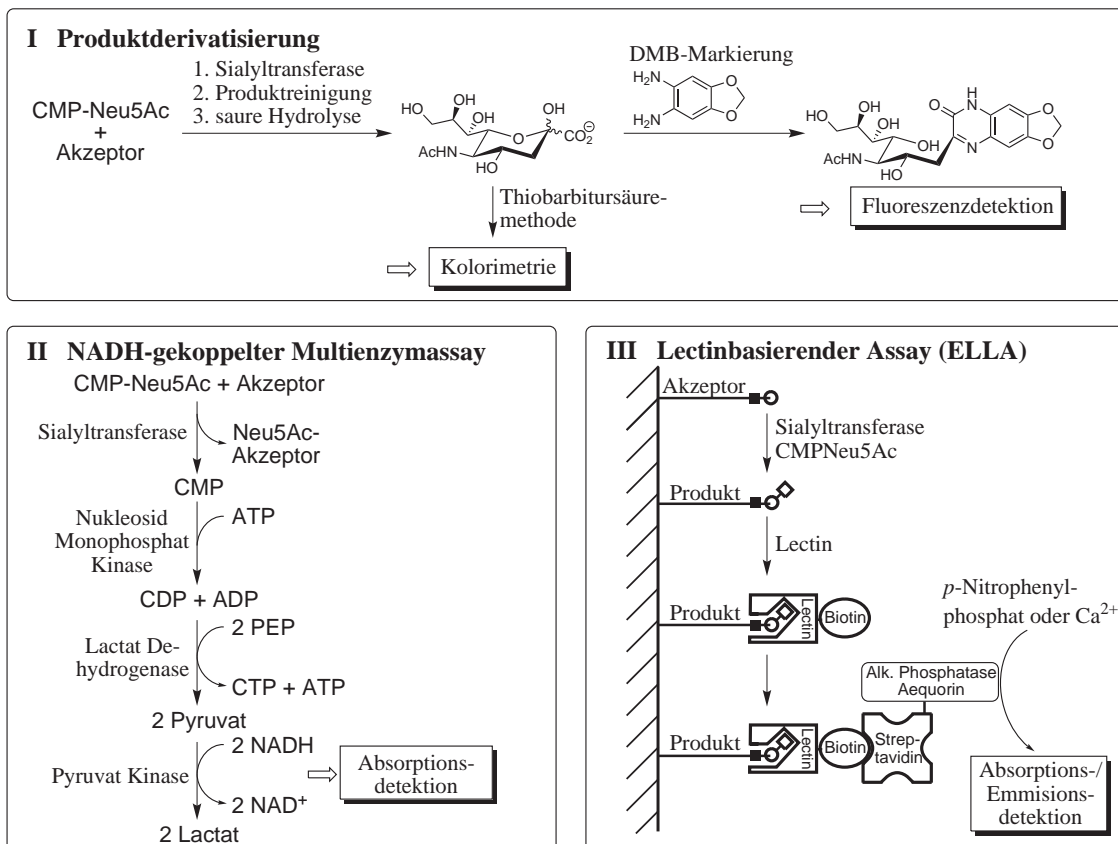


Abb. 2.6.: Verschiedene Aktivitätsassays für die Sialyltransferasen.

2.3.3. Sialyltransferaseinhibitoren

Lange Zeit waren die Nukleotide CMP, CDP und CTP die einzigen bekannten Inhibitoren für Sialyltransferasen^[67]. Mittlerweile sind diverse Inhibitoren für die Sialyltransferasen verfügbar. Deren Entwicklung begann mit Akzeptoranaloga (Verbindungen **i a-c**, Abbildung 2.7) und CDP-Derivaten (Verbindungen **ii a-d**). Erstere zeigen nur schwache Inhibitionskonstanten ($K_i = 760\text{--}4140\ \mu\text{M}$) in der Größenordnung der Stabilitätskonstante des Enzym-Akzeptorsubstrat-Komplexes ($K_M = 900\ \mu\text{M}$)^[68,69]. Die CDP-Modifikationen (**ii a-d**^[29,67,70]) und die Variation der Phosphatgruppe in donor-substratanalogen Verbindungen (**iii- α** und **- β** ^[71,72]) führten zu der Erkenntnis, dass der CMP-Rest für eine hohe Affinität von Inhibitoren zu den Sialyltransferasen essentiell ist^[29,73]. Die Bestandteile Cytosin und Ribose allein haben keinen inhibitorischen Effekt, so dass Cytidin die minimale Einheit darstellt, die von manchen Sialyltransferasen noch erkannt wird^[74]. Der potenteste donoranaloge Inhibitor ist die fluorinierte CMP-3-Fluor-*N*-Acetylneuraminsäure (**iv**)^[75], dessen Inhibitionskonstanten mit einem K_i von $5.7\ \mu\text{M}$ in der Größenordnung der Stabilitätskonstante des Enzym-Donorsubstrat-Komplexes ($K_M = 46\ \mu\text{M}$) liegt.

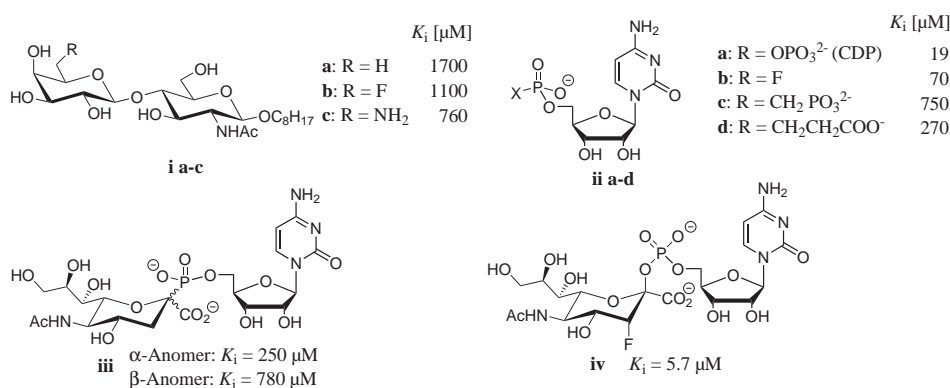


Abb. 2.7.: Akzeptor- und donoranaloge Inhibitoren von α 2,6-Sialyltransferasen: **i**) Akzeptoranaloga, **ii**) CMP-Analoga, **iii**) Donoranalogon mit Phosphatmodifikation, **iv**) Donoranalogon mit unverändertem CMP-Rest.

Eine effektivere Inhibition wird im allgemeinen von Verbindungen erwartet, die konformell dem Übergangszustand des Substrates in der katalysierten Reaktion ähneln. Aus dem postulierten Übergangszustand des Zuckertransfers (Kapitel 2.3) durch die Sialyltransferasen leiteten R. R. SCHMIDT *et al.* drei Strukturmerkmale ab^[76]: 1.) sp^2 Hybridisierung am anomeren Kohlenstoff, 2.) erhöhte Distanz zwischen anomeren Kohlenstoff und CMP-Abgangsgruppe und 3.) mindestens zwei negative Ladungen mit 5

Bindungen Abstand. Das rationale Design dieser Inhibitoren führte zu einer Verbesserung der Affinitäten um das 1000fache gegenüber dem natürlichen Donorsubstrat. Die Synthesen der Inhibitoren basieren auf Sialinsäure^[29] (Verbindung **v**), D-Glucosamin^[77] (Verbindung **vi**) oder Chinasäure^[78] (Verbindung **vii**) und es konnten Inhibitionskonstanten von bis zu $K_i = 0.029 \mu\text{M}$ (Verbindung **vi**) erreicht werden. Die chinasäurebasierten Inhibitoren haben eine stabile, nicht-glycosidische Bindung zum CMP-Rest. Die Verbindung **viii**^[79] repräsentiert einen ganz anderen Ansatz eines Übergangszustandsanalogen Inhibitors. Sie besteht aus einem Bicyclus mit planarem Ringsystem, einer Carboxylatgruppe und dem obligatorischen CMP-Rest. Auch diese Verbindung ist ein Inhibitor von Sialyltransferasen, auch wenn deren Inhibitionskonstante ($K_i = 20 \mu\text{M}$) nur in der Größenordnung von CMP liegt (Abbildung 2.8).

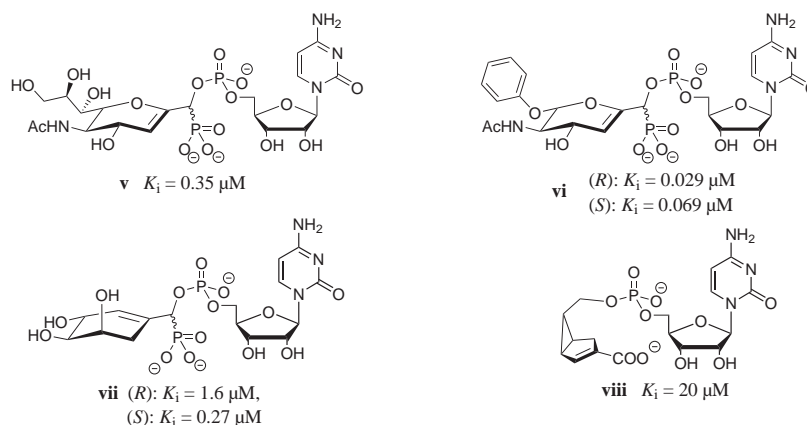


Abb. 2.8.: Übergangszustandsanaloge Inhibitoren von α 2,6-Sialyltransferasen: Synthese basierend auf: **v**) Sialinsäure, **vi**) D-Glucosamin, **vii**) Chinasäure; **viii**) Donoranalogon mit unverändertem CMP-Rest.

Die gewonnenen Erkenntnisse führten zu der Entwicklung enorm vereinfachter, Übergangszustandsanaloger Inhibitoren^[80]. Das planare Glycosylcarbeniumion des Übergangszustandes beim Neu5Ac-Transfer wird durch ein einfaches planares aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem imitiert. Eine α -Hydroxymethylphosphonatgruppe ermöglicht dessen Verknüpfung zum essentiellen CMP-Rest und ist Träger der zweiten negativen Ladung mit fünf Bindungen Abstand zur Ladung des Phosphats (Abbildung 2.9 A). Auf dieser Basis wurden diverse hochpotente α -Hydroxymethylphosphonatderivate mit verschiedenen aromatischen Substituenten hergestellt (Abbildung 2.9 B), deren Inhibitionskonstanten $< 1 \mu\text{M}$ sind. Die aktivste Verbindung **ix-f** erreicht die Potenz des auf D-Glucosamin basierenden Inhibitors **vi**.

Die Grundbausteine dieser Inhibitoren sind Benzaldehyde (**A**) und Phosphonate (**B**),

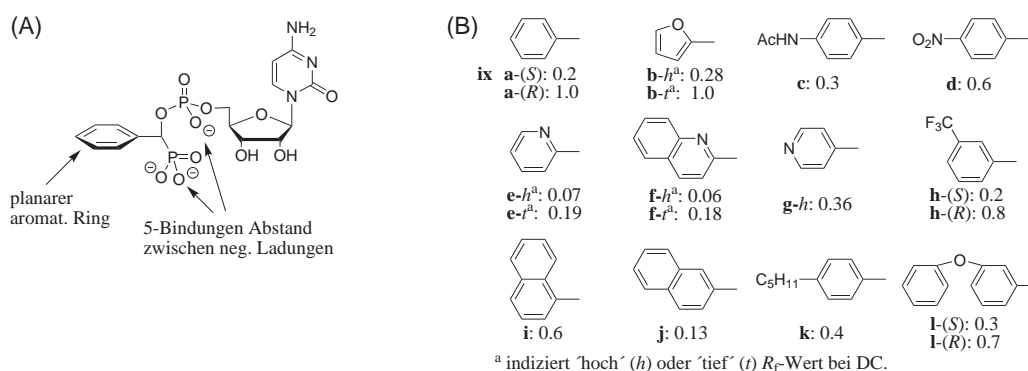


Abb. 2.9.: (A) Leitstruktur der vereinfachten übergangszustandsanalogen Inhibitoren und (B) Derivate (Inhibitionskonstanten K_i in μM für $\alpha 2,6$ -Sialyltransferasen).^[81]

die in einer Pudovik-Reaktion zu den racemischen α -Hydroxymethylphosphonaten (**C**) umgesetzt werden. In nur zwei weiteren Schritten, der Phosphoramiditkupplung des Alkohols **C** mit dem Cytidinphosphoramidit **1** zu **D** und der Entschützung, werden die diastereomergemischten Inhibitorverbindungen **E** erhalten (Abbildung 2.10)^[80]. Teilweise sind die Diastereomere mit präparativer HPLC trennbar, aber auch eine stereoselektive Synthese ist möglich^[81,82]. Die Diastereomere zeigen unterschiedliche Inhibitionskonstanten.

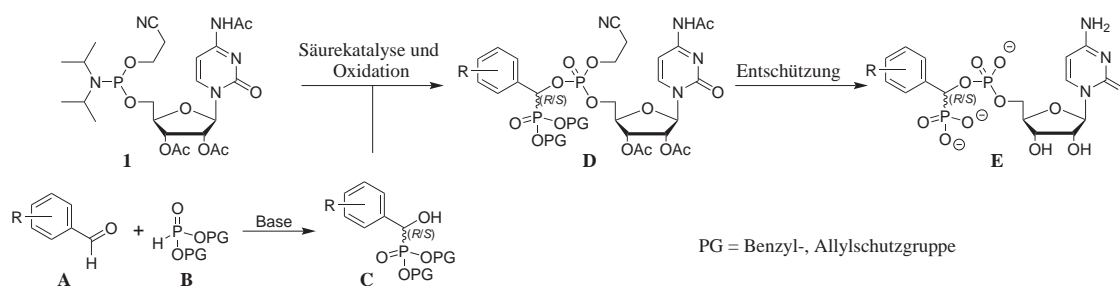


Abb. 2.10.: Allgemeine Synthese der vereinfachten übergangszustandsanalogen Inhibitoren.

Viele der aufgeführten Verbindungen sind hochpotente Inhibitoren der Sialyltransferasen. Es handelt es sich allerdings ausnahmslos um polare und negativ geladene Moleküle, die durch ihre schlechte Zellmembranpermeabilität Zelluntersuchungen oder gar klinische Applikationen erschweren.

Eine vollständig andere Inhibitor-Klasse stellen die zellmembranpermeablen Verbindungen Soyasaponin I ⁸[4] und die daraus entwickelten Litcholsäurederivate^[5] dar (Abbildung 2.11). Mit *in vitro* Zellassays wurde gezeigt, dass Soyasaponin I die Zelladhäsion von nicht-metastasierenden Lungenzellen stimuliert und die Zellmigration von hochmetastasierenden Lungenzellen signifikant reduziert^[83]. Das Litcholderivat **AL10** ist in der Lage, die Adhäsion und Migration von Lungenzellen zu inhibieren und ist darüber hinaus der erste Sialyltransferaseninhibitor, der auch *in vivo* anti-metastatisches Potential zeigt. In einem Tiermodell führte die Verabreichung von **AL10** zu einer Reduktion der Lungenmetastasen um 40 %^[6].

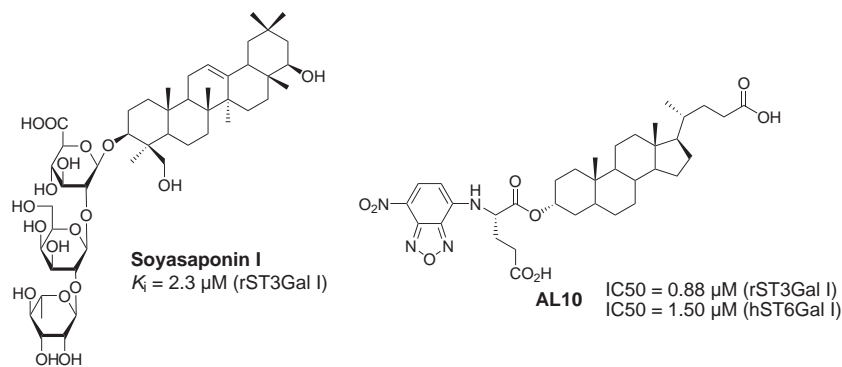


Abb. 2.11.: Soyasaponin I und das Litcholsäurederivat **AL10** als Inhibitoren von Sialinsäuretransferasen.

⁸Soyasaponin I wurde in einem Screening von hauptsächlich mikrobiellen Extrakten und Naturprodukten gefunden (~7500 Substanzen). Der verwendete Assay ist jedoch nicht näher beschrieben.

2.4. Sialyltransferasen und Metastase

2.4.1. Die metastatische Kaskade

Der Vorgang der Metastasierung umfasst die Ausbreitung neoplastischer Zellen bösartiger Tumoren über den Blut- oder Lymphweg auf andere Körperstellen. Dazu müssen Tumorzellen vom Primärtumor dissoziieren und das umgebende Gewebe invadieren, um in das vaskuläre oder lymphatische System zu gelangen, über welche sie sich im Organismus verteilen können. Nach Adhäsion an das Endothelium dringen sie durch Diapedese⁹ in ein Organ ein (Abbildung 2.12)^[84]. Jede Stufe stellt eine physiologische Barriere dar. Von Millionen täglich in den Kreislauf gestreuter Tumorzellen initiiert nur ein Bruchteil (weniger als 0.01 %^[85]) erfolgreich eine metastatische Kolonie^[86]. Viele der Schritte zeigen Parallelen zur Diapedese von Leukozyten in entzündetes Gewebe oder der Bildung neuen Gewebes bei der Wundheilung auf^[1].

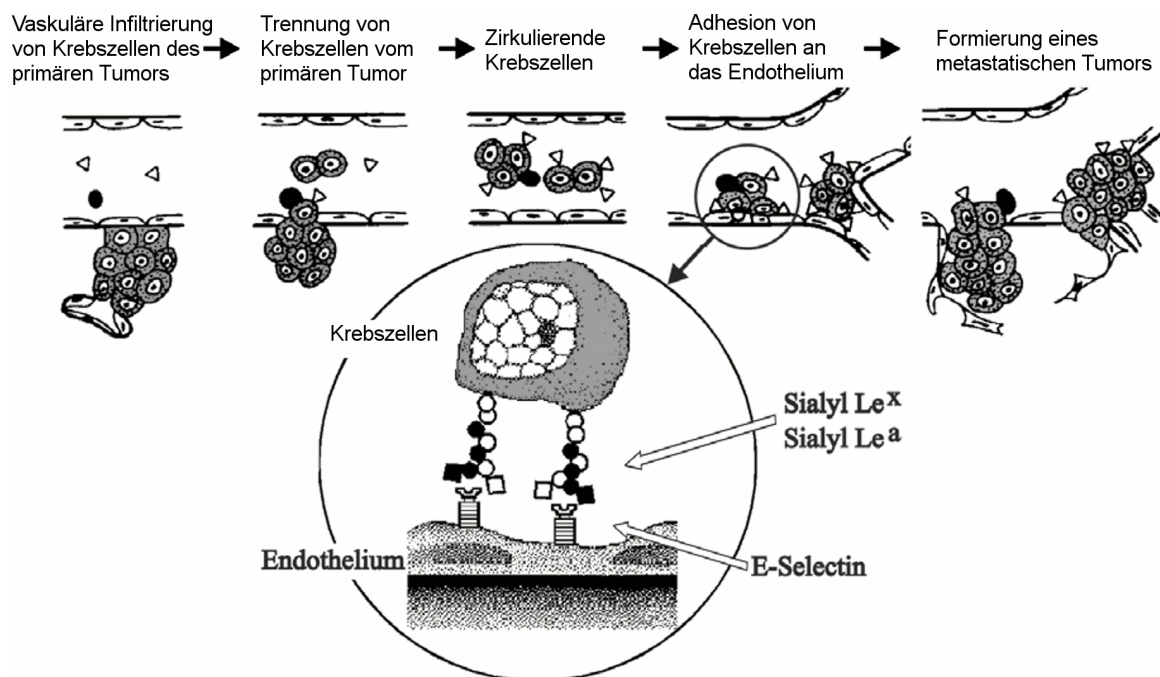


Abb. 2.12.: Die metastatische Kaskade.^[87]

⁹Als Diapedese bezeichnet man die Transmigration von Zellen durch das Endothel in das darunterliegende Gewebe.

2.4.2. Sialinsäuren und Glycopathologie von Tumorzellen

Eine übliche phänotypische Veränderung bei bösartigen Tumoren ist eine drastische Umgestaltung der zellulären Glycosylierung. Wie auch andere Glycosyltransferasen ist die Expression von Sialyltransferasen bei Krebs oft dereguliert und führt zu einer erhöhten Sialylierung der Zelloberflächenproteine und Lipide. Die intrinsische Mutabilität und die daraus resultierende Geninstabilität während der Evolution eines Tumors hat dessen zelluläre Heterogenität zur Folge. Dies erschwert Struktur-Funktions-Untersuchungen spezifischer Oligosaccharidstrukturen in Krebsstudien, die in vielen Fällen unsicher ist. Um den Einfluss der Sialyltransferasen zu untersuchen, werden diese mit Transfektionsexperimenten gezielt aktiviert oder deaktiviert.

Die wichtigsten der sehr vielfältigen Sialylstrukturen sowie deren Auswirkungen auf die Tumorentwicklung und Metastasierung sollen im Folgenden kurz umrissen werden^[88].

Thomsen-Friedenreichs-ähnliche Antigene

Durch Sialylierung des einfachsten *O*-Glycans (Tn-Antigen: GalNAc- α 1-Ser/Thr) und des T-Antigen (Gal β 1-3GalNAc- α 1-Ser/Thr) werden das Sialyl Tn-Antigen (sTn) und die sialylierten T-Antigene (sT3, sT6 und di-sT) gebildet (Abbildung 2.13). Die sialylierten Antigenstrukturen treten vermehrt auf, wenn die Transferasen Core 1 β 1,3-GalT und Core 2 β 1,6-GlcNAcT, die die Kernstrukturen synthetisieren, herunterreguliert sind^[89-91]. Durch die Sialylierung werden die Glycane terminiert, können nicht weiter aufgebaut werden und es kommt zu einer generellen Verkürzung der Oligosaccharide. Der Expressionsgrad dieser Antigene auf Glycoconjugaten der Zelloberflächen korreliert oft mit Tumorstadium und Metastasierung^[92].

Diese sialylierten Strukturen treten in normalen Geweben selten auf, werden aber von malignen Epitheliumzellen auf Mucinen^[93] und CD44^[94] überexprimiert. Diese – überlicherweise membrangebundenen Proteine, die Funktionen bei der Adhäsion und Zellmigration ausüben – werden von Tumorzellen auch in die Körperflüssigkeiten sekretiert und können als Tumormarker dienen^[95]. In zahlreichen Karzinomen wie Magen-^[96], Darm-^[97-99] und Brustkrebs^[100,101] ist eine sTn-Überexpression häufig mit Beteiligung der Lymphknoten, Metastasierung und schlechter Prognose assoziiert. Vermutlich potenziert die Sialylierung der Mucine und CD44 die Fähigkeit zur Metastasierung^[102]. So bewirkt die Transfektion von Brustkrebszellen mit cDNA, die die ST6GalNAc I encodiert, eine Reduktion der Zell-Zell-Interaktionen und einer Steigerung der Zellmigration^[102]. Ebenso führt eine erhöhte Aktivität der ST3Gal I & II bei Brustkrebszellen zur Überexpression des sT3-Antigens. Bei Darmkrebs zeigte eine Studie, dass eine er-

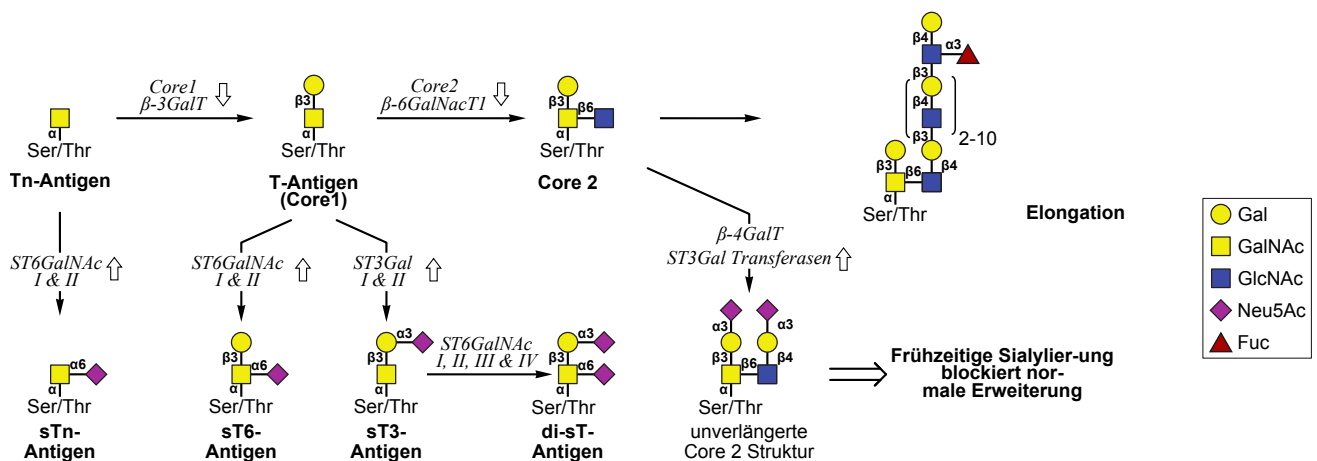


Abb. 2.13.: Biosynthese der O-Glycane: Herunterregulation (weiße Pfeile abwärts) der Core 1 und Core 2 Transferase führt zur Akkumulation der T- und Tn-Strukturen (obere Reihe). Alternativ oder begleitend können überexprimierte Sialyltransferasen (weiße Pfeile aufwärts) mit den Enzymen des normalen Glycanaufbaus konkurrieren und haben verkürzte Glycane zur Folge (untere Reihe).^[13,88,102]

höhte Expression der ST6GalNAc II mit einer schlechten Prognose für die Patienten einhergeht^[92].

Sialyl Lewis Antigene

Die Lewis-Blutgruppenantigene werden in den meisten menschlichen Epithelgeweben gefunden, wo sie den terminalen Teil des Glycans eines Glycolipides oder Glycoproteins besetzen^[103]. In Karzinomen treten vermehrt die sialylierten Antigene Sialyl-Lewis^a (sLe^a) und Sialyl-Lewis^x (sLe^x) auf, hervorgerufen durch eine veränderte Expression der beteiligten Sialyltransferasen ST3Gal III und ST3Gal IV & VI sowie der Fucosyltransferasen FucT III und FucT VI (Abbildung 2.14)^[104].

Beide Antigene sind Liganden für Selektine der Thrombozyten und Leukozyten, die mit Krebszellen, die in den Blutstrom eintreten, komplexe Thrombolien bilden. Es wird angenommen, dass dies die Anheftung an ektopischen¹⁰ Stellen fördert, die Interaktionen mit dem Endothelium unterstützt und bei der Umgehung des Immunsystems hilft. Durch die Präsentation von sLe^x auf der Zelloberfläche könnten Krebszellen einen ähnlichen Mechanismus wie Leukozyten verwenden, die bei der Diapedese vom Blut in das periphere Gewebe eindringen (Abbildung 2.12)^[105]. In der Tat korreliert die Me-

¹⁰ektopisch: nicht an typischer Stelle liegend, z. B. Bauchspeicheldrüsengewebe außerhalb der Bauchspeicheldrüse.

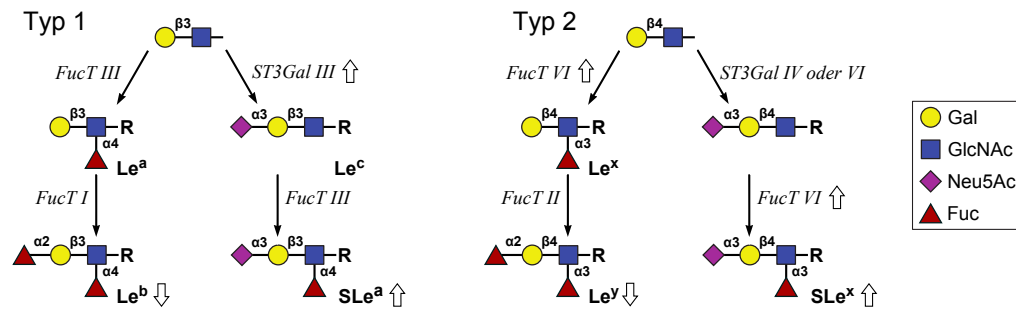


Abb. 2.14.: Biosynthese der Lewis-Antigene: Die Lewis-Antigene leiten sich von den Typ 1 (Gal β 1-3GlcNAc) und Typ 2 (Gal β 1-4GlcNAc) Dissaccharidsequenzen durch Fucosylierung und Sialylierung ab. Überexpression oder Hemmung der jeweiligen Enzyme und Antigene sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet.^[3]

tastasierungsfähigkeit mit der Expression von sLe^{a/x} durch die Tumorzellen und der Expression von E- und P-Selektin seitens der Endothelzellen^[13]. Bei Brustkrebs konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulierung der ST3Gal IV, die bei der Synthese von sLe^x beteiligt ist, die Zelladhäsion von MCF-7 Zellen stimuliert und die Zellmigration von MDA-MB-231 Zellen signifikant verringert^[83]. Eine hohe ST3Gal III Expression bei Patienten mit Brustkrebs^[106] und eine erhöhte sLe^a Expression bei fortgeschrittenem Darmkrebs korrelieren mit einer schlechten Prognose^[107].

Sialyl α 2,6-*N*-Acetyllectosamin-Antigen

Maligne Zellen weisen im Allgemeinen eine erhöhte Expression von komplexen β 1,6-verzweigten *N*-Acetyllectosamin-Glycanen (-Gal β 1-4GlcNAc-) auf ihrer Zelloberfläche auf, die durch einen Anstieg der Expression der *N*-Acetylglucosaminyltransferase V (GnTV) hervorgerufen wird (Abbildung 2.15). Die terminale Sialylierung dieser Strukturen wird ausschließlich durch die ST6Gal I durchgeführt, deren bekannte Substrate unter anderem β 1-Integrin, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 sind^[108]. Die Überexpression der ST6Gal I wurde für diverse Krebsarten dokumentiert, darunter Darm-^[109,110] und Brustkrebs^[106], Leberzellkarzinome, akute myeloische Leukämie¹¹, Chorionkarzinom¹², Gebärmutterhalskrebs^[111] und bestimmte Gehirntumoren^[112]. Mehrere Untersuchungen mit Brust-^[113] und Darmkrebszellen^[114] haben gezeigt, dass die induzierte Expression der ST6Gal I durch Transfektionsexperimente mit Krebszellen einen metastatischen Phänotyp erzeugt, der verminderte Zell-Zell Adhäsion und erhöh-

¹¹Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne (böartige) Erkrankung des blutbildenden Systems und zwar der Myelopoese, also des Teils des blutbildenden Systems, der für die Bildung von Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten verantwortlich ist.

¹²Das Chorionkarzinom ist ein infiltrativ wachsender Tumor aus anaplastischen Trophoblastenzellen.

te Invasionsfähigkeit besitzt. Klinische Studien ergaben bei Brust- und Darmkrebspatienten, dass beides – die Erhöhung der $\alpha 2,6$ -Sialylierung^[115] als auch der ST6Gal I Expression^[106,116] – Indikatoren für eine schlechte Prognose sind.

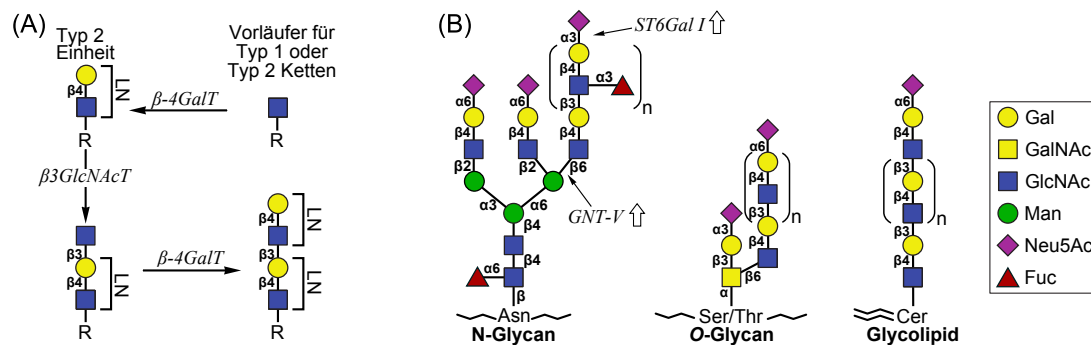


Abb. 2.15.: (A) Biosynthese der Poly-N-acetylactosamine durch wiederholte Aktionen der $\beta 4$ -GalT und $\beta 3$ -GalT (R beschreibt ein N-, O-Glycan oder ein Glycolipid)^[117]; (B) Sialylierte Poly-LN Glycokonjugate: In N-Glycanen bewirkt eine erhöhte GlcNAc Transferase-V (GNT-V) Expression eine verstärkte $\beta 1,6$ -Verzweigung in komplexen Glycanen. Die Sialylierung der endständigen Galactose einer Poly-LN wird ausschließlich von der ST6Gal I durchgeführt und terminiert das Polymer.

Poly $\alpha 2,8$ -Sialylierung

Das lineare Homopolymer Polysialinsäure (PSA) besteht aus $\alpha 2,8$ -verknüpften Sialinsäuren und ist ein anti-adhäsives Glycotop, das hauptsächlich N-verknüpfte Glycane des *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM) posttranslational modifiziert (Abbildung 2.16). NCAM ist ein Zelloberflächenmakromolekül der Immunoglobulinüberfamilie und vermittelt Zell-Zell Interaktionen über homophile (NCAM-NCAM) und heterophile (NCAM-anderer Partner) Bindungen. PSA interferiert mit den homophilen und heterophilen Wechselwirkungen von NCAM und moduliert dadurch die NCAM abhängigen Zell-Zell Interaktionen^[118]. PSA wird während der Entwicklung des Gehirns in hohem Maße exprimiert, ist im erwachsenen Nervensystem aber auf Regionen mit anhaltender neuronaler und synaptischer Plastizität beschränkt^[119,120]. Zwei Polysialyltransferasen - ST8Sia II (STX)^[121] und ST8Sia IV (PST)^[122] - katalysieren den Aufbau der PSA-NCAM Strukturen, indem sie eine Sialinsäure auf die terminalen $\alpha 2,3$ - oder $\alpha 2,6$ -Sialinsäuren der N-Glycane von NCAM übertragen und anschließend die Sialinsäurekette verlängern.

Die Expression von PSA auf NCAM ist nach der Embryogenese vermindert, jedoch zeigen verschiedene bösartige Tumoren wie das Neuroblastom¹³^[123,124], das Nephroblas-

¹³Neuroblastom: Vom autonomen Nervengewebe ausgehender Tumor, dessen Zellen (so genannte Neu-

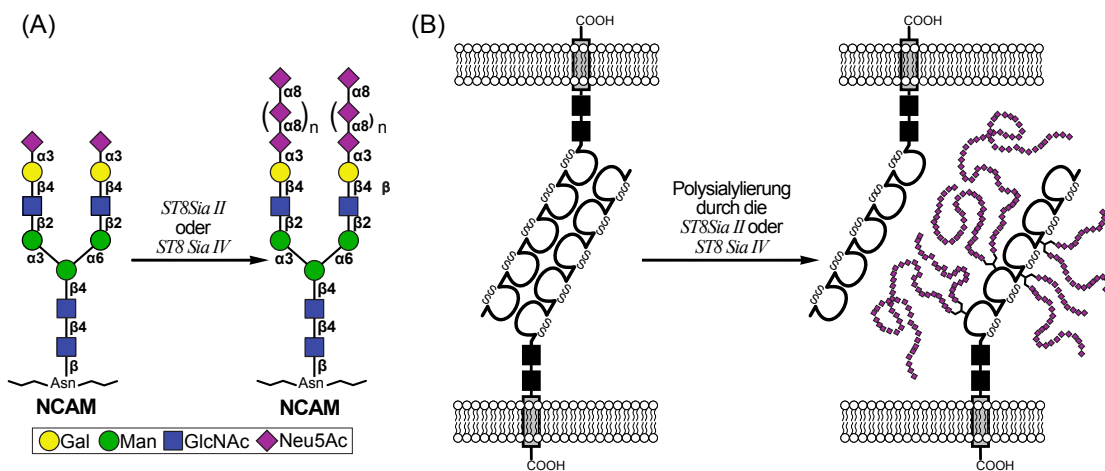



Abb. 2.16.: (A) Aufbau der Polysialinstruktur durch die ST8Sia II und ST8Sia IV (B) Schematische Darstellung der Polysialylierung von NCAM: Die homophilen Wechselwirkungen zwischen den Immunoglobulin-domänen von NCAM werden durch die Polysialylierung gestört (C₁: Immunoglobulin-domäne mit Disulfidbrücke, : polysialyliertes Glycan).^[132]

tom¹⁴^[125] und Lungenkrebs^[126,127] eine erhöhte Expression von PSA. Polysialylierung ist oft mit erhöhtem Invasionspotential von Tumorzellen von kultivierten Zelllinien assoziiert und klinische Studien zeigen ein erhöhtes Metastasierungspotential^[128,129]. Die Schwächung der NCAM-vermittelten Adhäsionen durch die stark geladene PSA könnte die Zellablösung vom Primärtumor begünstigen^[117]. Eine erhöhte Expression der ST8Sia II und der PSA-Strukturen korreliert mit einer schlechten Prognose für Patienten mit Lungenkrebs und Neuroblastom^[127,130,131].

Ganglioside

Ganglioside werden primär in der Plasmamembran von fast allen Geweben der Säugtiere gefunden. Während physiologischer Prozesse wie der Gehirnentwicklung, Zellproliferation und -differenzierung^[133] aber auch bei pathologischen Prozessen wie der Entstehung und Entwicklung von Tumoren^[134] kommt es zu einer spezifischen Veränderung der Menge und der Zusammensetzung der Ganglioside. Bei Tumoren nehmen die Ganglioside eine Schlüsselrolle bei den Prozessen der Zellproliferation^[135], Migration^[136], Adhäsion^[137,138] und Angiogenese^[136] ein. Die Ganglioside werden von Tumorzellen nicht nur in die Zellmembran eingebaut, sondern auch in die Körperflüssigkeiten ausgestreut, wo sie eine immunosuppressive Wirkung aufzeigen, indem sie bei

roblasten) in einem unreifen Stadium verblieben sind.

¹⁴Das Nephroblastom ist der am häufigsten auftretende bösartige Nierentumor im Kindesalter.

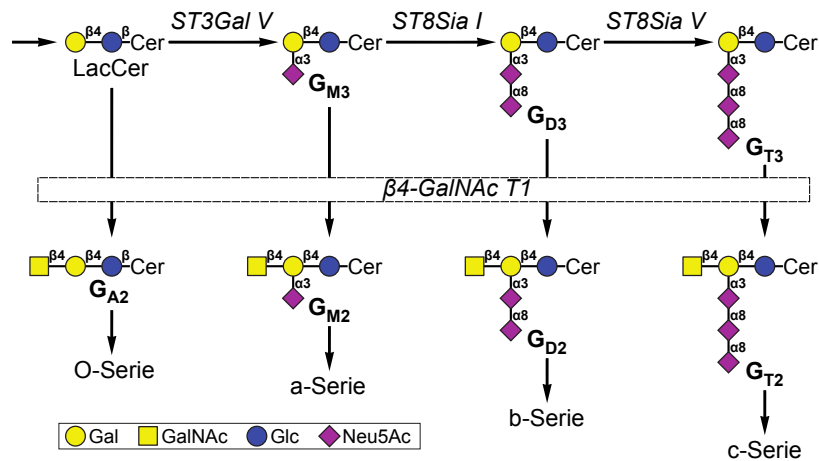


Abb. 2.17.: Auszug aus den Biosynthesepfaden der Ganglioside: Lactosylceramid wird von den Sialyltransferasen ST3Gal V (G_{M3}-Synthase), ST8Sia I (G_{D3}-Synthase) und ST8Sia V (G_{T3}-Synthase) in die Vorläufer der a-, b- und c-Serie überführt. Die Enzyme für die anschließende Verlängerungen der Glycane sind den a-, b- und c-Serien Gangliosiden gemeinsam.

T-Lymphozyten Apoptose induzieren^[139]. Ihre abnormale Expression ist eng mit der Bösartigkeit von Krebszellen assoziiert^[140], wobei sich die Effekte bestimmter Ganglioside bei unterschiedlicher Tumorarten drastisch unterscheiden können: In manchen metastasierenden Tumorzellen ist der Gangliosidgehalt hochreguliert, in anderen dagegen existiert eine inverse Beziehung zwischen Metastasefähigkeit und Gangliosidgehalt^[141].

Die Schlüsselenzyme der Gangliosidbiosynthese sind die Enzyme ST3Gal V (G_{M3} Synthase), ST8Sia I (G_{D3} Synthase), ST8Sia V (G_{T3} Synthase) und die β1,4GalNAc-Transferase (G_{M2}/G_{D2} Synthase) (Abbildung 2.17). Die Sialyltransferasen begründen die a-, b- und c-Serie der Ganglioside und ihre Aktivitäten bestimmen maßgeblich die Komplexitäten der auftretenden Ganglioside (Abbildung 2.17)^[142].

Zahlreiche Antisense-Knockdown-Experimente deuten auf eine Rolle von G_{D3} bei der Zellproliferation hin. Die Unterdrückung der G_{D3} Expression mit Antisense-cDNA der G_{D3}-Synthase hat in Melanomzellen (enthalten typischerweise sehr hohe G_{D3} Mengen^[143]), und in F-11 Neuroblastomzellen eine Reduktion des Zellwachstums zur Folge^[136,144]. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung bewirkt die Neoexpression von G_{D3} durch Einführung der G_{D3}-Synthase cDNA in SK-MEL-28 Melanomzellen eine erhöhte Invasion und Proliferationsaktivität^[145]. In etwa die Hälfte der invasiven Brustkrebsgewebe weisen eine Überexpression von G_{D3} und unüblicher Ganglioside (O-Acetyl-G_{D3}, O-Acetyl-G_{T3} und N-Glycolyl-G_{T3}) auf.^[146] Der Effekt von G_{D3} auf das Verhalten von Brustkrebszellen wurde anhand von MDA-MB-231 Brustkrebszellen

untersucht, die durch Transfektion mit der G_{D3} -Synthase-cDNA das Gangliosid G_{D3} überexprimierten. Auch hier zeigten die G_{D3} -überexprimierenden Varianten verbesserte Proliferations- und Migrationseigenschaften^[147].

2.4.3. Einfluss von Inhibitoren auf die Metastasierung

Die Behandlung von kolorektalen Karzinomzelllinien mit dem Sialinsäurenukleosidkonjugat KI-8110 (Abbildung 2.18) verhindert den Einbau von Sialinsäuren in Glycokonjugate und reduziert die Bildung von Metastasen^[148,149]. Die Verbindung ist aber kein Inhibitor der Sialyltransferasen, sondern hemmt den CMP-Neu5Ac Transport in das ER und die Golgivesikel^[150].

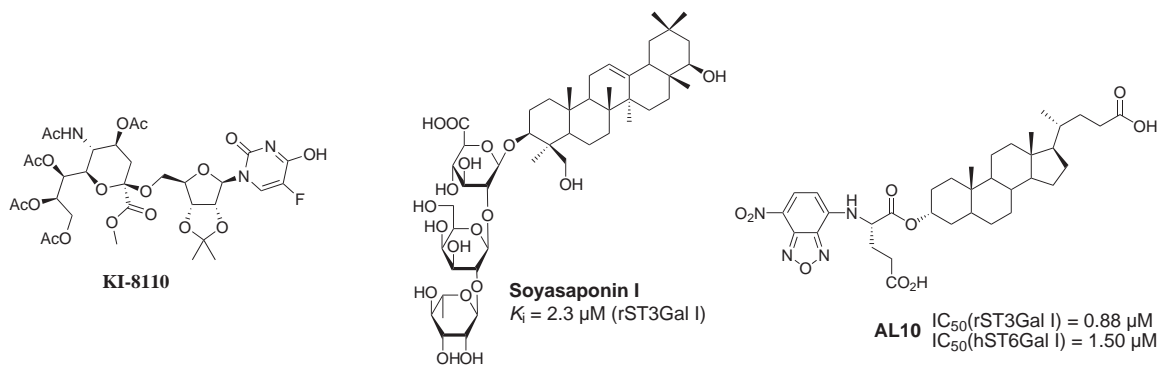


Abb. 2.18.: Metastasierungshemmende Inhibitoren.

Die einzigen bislang erfolgreich *in vivo* und *in vitro* getesteten Sialyltransferaseinhibitoren sind die Verbindungen Soyasaponin I und die daraus abgeleiteten Litcholsäurederivate. Mit *in vitro* Zellassays wurde gezeigt, dass Soyasaponin I^[4] die Zelladhäsion von nichtmetastatischen Brustkrebszellen (MCF-7) stimuliert und die Zellmigration von hochmetastatischen Brustkrebszellen (MDA-MB-231) signifikant reduziert^[83]. Das bereits erwähnte Litcholderivat **AL10** ist in der Lage, die Adhäsion und Migration von Lungenkrebszellen (CL1.5) zu hemmen und zeigt darüber hinaus auch *in vivo* antimetastatisches Potential. In einem Tiermodell führte die Verabreichung von **AL10** zu einer Reduktion der Lungenmetastasen um 40 %^[6].

2.5. Fluoreszenzpolarisationsassays

Die Fluoreszenzpolarisation (FP) ist ein physikalischer Effekt, bei dem ein Fluorophor, welches mit polarisiertem Licht angeregt wird, dieses auch wieder polarisiert emittiert.

Ändert das Fluorophor in der Zeitdauer seines angeregten Zustandes seine Lage im Raum, wird das Licht in einer anderen Ebene emittiert als es aufgenommen wurde und erscheint depolarisiert (Abbildung 2.19 A, oben). Dies trifft auf Moleküle in Lösung zu, deren Fluoreszenzpolarisation von der Rotationskorrelationszeit (τ_C , nicht zu verwechseln mit der Rotationsrelaxationszeit ρ : $\rho = 3\tau_C$) und der Fluoreszenzlebensdauer (τ_F) abhängt. Die Rotationskorrelationszeit ist proportional zur Viskosität μ und dem molekularen Volumen V und umgekehrt proportional zur Temperatur T . Das Verhältnis der intrinsischen (A_0) zur detektierten Anisotropie (A) wird mit der Perrin-Gleichung (Gleichung 2.1) beschrieben und es wird ersichtlich, dass sich A mit steigendem Molekülvolumen und kurzen Fluoreszenzlebensdauern A_0 annähert.

$$\frac{A_0}{A} = 1 + \frac{\tau_F}{\tau_C} \quad \text{mit} \quad \tau_C = \frac{\eta V}{RT} \quad (2.1)$$

Die Fluoreszenzpolarisation ist insbesondere für die Untersuchung der Bindung kleiner fluorophormarkierter Liganden an große Rezeptoren geeignet und wird für die Untersuchung zahlreicher biologischer Interaktionen wie DNS-DNS-, DNS-Protein-, Protein-Protein- und Ligand-Protein-Interaktionen eingesetzt^[151]. Wird der fluorophormarkierte Ligand an den Rezeptor gebunden, ist für die Rotationskorrelationszeit die Gesamtmasse des Komplexes relevant und die Anisotropie steigt (Abbildung 2.19 A, mitte). Anhand der Anisotropie kann das Verhältnis des gebundenen zum ungebundenen Liganden bestimmt werden. Ist die Bindung reversibel, kann der markierte Ligand durch Zugabe eines unmarkierten Liganden aus seinem Komplex mit dem Rezeptor verdrängt werden (Abbildung 2.19 A, unten). Dies ermöglicht den Einsatz der markierten Liganden als FP-Sonde zur Untersuchung der Bindung anderer Moleküle an die Bindungsstelle des Rezeptors. Die Auswahl des Fluorophors für die Markierung eines Liganden hängt sowohl vom Liganden selbst, als auch vom Rezeptor ab. Kleine Liganden (< 1.5 kDa) können mit Fluorophoren kurzer Fluoreszenzlebensdauer wie Fluorescein/Rhodamin oder BODIPY ($\tau_F \sim 4$ ns) markiert werden, so dass bereits die Bindung an Rezeptoren mit Massen > 10 kDa detektierbar ist. Bei schweren Liganden muss die Fluoreszenzlebensdauer größer sein, damit die Anisotropie der freien Sonde klein ist. Für eine ausreichende Änderung der Anisotropie bedarf es entsprechend größeren Rezeptoren (Abbildung 2.19 B).

Die Verbindung **x** ist ein Beispiel einer substratbasierten FP-Sonde, die für eine Glycosyltransferase (MurG^[153,154]) entwickelt wurde. Das natürliche Donorsubstrat UDP-GlcNAc trägt Fluorescein als Label. Für die UDP-Galactopyranose Mutase wurde in

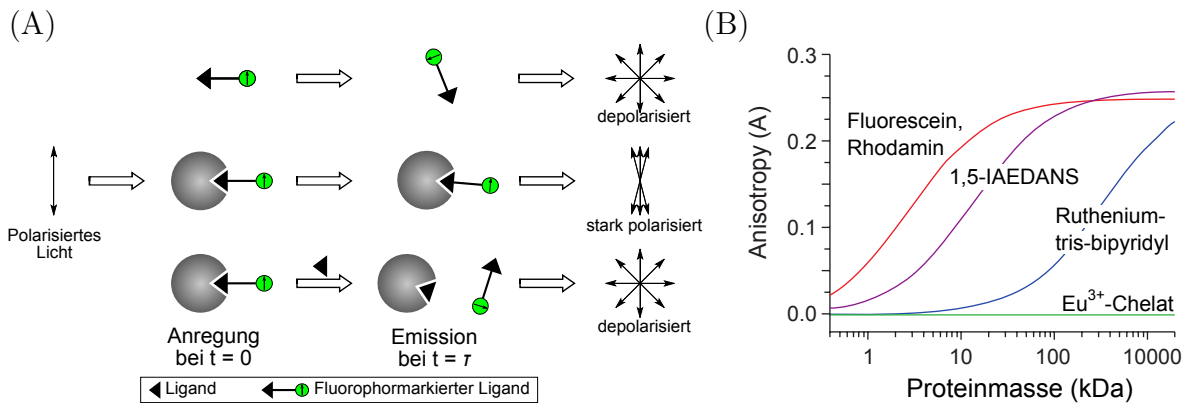


Abb. 2.19.: (A) Prinzip der Fluoreszenzpolarisation; (B) Berechnete Anisotropien von Fluorophoren unterschiedlicher Fluoreszenzlebenszeiten (Fluorescein/Rhodamin: 4 ns; IAEDANS: 20 ns; Ruthenium-tris-bipyridyl: 500 ns; Eu³⁺-Chelat: 1000 μ s)^[152]; IAEDANS: 5-(((2-iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid.

ähnlicher Weise das Nukleotid UDP des Donorzuckers am Diphosphat über einen Linker mit Fluorescein verknüpft (Verbindung **xi**)^[155]. Beide FP-Sonden wurden in HTS-Kampagnen zur Identifizierung von Inhibitoren eingesetzt (Abbildung 2.20).

Der FP-Assay hat in der praktischen Durchführung gegenüber Kinetikenzymassays mehrere Vorzüge. So ist er apparativ einfach und umfasst nur das Mischen des Rezeptors mit der FP-Sonde und den Testverbindungen. Die Anisotropiemessung ist eine Endpunktbestimmung und gegenüber dem Ablauf der Probenvorbereitung sehr robust. Daher wird dieser Assay oft für Hochdurchsatz-Screening (HTS) Kampagnen verwendet^[156–160]. Bei der Untersuchung von Enzymen ist die Unabhängigkeit des Assays von den Substraten ein weiterer Vorteil. Bislang wurde über keinen FP-Assay für Sialyltransferasen berichtet.

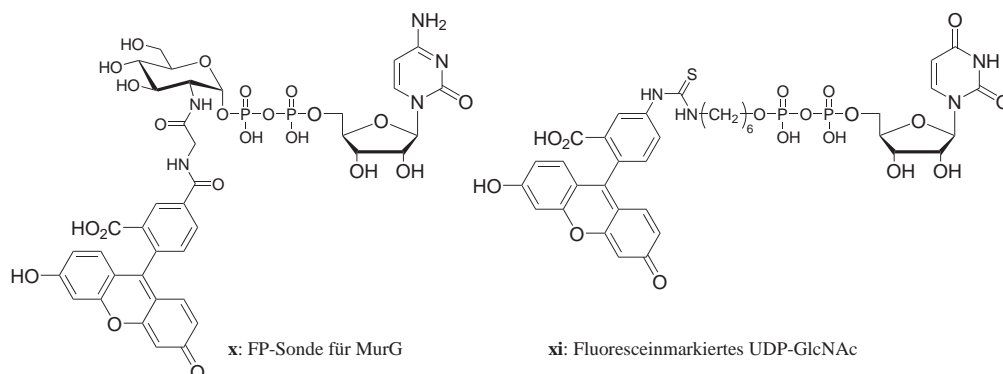


Abb. 2.20.: Beispiele für fluoresceinbasierte FP-Sonden.

2.6. Photoaffinitätsmarker für die Proteomanalyse

Photomarkierer ermöglichen es, auch schwache Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen einzufrieren. Sie finden daher eine breite Anwendung bei der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen, deren Komplexe eine Extraktion aus dem zellulären Milieu nicht überstehen. Auch Interaktionsstellen zwischen Biomolekülen können mit ihnen lokalisiert werden. Für diesen Zweck wird eine photoreaktive Gruppe in z.B. Proteine, Liganden oder Substrate integriert. Verschiedene Reportergruppen (z.B. Massen-, Radio-, Fluoreszenz- oder Biotinlabel) ermöglichen die Identifizierung der kovalent gebundenen Komplexe.

Diese Methodik findet auch bei der Proteomanalyse Anwendung, bei der die Proteinexpression in Proben hoher biologischer Komplexität untersucht und in unterschiedlichen Zellen oder Gewebearten verglichen werden. Die Proteomanalyse erfolgt durch zweidimensionale Elektrophorese die mit MS-Analytik gekoppelt ist. Die Detektion ist mit hochsensitiven fluoreszierenden Farbstoffen möglich, die vor der Trennung unspezifisch kovalent an die Proteine gebunden werden. Die Markierung gelingt meist uneinheitlich und die Auflösung der 2D Elektrophorese reicht oft nicht aus, um auch sehr geringe Proteinmengen nachzuweisen^[161], so dass eine exakte Quantifizierung erschwert ist^[162]. Zudem wird zwar die Häufigkeit eines Proteins bestimmt, jedoch nicht dessen Aktivität. Posttranslationale Modifikationen, die die Proteinaktivitäten regulieren, werden dadurch nicht erfasst. Dieser Problematik wird mit affinitätsbasierten Proteinsonden begegnet, die sich aus einem irreversiblen Inhibitor und einer Reportergruppe zusammensetzen. Sie binden selektiv an die aktive Form eines Proteins und ermöglichen deren Detektion in einem komplexen Proteom^[161]. Die Strategie kann auf Proteine erweitert werden, für die keine irreversiblen Inhibitoren bekannt sind, indem ein reversibel bindender Ligand mit einer photoreaktiven Gruppe modifiziert wird^[162]. Durch Bestrahlung wird ein kovalenter Komplex gebildet, der auch unter den denaturierenden Bedingungen der Elektrophorese stabil ist (Abbildung 2.21).

So wurde z.B. mit dem benzophenonmodifizierten Inhibitor **HxBP-Rh** (Abbildung 2.21) die aktive Form einer Metalloprotease selektiv markiert, nicht aber dessen inaktives Zymogen^[163]. Die Modifikation eines generellen Kinaseinhibitors, der die ATP-Bindungsstelle besetzt, zu dem Photoaffinitätsmarker **xii**, ermöglichte die Detektion einer ganzen Proteinfamilie^[162]. Diese Sonden enthalten Fluorophore für die Detektion der markierten Proteine in Elektrophoresegelelen, es können aber auch andere Reportergruppen wie Biotin eingesetzt werden, die den Pulldown des Photomarkierungsproduk-

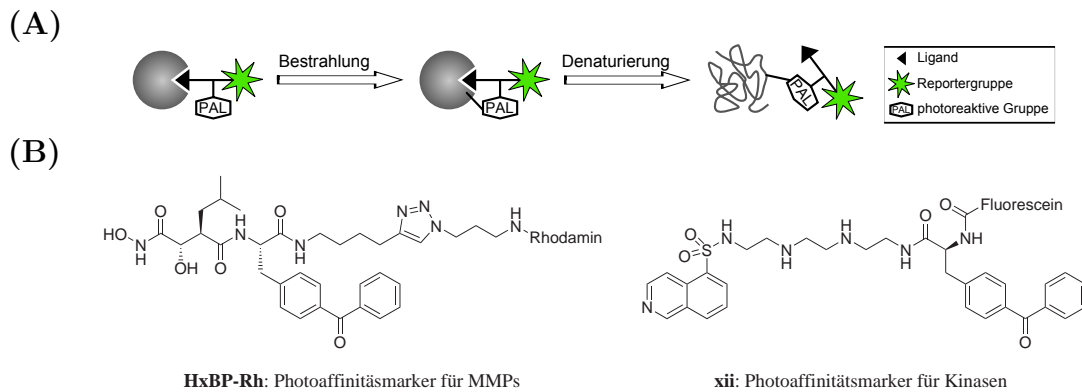


Abb. 2.21.: (A) Prinzip der Photoaffinitätsmarkierung und (B) Photoaffinitätssonden.

tes aus einer Proteinnischung ermöglichen.

Neben Benzophenon (BP) werden häufig Arylazide und Diazirine für die lichtinduzierte Markierung von Liganden verwendet. Diese drei Gruppen weisen hohe chemische Stabilitäten auf und ihre Aktivierung erfolgt bei Wellenlängen, die biologische Systeme nicht beschädigen.

Arylazide generieren bei Bestrahlung ($\lambda = 254\text{--}400\text{ nm}$) unter N_2 -Abspaltung reaktive Nitrene, die in C–H- als auch Heteroatom–H-Bindungen insertieren. Ohne Reaktionspartner lagern die Nitrene in weniger reaktive Ketenimine um, die mit Nucleophilen reagieren können. Dies reduziert die Crosslinkingeffizienz und ermöglicht unspezifische Reaktionen der langlebigen Ketenimine^[164]. Die Umlagerung wird durch Perfluorierung des Phenyls unterbunden^[165]. Diazirine bilden bei Bestrahlung ($\lambda \sim 350\text{ nm}$) unter N_2 -Abspaltung Carbene, die reaktiver und weniger selektiv als die Nitrene reagieren. Alternativ findet eine Photoisomerisierung zu reaktiven elektrophilen Diazoverbindungen statt, die bei weiterer Bestrahlung ebenfalls ein Carben bilden. Um die unspezifischen Reaktionen der langlebigen Diazoisomere zu vermeiden wurde von BRUNNER *et al.* 3-Trifluormethyl-3-phenyldiazirin (Tfmd) entwickelt^[166]. Tfmd ist allerdings größer und etwas unreaktiver als die Alkyldiazirine^[165].

Die Crosslinkingeffizienz der Carbene kann durch ihre Reaktivität gegenüber Wasser reduziert sein. Das bereits aufgeführte Benzophenon bildet bei Bestrahlung ($\lambda \sim 360\text{ nm}$) ein Diradikal, welches in benachbarte C–H-Bindungen insertiert und gegenüber Wasser unreaktiv ist. Im Gegensatz zu den anderen Crosslinkergruppen ist die Anregung reversibel und das Diradikal relaxiert zurück zum Keton. Dadurch sind multiple Anregungs-Relaxationszyklen möglich, die die Markierungseffizienz erhöhen^[165]. Das Diradikal zeigt eine höhere Spezifität als Carbene und Nitrene und hat hohe An-

forderungen an die Reaktionsgeometrie (Kapitel 7.1.1.1). Benzophenon ist im Vergleich zu den anderen Crosslinkergruppen deutlich größer^[167] und es bedarf oft einer längeren Bestrahlungsdauer^[168,169].

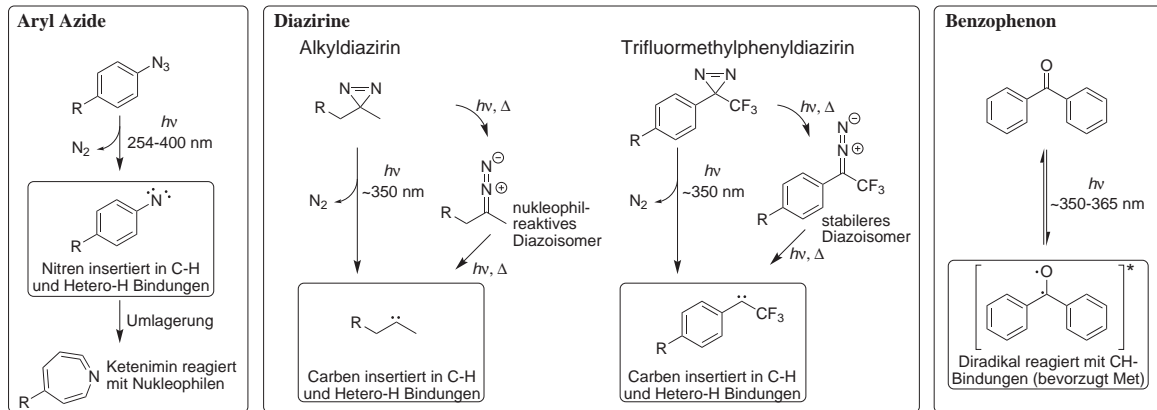


Abb. 2.22.: Azide, Diazirine und Benzophenon als photoreaktive Gruppen.

3. Zielsetzung und Planung der Arbeit

Zahlreiche Untersuchungen (sowohl *in vitro* Experimente mit Krebszellen als auch klinische Studien mit Krebspatienten) zeigten eine Korrelation zwischen der Zelloberflächen-sialylierung bzw. den Sialyltransferaseaktivitäten und der Fähigkeit von Krebszellen zu metastasieren^[3,88]. Besonderes Interesse gilt daher Inhibitoren für Sialyltransferasen, mit denen die sialinsäureassoziierten Metastasierungsprozesse untersucht werden können, indem die Oberflächensialylierung gehemmt wird. Bis auf wenige Ausnahmen^[4,5] basieren aber die bislang entwickelten Sialyltransferaseinhibitoren auf dem anionischen und polaren Donorsubstrat CMP-Neu5Ac und sind nicht zellgängig^[29,67–82]. Ihre Anwendbarkeit beschränkt sich daher überwiegend auf Enzymassays und ein Einsatz in der lebenden Zelle oder in *in vivo* Untersuchungen ist nicht möglich.

Die dokumentierten Aktivitätsassays für Sialyltransferasen beinhalten aufwendige sowie zeitintensive Arbeitsprozeduren und für jede Sialyltransferase muss das entsprechende Akzeptorsubstrat zugänglich sein^[45–66]. Entsprechend gering ist der erreichbare Testdurchsatz bei Inhibitionsstudien und es wurden bislang lediglich kleine fokussierte Substanzbibliotheken getestet^[4,58]. Für die Entwicklung eines Hochdurchsatz-fähigen Assays (HT-Assay) fehlt es an geeigneten chemischen Werkzeugen.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war daher die Etablierung eines HT-Assays für Sialyltransferasen, der zudem den Bedarf des Akzeptor- und Donorsubstrates umgehen sollte. Als Assaysystem wurde der apparativ sehr einfache Fluoreszenzpolarisations-Assay (FP-Assay) gewählt, für den auf der Basis eines donosubstratanalogen Inhibitors eine Fluoreszenzpolarisations-Sonde (FP-Sonde) entwickelt werden sollte. Die FP-Sonde und der HT-FP-Assay sollten in einem Hochdurchsatz-Screening (HTS) einer Sialyltransferase gegen eine umfangreiche Substanzbibliothek eingesetzt werden, um so eine neue Möglichkeit zur Leitstrukturentdeckung für die Inhibitorentwicklung zu eröffnen. Durch Modifikation der FP-Sonde mit dem Einbau einer photoreaktiven Gruppe war des Weiteren geplant, einen selektiven Photoaffinitätsmarker für die Detektion von Sialyltransferasen in komplexen Proteomen zu entwickeln.

Die Dissertation gliedert sich in die folgenden vier Teilprojekte (Abbildung 3.1):

1. Entwicklung und Synthese von FP-Sonden für Sialyltransferasen.
2. Entwicklung eines HT-FP-Assays für Sialyltransferasen.
3. FP basiertes HT-Screening einer Sialyltransferase.
4. Entwicklung eines Photomarkers für die selektiven Markierung von Sialyltransferasen.

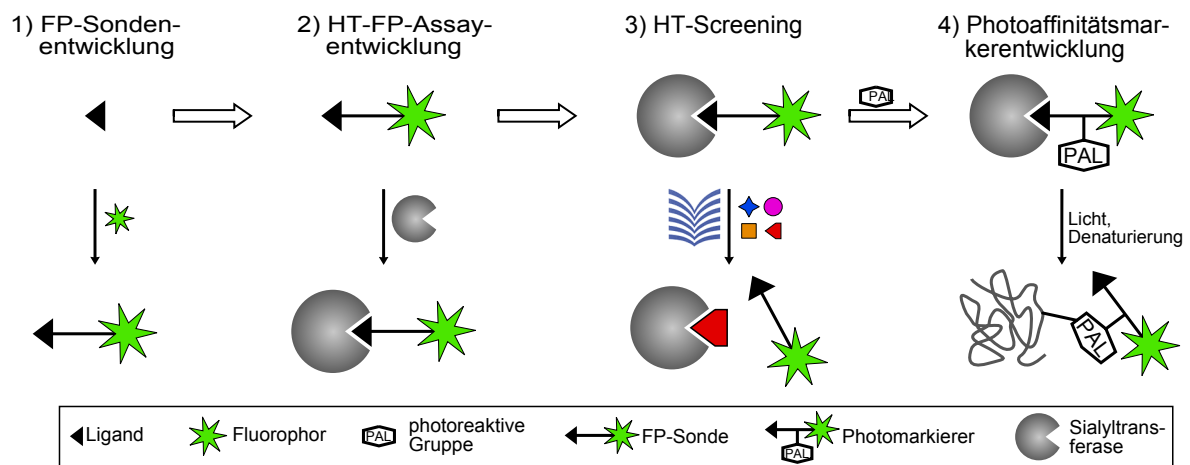


Abb. 3.1.: Die vier Teilprojekte der Dissertation.

Teil II.

Ergebnisse und Diskussion

4. Entwicklung einer FP-Sonde für Sialyltransferasen

Sialyltransferasen stellen ein gut geeignetes Ziel für die Entwicklung eines FP-Assays dar. Ihre Molekularmassen liegen über 30 kDa (bedeutend für einen großen Dynamikbereich des Assaysignals) und ihre Toleranz gegenüber Substitutionen des Donorozucker-substrates wurde in mehreren Studien gezeigt^[170,171]. Bei Sialyltransferasen kann auf verschiedene hochaffine donorsubstratanaloge Inhibitoren zurückgegriffen werden, wobei insbesondere die in der Gruppe von R.R. SCHMIDT^[80] entwickelten vereinfachten Übergangszustandsanalogen Inhibitoren (Abbildung 2.9) einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die Entwicklung einer FP-Sonde darstellten. So umfasst ihre Synthese nur wenige und einfache Schritte und sie zeigen sehr gute Inhibitionskonstanten im submikromolaren Bereich. Um die maximal mögliche Affinität zu erreichen, sollten die Diastereomere getrennt werden. Als Fluorophor eignete sich mit seiner kurzen Fluoreszenzlebensdauer Fluorescein, von dem verschiedene funktionalisierte Derivate (Carbonsäuren, Succinimidylester, Amine, Isothiocyanate) kommerziell erhältlich oder synthetisch zugänglich sind. Eine solche FP-Sonde, die auf dem Donorsubstrat CMP-Neu5Ac basierte, könnte eine universelle FP-Sonde für alle Sialyltransferasen darstellen und der FP-Assay wäre im Gegensatz zu den bisherigen Assaysystemen unabhängig vom Zugang zu den Akzeptorsubstraten.

4.1. Design der Fluoreszenzpolarisations-Sonden

Als Basis für die Synthese der FP-Sonden wurde Verbindung **ix-c** (Abbildung 2.9) gewählt, bei der es sich um ein *N*-Acetylamidophenyl-substituiertes vereinfachtes Übergangszustandsanalogon der Sialyltransferasen handelt und dessen Acetylgruppe durch ein Fluoresceinlabel ersetzt werden sollte. Es sollten verschiedene Derivate hergestellt werden, die sich in der Substitution des Aromaten (*meta* oder *para*) und des Car-

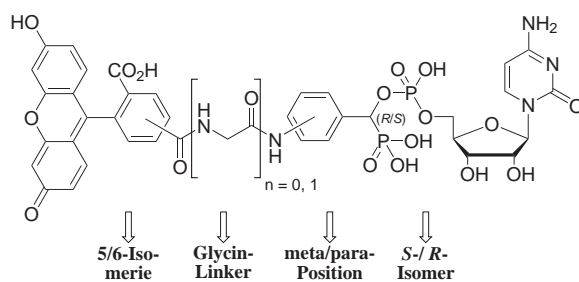


Abb. 4.1.: Design der geplanten FP-Sonden.

boxyfluorescein (5- oder 6-Isomer), in ihrer absoluten Konfiguration der α -Position zum Phosphonat (*R*- oder *S*-Isomer) und durch einen Linker zwischen Inhibitorteil und Fluoresceinlabel (Glycin) unterschieden (Abbildung 4.1). Die Strukturnummern der Verbindungen werden im Folgenden durch die Beschreibung der aromatischen Substitution (*m* oder *p*), den Code für Glycin (G) – sofern der Linker vorhanden ist – und die Angabe der Isomerie von Carboxyfluorescein (5 oder 6, 5/6 für die Mischung) ergänzt. Bei den diastereomerreinen Verbindungen wird die Stereochemie durch das Präfix (*S*)- oder (*R*) beschrieben.

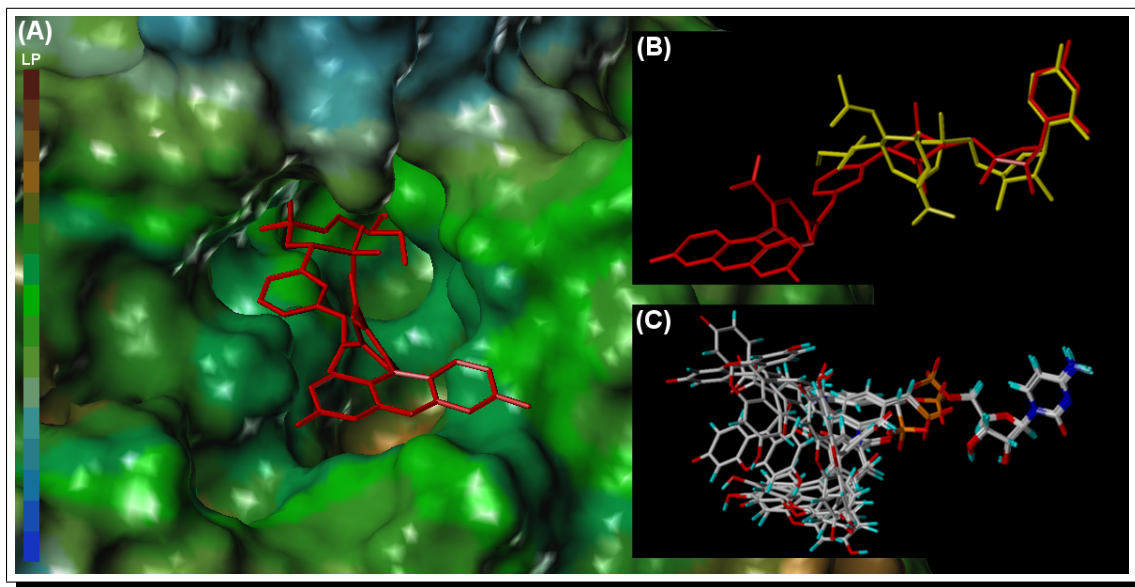


Abb. 4.2.: Docking von (*S*)m5 mit der Kristallstruktur der CstII Δ 32 im Komplex mit CMP-3FNeuAc (PDB-code: 1RO7)^[33]: (A) (*S*)m5 in der Enzytasche der CstII Δ 32; (B) Überlagerung des gedockten (*S*)m5 (rot) mit CMP-3FNeuAc (gelb); (C) Überlagerung der 10 besten Dockingergebnisse.

Die Struktur des *meta*-substituierten 5-Carboxyfluoresceinderivates mit *S*-konfigurier-tem α -Methylphosphonat ((**S**)**m5**) wurde an die Kristallstruktur der bakteriellen Sialyltransferase CstII Δ 32 im Komplex mit CMP-3FNeuAc^[33] gedockt. Dies ergab, dass der CMP-Rest von (**S**)**m5** seine natürliche Position im Inhibitor-Enzym-Komplex einnehmen konnte (Abbildung 4.2 B), wobei der Fluoresceinrest weit aus der Enzytasche herausragte (Abbildung 4.2 A) und hochflexibel war (Abbildung 4.2 C).

Die Darstellung der markierten Inhibitoren erfolgte zum einen mit einer Syntheseroute über ein racemisches α -Hydroxymethylphosphonat (Kapitel 4.2), die bereits im Rahmen einer Diplomarbeit etabliert wurde^[172], und zum anderen über das stereoselektiv dargestellte *R*- oder *S*-Isomer eines α -Hydroxymethylphosphonats (Kapitel 4.3).

4.2. Synthese diastereomergemischter fluoresceinmarkierter Inhibitoren

4.2.1. Syntheseplanung

Der Synthesestrategie^[172] sah vor, das Fluorescein vor der Pudovik-Reaktion an ein Hydroxymethylanilin (**3**) zu koppeln. Der erhaltene Alkohol **4** sollte zum Benzaldehyd **5** oxidiert und nach der von R. R. SCHMIDT *et al.* beschriebenen Methode mit dem Cytidinphosphoramidit **1** zum geschützten fluoresceinmarkierten Inhibitor **7** weiter umgesetzt werden. Die Entschützung von **7** sollte die potentiellen FP-Sonden als Diastereomeren-Mischung ergeben (Abbildung 4.3).

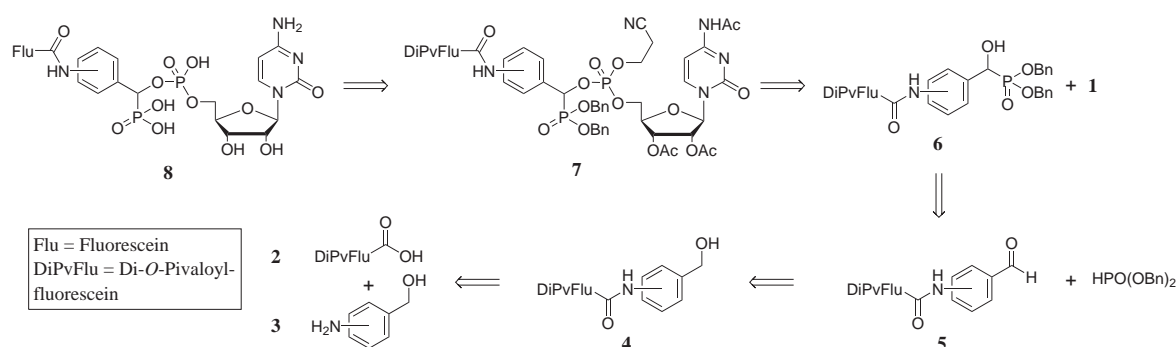


Abb. 4.3.: Synthesepfad zur Darstellung fluoresceinmarkierter Inhibitoren.

4.2.2. Synthese der fluoresceinmarkierten Alkohole

Für die nachfolgenden Syntheseschritte wurden die phenolischen OH-Gruppen des Carboxyfluoresceins mit der Pivaloylgruppe geschützt, die leicht mit Pivaloylsäureanhydrid in Gegenwart einer Base (Cs_2CO_3) eingeführt werden konnte^[173]. Eine Trennung der Isomere von **2-(5/6)** war nach einer von KAO *et al.*^[174] beschriebenen selektiven Fällung des Diisopropylaminsalzes von **2-(6)** möglich (Abbildung 4.4).

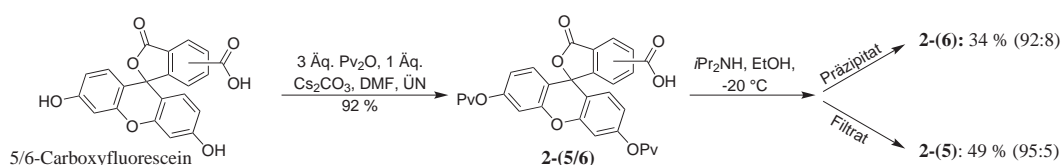


Abb. 4.4.: Pivaloylschutz von Carboxyfluorescein und Isomerentrennung nach KAO *et al.*

Für die Synthese der linkermodifizierten Verbindungen wurde Fmoc-Glycin an *m*-Aminobenzylalkohol (**3-m**) zu Verbindung **9** gekuppelt und anschließend mit 20 % Piperidin in DMF entschützt (Abbildung 4.5).

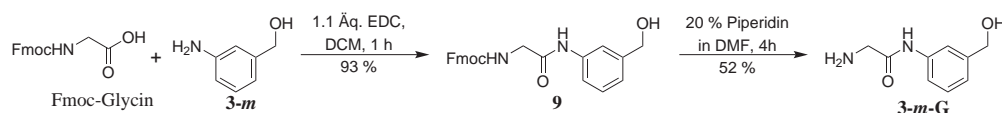


Abb. 4.5.: Darstellung des Glycin-substituierten *m*-Aminobenzylalkohols **3-m-G**.

Die Kupplung von Di-*O*-Pivaloylcarboxyfluorescein (**2-(5/6)**) mit den Anilinen **3-m**, **3-p** und **3-m-G** erfolgte nach Aktivierung der Carbonsäure mit einem Carbodiimid (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid). Die in mäßigen und guten Ausbeuten (30–72 %) erhaltenen Alkohole **4-m-(5/6)**, **4-p-(5/6)** und **4-m-G-(5/6)** wurden anschließend mit dem milden Oxidationsmittel Dess-Martin-Periodinan (DMP)^[175] in guten bis sehr guten Ausbeuten (68–90 %) zu den Aldehyden **5-m-(5/6)**, **5-p-(5/6)** und **5-m-G-(5/6)** oxidiert (Abbildung 4.6). Eine Trennung der 5- und 6-Isomere sowohl der Alkohole als auch der Aldehyde war während der säulenchromatographischen Reinigung möglich. Um den Syntheseaufwand zu reduzieren, wurde jedoch nach der Charakterisierung der Verbindungen die Isomerenmischung für die Folgereaktionen eingesetzt.

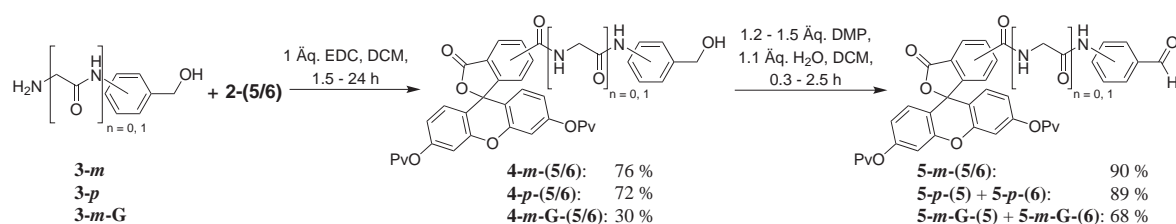


Abb. 4.6.: Kupplung der Amine mit Di-*O*-Pivaloylcarboxyfluorescein und anschließende DMP-Oxidation des Alkohols.

4.2.3. Synthese der α -Hydroxymethylphosphonate

Die Pudovik Reaktion zwischen Dibenzylphosphonat und den Aldehyden **5-m-(5/6)**, **5-p-(5)**, **5-p-(6)**, **5-m-G-(5)** und **5-m-G-(6)** erfolgte in Gegenwart der Base Triethylamin zu Aktivierung des Dibenzylphosphonats (Abbildung 4.7). Die Reaktionszeiten betragen mehrere Tage und waren für die *para*-substituierten Aldehyde **5-p-(5)** und **5-p-(6)** am längsten. Die Phosphonate wurden als Racemate in guten Ausbeuten (38–79 %) isoliert.

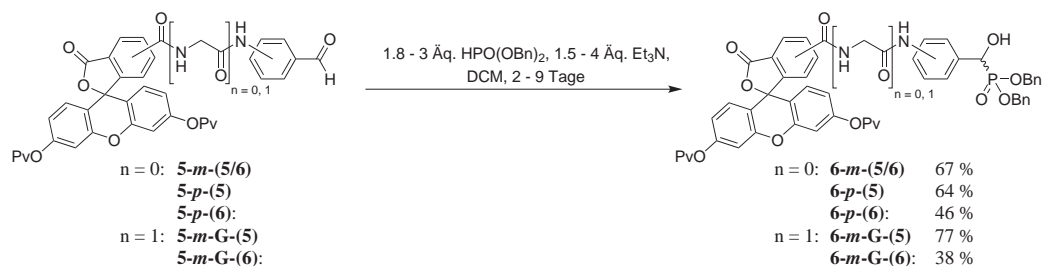


Abb. 4.7.: Darstellung der α -Hydroxymethylphosphonate mit der Pudovik-Reaktion.

Die Reaktivität der *para*- und *meta*-substituierten Benzaldehyde gegenüber Nukleophilen wird durch die verschiedenen Substituenten beeinflusst. Substituenten mit +M-Effekt wie Amidgruppen senken die Reaktivität des Aldehydes (Abbildung 4.8). *Para*-Substituenten haben einen größeren Einfluss auf die Reaktivität des Carbonyls, wie es bei der Reaktion der Aldehyde **5** beobachtet wurde.

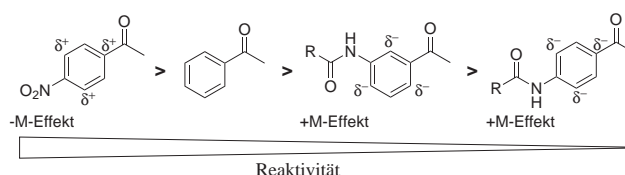


Abb. 4.8.: Reaktivität des Benzaldehyds in Abhängigkeit von der Substitution des Aromaten.

4.2.4. Phosphoramiditkupplung und Entschützung zur Zielverbindung

Der Kupplungsreaktion der α -Hydroxymethylphosphonate **6** mit Cytidinphosphoramidit **1** unter Katalyse durch 1*H*-Tetrazol wurde Molsiebpulver beigefügt, um einen Ausbeuteverlust durch Wasserspuren zu vermeiden. Das α -Hydroxymethylphosphonat **6-m-(5/6)** wurde als Mischung des 5- und 6-Isomers eingesetzt, deren Trennung auf der Stufe der vollständig geschützten Verbindung **7-m-(5/6)** erfolgte. Die Debenzylierung der Verbindungen **7** wurde durch heterogene Hydrierung mit Pd/C und Wasserstoff bei Normaldruck und anschließendem Abfiltrieren des Katalysators durchgeführt. Mit Natriummethanolat wurden die basenlabilen Schutzgruppen von den Verbindungen **7** entfernt und RP-18 HPLC unter Verwendung eines Triethylammoniumbicarbonat Puffers (TEAB; die Nucleotide eluieren als Triethylammonium-Ionenpaare^[176]) und Umwandlung in die Natriumsalze ergab die fluoresceinmarkierten Inhibitoren **8**. Bei einem pH-Werte von ~ 7.5 liegt Fluorescein als Dianion vor^[177].

Die Entschützung von **7-m-(5)** und **7-m-(6)** lieferte die fluoresceinmarkierten Inhibitoren **8-m-(5)** und **8-m-(6)** bei einer Gesamtausbeute von 43 % über zwei Reaktionsstufen (Abbildung 4.9). Eine HPLC-Trennung der *R*- und *S*-Isomere (bezogen auf die Konfiguration des α -Phosphonatkohlenstoffs) von **8-m-(5)** oder **8-m-(6)** war nicht möglich. Dementsprechend zeigten im ¹H-NMR Spektrum die isolierten Dubletts des Cytidin H-5 und H-1' ein 1:1 Verhältnis der beiden Diastereomere. Das α -Phosphonatständige Proton zeigte aufgrund der ²J_{H,P}- und ³J_{H,P}-Kopplung ein charakteristisches

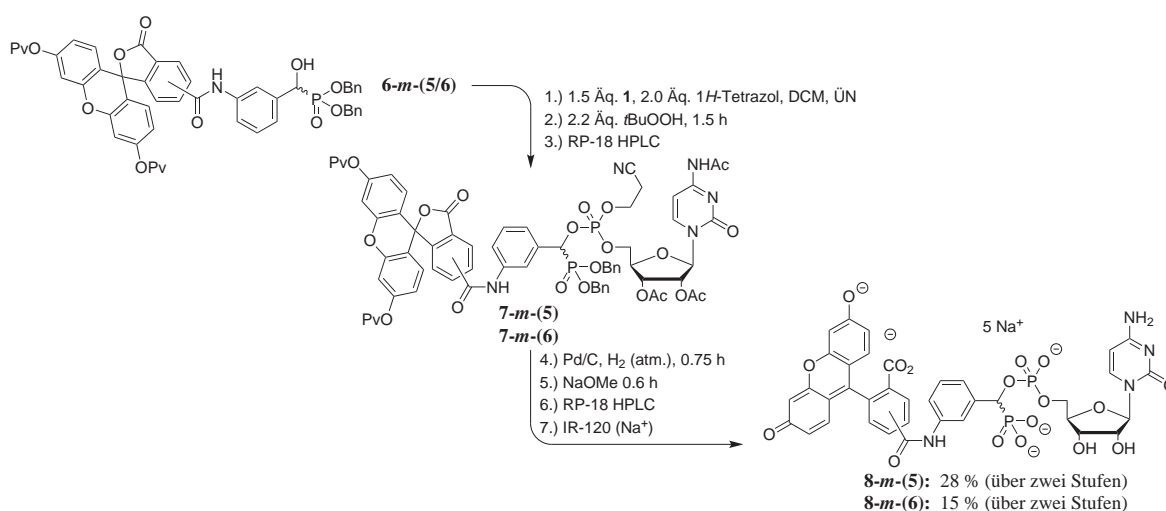


Abb. 4.9.: Entschützung zu den *meta*-substituierten fluoresceinmarkierten Inhibitoren.

Dublett von Dublett mit Kopplungskonstanten von ~ 14 Hz sowie ~ 10 Hz (siehe Seite 230). Im ^{31}P -NMR war die Kopplung der beiden Phosphoratome zueinander zu beobachten. Die Signale des Phosphonatphosphors wiesen identische chemische Verschiebungen auf, so dass aufgrund der gleichen Kopplungskonstante trotz der Diastereomerenmischung nur ein Dublett beobachtet wurde (siehe Seite 232).

Die Darstellung der Verbindungen **8-*m*-G-(5)** und **8-*m*-G-(6)** gelang in guten Ausbeuten von 44 % sowie 64 % über zwei Reaktionsstufen (Abbildung 4.10). In mehreren Reaktionsansätzen war allerdings die Debenzylierung unvollständig und konnte auch durch erneute Hydrierung nicht vollendet werden. Bei der NMR-Charakterisierung zeigten die Cytidin H-5 und H-1' Protonen ein 1:1 Verhältnis der *R*- und *S*-Isomere (siehe Seiten 250, 251, 253 und 254).

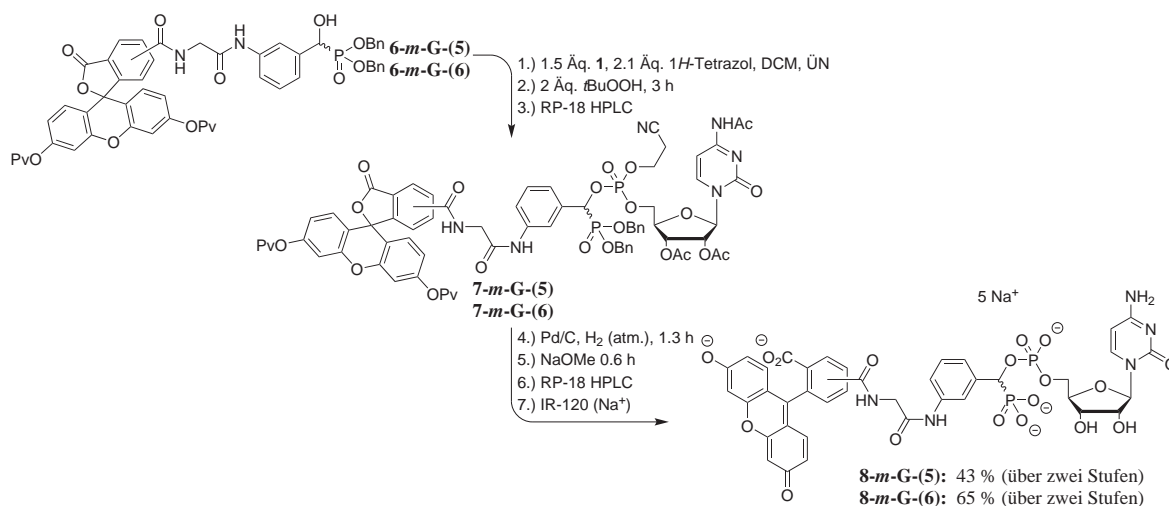


Abb. 4.10.: Entschützung zu den *meta*-Glycin-substituierten fluoresceinmarkierten Inhibitoren.

Im Gegensatz zu der Entschützung der *meta*-substituierten Verbindungen war die Entschützung von **7-*p*-(5)** und **7-*p*-(6)** von einer Zersetzung der Produkte begleitet. Zusätzlich wurde in mehreren Reaktionsansätzen eine Einfachdebenzylierung beobachtet. Die Isolierung der Verbindung **8-*p*-(5)** gelang nicht und Verbindung **8-*p*-(6)** wurde in sehr schlechter Ausbeute (4 %) erhalten (Abbildung 4.11). Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde die Verbindung **8-*p*-(6)** nur ^1H -NMR spektroskopisch als das Triethylammoniumsalz charakterisiert, bevor es in das Natriumsalz überführt wurde. Die Integration der Triethylaminsignale ergab, dass ein Pentatriethylammoniumsalz erhalten wurde (siehe Seite 242). Dies bestätigte, dass Fluorescein unter diesen Bedingungen als Dianion vorlag.

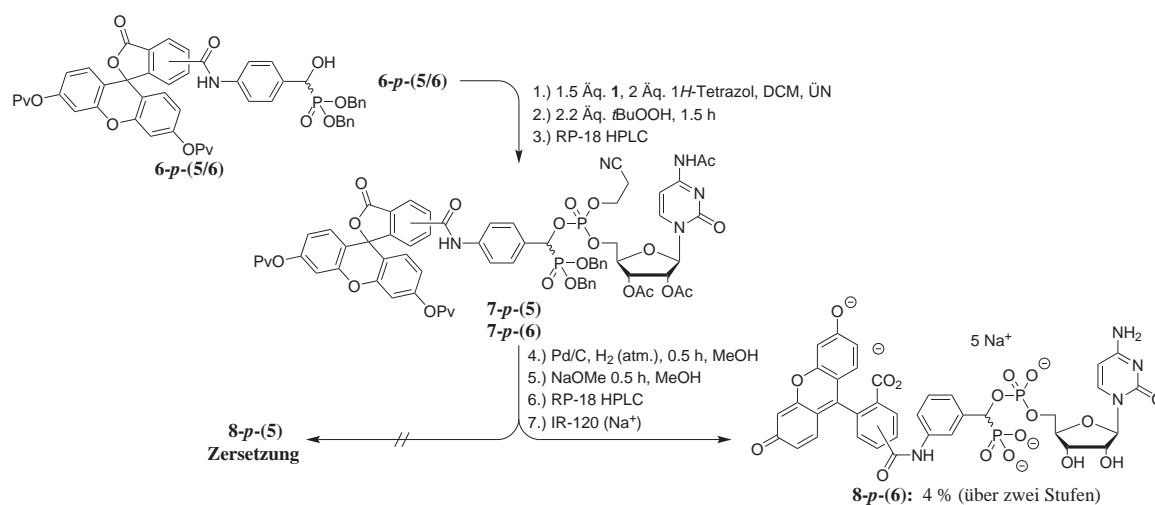


Abb. 4.11.: Entschützung zu den *para*-substituierten fluoresceinmarkierten Inhibitoren.

Bei der versuchten Darstellung von 8-p-(5) wurden eine LC/MS und NMR-Analyse des Rohproduktes vorgenommen. Im ³¹P-NMR-Spektrum fehlte die für 8-p-(5) erwartete P-P-Kopplung und es wurde nur ein Signalsatz beobachtet (Abbildung 4.12 A). Dies zeigte eine Spaltung des Phosphats vom α -Methylphosphonat unter Verlust der Diastereomerie. Das LC/MS-Chromatogramm zeigte einen Peak, dessen Masse einer Verbindung zugeordnet werden konnte, in der CMP durch einen Methoxy-Rest substituiert wurde (Abbildung 4.12 B).

Daraus kann geschlossen werden, dass die Bindungsspaltung am benzylichen α -Phosphonatkohlenstoff stattfand. Dies korreliert mit Beobachtungen früherer Inhibitorsynthesen aus der Gruppe von R.R. SCHMIDT. In speziellen Fällen fand eine Hydrierung

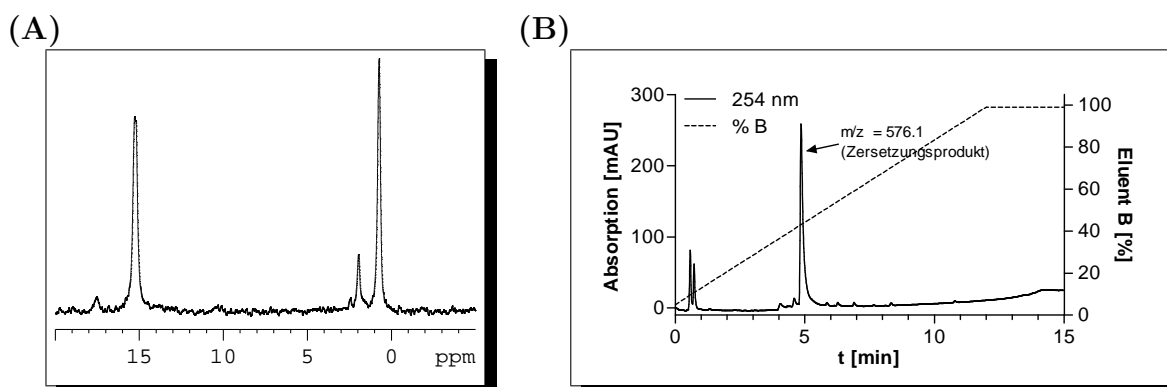


Abb. 4.12.: (A) ³¹P-NMR (122 MHz, D₂O) und (B) LC/MS-Chromatogramm des Zersetzungsproduktes.

der benzyliischen Position am Phosphat statt, die als Nebenreaktion bei der Hydrogenolyse von Benzylschutzgruppen auftrat^[178].

4.2.5. Ergebnisse der Darstellung der diastereomergemischten fluoresceinmarkierten Inhibitoren

Es gelang die Darstellung der *meta*-substituierten fluoresceinmarkierten Inhibitoren ohne (**8-*m*-(5)** und **8-*m*-(6)**) und mit Glycinlinker (**8-*m*-G-(5)** und **8-*m*-G-(6)**) sowie einer *para*-substituierten (**8-*p*-(6)**) fluoresceinmarkierte Verbindung. Dabei zeigte sich, dass die Benzylschutzgruppe für die Darstellung der fluoresceinmarkierten Inhibitoren nur bedingt geeignet war, da unter den Reaktionsbedingungen der Hydrierung die *para*-substituierten Verbindungen instabil waren.

Die Diastereomere der fluoresceinmarkierten Inhibitoren hatten identische Retentionszeiten, so dass eine HPLC-Trennung nicht möglich war.

4.3. Stereoselektive Synthese fluoresceinmarkierter Inhibitoren

Das nächste Ziel war die stereoselektive Darstellung der *R*- und *S*-Isomere der fluoresceinmarkierten Inhibitoren, um die maximalen Affinitäten gegenüber den Sialyltransferasen erreichen zu können.

Für die enantioselektive Darstellung von α -Hydroxymethylphosphonaten wurden verschiedene Methoden entwickelt. Varianten der Abramov- und Pudovik-Reaktion durch Einsatz nichtracemischer Phosphorreagenzien oder chiraler Katalysatoren zur Kontrolle der Stereochemie, die enantioselektive Reduktion von α -Ketophosphonaten^[179] als auch die chemische und enzymatische Racematspaltung ermöglichen den Zugang zu den Enantiomeren^[180]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der stereokontrollierten Oxidation des Methylenanions von achiralen Benzylphosphonaten mit chiralen Oxidationsmitteln. So wurden bei den Synthesen diastereomerreiner Inhibitoren der Sialyltransferasen bereits erfolgreich chirale apolare Oxaziridine eingesetzt^[81,82,181].

Oxaziridine bestehen aus einem reaktiven gespannten Dreiring aus Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff und fungieren gewöhnlicherweise als Stickstoff-Donor. Durch elektronenziehende und sterisch anspruchsvolle Substituenten am Stickstoff kann die Elektrophilie auf den Sauerstoff verschoben werden, und ermöglicht die Oxidation von Enolaten. Das von DAVIS *et al.* entwickelte (+)- und (-)-(8,8-Dichlorcampheryl-sulfonyl)oxaziridin ((+)- und (-)-**10**, Abbildung 4.13) wurde für die asymmetrische Oxidation von Enolaten sowie Seleniden und Sulfiden verwendet^[182,184], aber von WIEMER

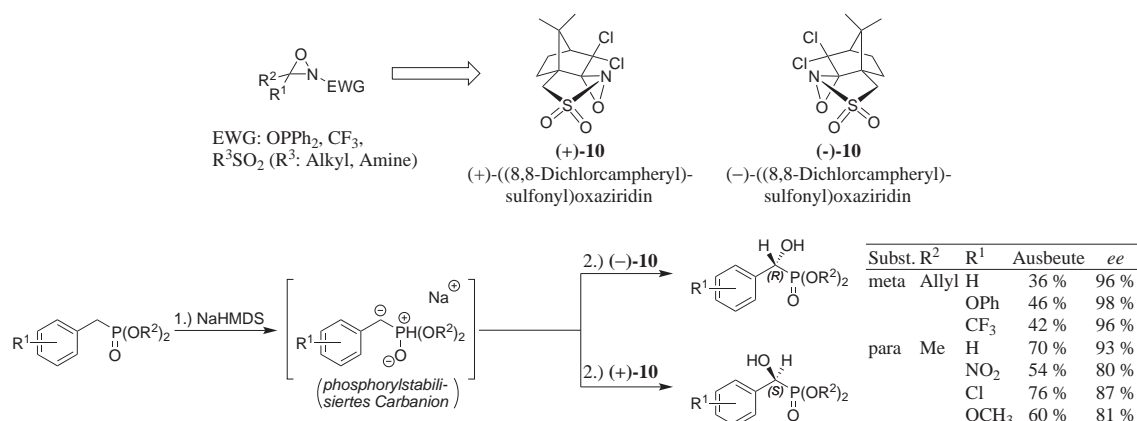


Abb. 4.13.: Oxaziridine^[182] und Beispiele ihrer Applikation bei der Hydroxylierung von phosphoryl stabilisierten Carbanionen^[181,183].

et al. auch zur enantioselektiven Hydroxylierung von phosphoryl-stabilisierten Carbanionen eingesetzt^[183,185].

4.3.1. Synthesepanung

Die Bildung des Carbanions für die Oxidation durch das Oxaziridin erfordert den Einsatz sehr starker Basen und schloss daher die Einführung des pivaloylgeschützten Carboxyfluoresceins vor der Oxaziridinoxidation aus. Die Synthese sollte daher mit einem Nitrobenzylbromid (**12**) beginnen, welches in einer Michaelis-Arbuzov Reaktion mit einem Phosphitriester (**11**) das Nitrobenzylphosphonat **13** ergab. Dieses sollte nach Deprotonierung mit dem entsprechenden Oxaziridin zum chiralen α -Hydroxymethylphosphonat **14** oxidiert werden. Die Nitrogruppe von **14** sollte zum Anilin **15** reduziert werden und so die Kupplung mit Di-*O*-Pivaloylcarboxyfluorescein ermöglichen (Abbildung 4.14). Die Allylschützung des Phosphonats wurde gewählt, um die unzuverlässige Debenzylierungsreaktion zu vermeiden.

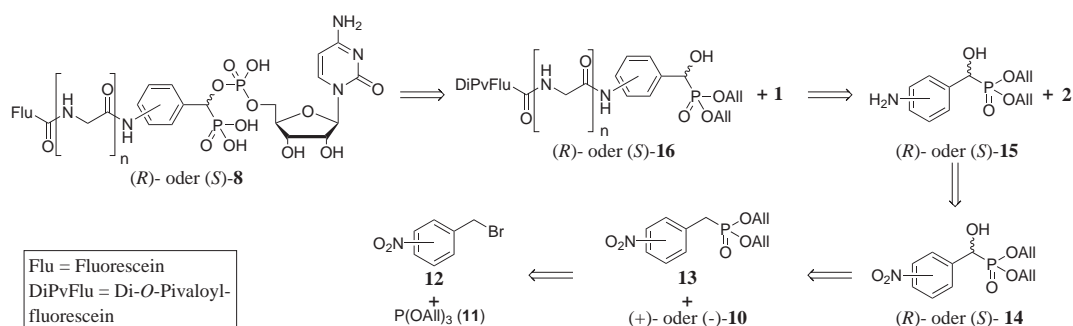


Abb. 4.14.: Synthesepan zur Darstellung diastereomerreiner fluoresceinmarkierter Inhibitoren.

4.3.1.1. Test der Reduktionsreaktion mit anschließender Carboxyfluoresceinkupplung

Die Reduktion des Nitroaryls **14** zum Anilin **15** und dessen anschließende Kupplung mit dem geschützten Carboxyfluorescein **2-(6)** wurde zunächst mit der einfach zugänglichen racemischen Testsubstanz **14-*m*** getestet, bevor sie mit dem aufweniger darzustellenden chiralen α -Hydroxymethylphosphonaten durchgeführt wurde. Die Reduktion erfolgte mit 3 Reaktionsäquivalenten¹ Sn(II)Cl₂ (Abbildung 4.15 A).

¹Da Zinn(II) in der Reaktion zu Zinn(IV) oxidiert wird, entspricht ein Reaktionsäquivalent drei Moläquivalenten.

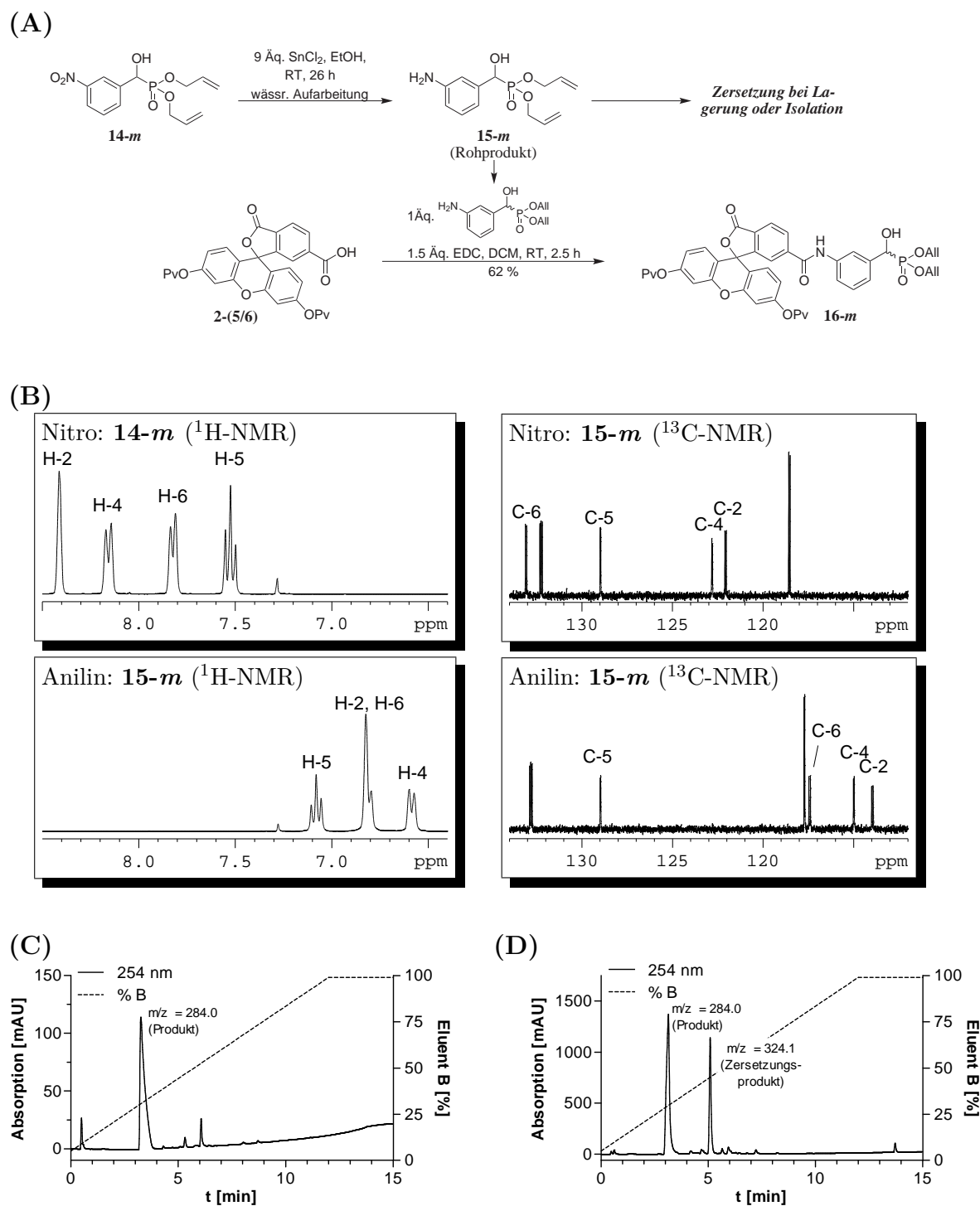


Abb. 4.15.: Test der Reduktion von **14-m** zu **15-m** und Kupplung mit Carboxyfluorescein: (A) Reaktionsgleichung, (B) NMR-Analyse (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 76 MHz, CDCl_3) und (C) LC/MS-Reaktionskontrolle der Reduktionsreaktion; (D) Zersetzung von **15-m** bei Lagerung in DCM.

Die Reduktion von **14-m** verlief glatt (LC/MS-Analyse, Abbildung 4.15 C), jedoch war das Anilin **15-m** instabil und dessen Trocknung oder Lyophilisation führte zur Zersetzung. In Dichlormethan gelöst konnte **15-m** für mehrere Tage gelagert werden. Bei längerer Lagerzeit, bildete sich ein Abbauprodukt, dessen Masse einem triallylierten α -Hydroxymethylphosphonat entsprach (Abbildung 4.15 D). Das Anilin **15-m** musste daher nach der wässrigen Aufarbeitung direkt für die Kupplung mit dem EDC aktivierten **2-(6)** eingesetzt werden. Das Kupplungsprodukt **16-m** wurde in guter Ausbeute (62 %) erhalten (Abbildung 4.15 A).

Die Reduktion der Nitrogruppe wurde indirekt mit der NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Die ^1H - und ^{13}C -Signale des Nitro-substituierten Aromaten **14-m** waren durch die elektronenziehende Nitrogruppe entschirmt und tieffeldverschoben. Nach der Reduktion zum Anilin **15-m** bewirkte die elektronendonierende Aminogruppe eine Entschirfung und die Signale erschienen hochfeldverschoben (Abbildung 4.15 B). Aufarbeitungsbedingt war in der Probe viel Wasser enthalten, so dass die austauschenden Aminprotonen nicht detektiert wurden. Das IR-Spektrum des Edukts **14-m** zeigte die symmetrische und asymmetrische N=O Valenzschwingungen bei 1532 und 1350 cm^{-1} , die nach der Reduktion zu **15-m** nicht mehr auftraten. Dafür wurden bei 1630 und 1608 cm^{-1} die Banden der N-H-Deformationsschwingungen und bei 3267 cm^{-1} die der N-H Valenzschwingungen beobachtet (siehe Seite 268).

4.3.2. Darstellung der Benzylphosphonate

Die Nitrobenzylphosphonate **13-m** und **13-p** wurden mikrowellenunterstützt bei 105°C mit der Michaelis-Arbuzov-Reaktion^[186] aus den Nitrobenzylbromiden **12-m** und **12-p** und Triallylphosphit (**11a**)^[187] hergestellt (Abbildung 4.16). Die bei Raumtemperatur festen Nitrobenzylphosphonate **13-m** und **13-p** konnten bei $\sim 200^\circ\text{C}$ im Feinvakuum destilliert werden und wurden in guten Ausbeuten (57–67 %) erhalten.

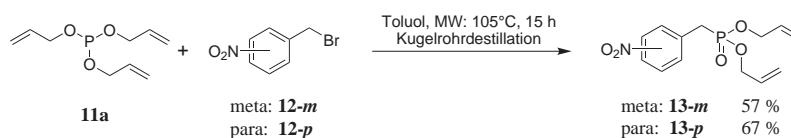


Abb. 4.16.: Synthese der Benzylphosphonate mit der Michaelis-Arbuzov Reaktion.

4.3.3. Darstellung der chiralen α -Hydroxymethylphosphonate durch Oxaziridinoxidation

Die stereoselektiven Oxidationen der Benzylphosphonate wurden nach der von WIEMER beschriebenen Methode durchgeführt^[183].

Im ersten Schritt der Reaktion erfolgte die Deprotonierung der Benzylphosphonate **13-m** und **13-p** durch die Base Natriumhexamethyldisilazan (NaHMDS). Die phosphoryl-stabilisierten Carbanionen zeichneten sich durch sehr intensive Färbungen aus (*meta*: blau, *para*: rot). Ihre Oxidation erfolgte durch das entsprechende Oxaziridin ((-)- oder (+)-**10**). Die chiralen α -Hydroxymethylphosphonate (**R**)- und (**S**)-**14-m** sowie (**R**)- und (**S**)-**14-p** wurden in typischen^[181,183] Ausbeuten (53–66 %) und Enantiomerenüberschüssen (83–87 % *ee*) erhalten (Abbildung 4.17).

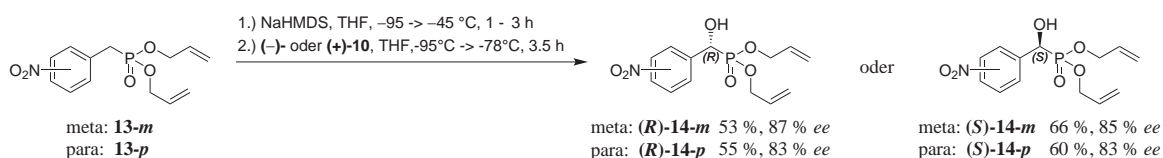


Abb. 4.17.: Stereoselektive Oxidation der Benzylphosphonate zu den (**R**) und (**S**)- α -Hydroxymethylphosphonaten.

4.3.3.1. Konfigurationsbestimmung

MOSHER und DALE entwickelten Strukturmodelle für die Konfigurationsbestimmung von chiralen Alkoholen, die mit Mandelatderivaten verestert sind^[188]. Die Anwendung dieses Modells auf Ester der (**R**)- bzw. (**S**)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenylsäure ((**R**)/(**S**)-MTPA) mit α -Hydroxymethylphosphonaten ermöglicht die Bestimmung ihres Enantiomerenüberschusses (*ee*) und ihrer absoluten Konfiguration^[179,189]. Danach wird angenommen, dass in der bevorzugten Konformation der α -Wasserstoff des

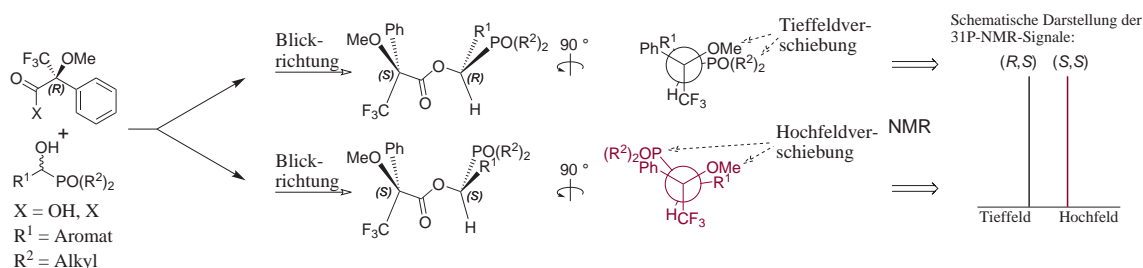


Abb. 4.18.: MTPA-Ester von α -Hydroxymethylphosphonaten.

Phosphonats und die Trifluormethylgruppe von MTPA ekliptisch zu einander orientiert sind. Dementsprechend überlappt das Phosphonat entweder mit dem Methyl- oder dem Phenylrest von MTPA und das Phosphorsignal erfährt eine Tief- oder Hochfeldverschiebung. Gleiches gilt für die Methylgruppe von MTPA, die entweder in Deckung zum Phosphonat oder zum Benzylrest des Phosphonats stehen kann. Da man MTPA mit bekannter Stereochemie einsetzt, lässt sich anhand der NMR-Signale des Phosphors und der Methylgruppe die Konfiguration des α -Hydroxymethylphosphonats bestimmen (Abbildung 4.18).

Die Darstellung der (*S*)-MTPA-Ester ((*R,S*)/(*S,S*)-**17-m/p**) der chiralen α -Hydroxymethylphosphonate ((*R*)/(*S*)-**14-m/p**) erfolgte mit dem (*R*)-MTPA-Säurechlorid und Pyridin als Base (Abbildung 4.19). Sie wurde in einem NMR-Röhrchen in CDCl₃ durchgeführt, so dass der Reaktionsfortschritt als auch der Enantionmerenüberschuss direkt durch NMR-Messungen bestimmt werden konnten, ohne dass es einer Aufarbeitung bedurfte. Dadurch wurde eine kinetische oder chromatographische Racemattrennung ausgeschlossen.

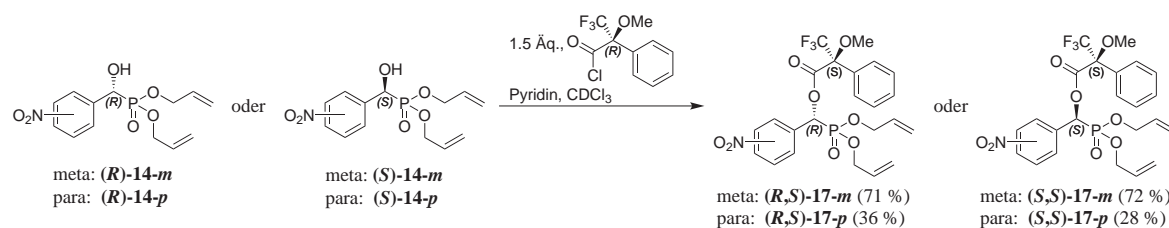


Abb. 4.19.: Darstellung der MTPA-Ester der chiralen α -Hydroxymethylphosphonate.

Anhand der Integrale der MTPA-Ester wurde der Enantiomerenüberschuss bestimmt, nachdem die Phosphorsignale der Edukte (*R*)/(*S*)-**14-m/p** nicht mehr detektiert wer-

Tab. 4.1.: Ergebnisse der stereoselektiven Oxaziridinoxidation.

	[α]	(S)-MTPA-Ester			% ee
		³¹ P (<i>R,S</i>) [δ] ^a	³¹ P (<i>S,S</i>) [δ] ^a	$\Delta\delta$	
(<i>R</i>)- 14-m	24.0°	16.03 (93.6 %)	15.67 (6.4 %)	0.36	87.2
(<i>S</i>)- 14-m	-20.0°	16.09 (7.8 %)	15.74 (92.2 %)	0.35	84.6
(<i>R</i>)- 14-p	14.6°	15.86 (91.6 %)	15.51 (8.4 %)	0.35	83.2
(<i>S</i>)- 14-p	-13.2°	16.01 (8.3 %)	15.66 (91.7 %)	0.35	83.4

^a Die Messungen erfolgten in Pyridin/CDCl₃-d₁ (für (*R*)/(*S*)-**14-m**: 33:67; für (*R*)/(*S*)-**14-p** 38:62.

den konnten, also die Reaktion abgeschlossen war. In den ^{31}P -NMR-Spektren stammte das hochfeldverschobene Signal von den (*S,S*)-Diastereomeren der MTPA-Ester **17**, während das tieffeldverschobene Signal den (*R,S*)-Diastereomeren zuzuordnen war (Abbildung 4.20). Die Verhältnisse der ^{31}P -Signale ergab für die stereoselektiv dargestellten α -Hydroxymethylphosphonate Enantiomerenüberschüsse zwischen 83.2–87.2 % (Tabelle 4.1).

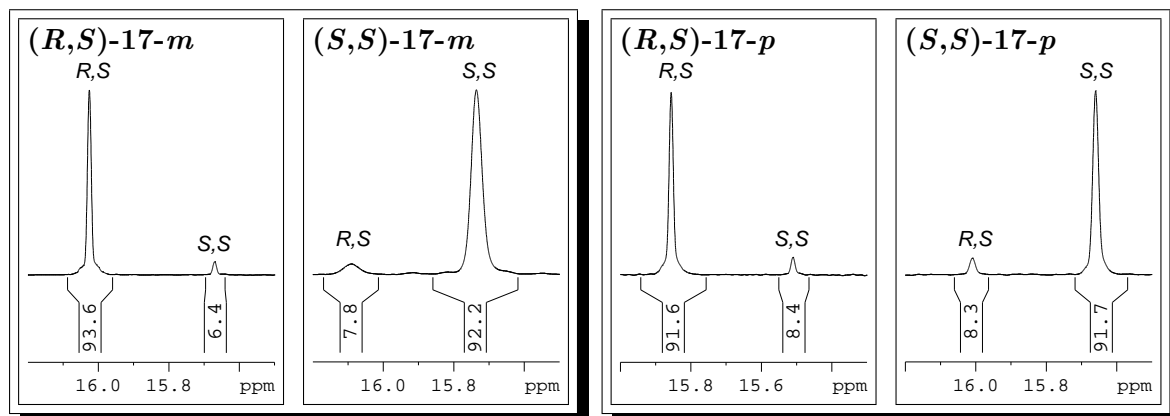


Abb. 4.20.: ^{31}P -NMR-Spektren (122 MHz, CDCl_3) der (*S*)-MTPA-Ester der α -Hydroxymethylphosphonate.

4.3.4. Reduktion des Nitroaryls und Carboxyfluoresceinkupplung

Die Reduktion von (*R*)- und (*S*)-**14-m** sowie (*R*)- und (*S*)-**14-p** wurde unter den Bedingungen durchgeführt, die bei der Testreaktion ermittelt wurden (Kapitel 4.3.1.1). Die Ausbeuten für die *para*-substituierten Verbindungen (*R*)-**16-p** und (*S*)-**16-p** waren mäßig (22–34 %) und wurden möglicherweise durch die großen Mengen des Zinnhydroxids vermindert, die bei der wässrigen Aufarbeitung mit NaHCO_3 ausfallen. Die Re-

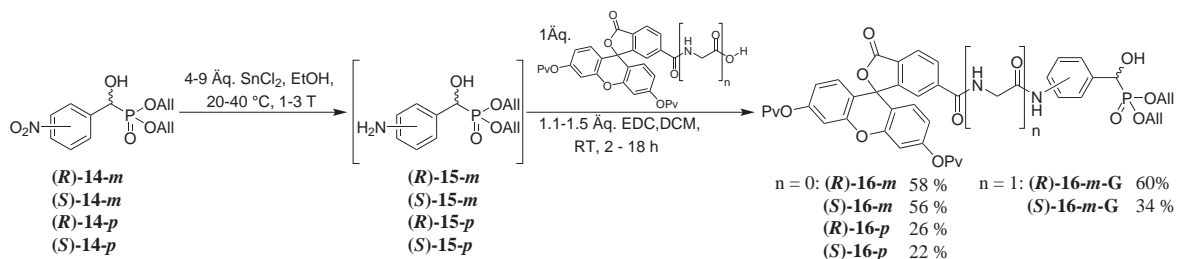


Abb. 4.21.: Nitroreduktion von **14** und Kupplung der Aniline **15** mit 6-Di-*O*-pivaloylfluoresceinamidoessigsäure (**2-(6)-G**).

duktionen der *meta*-substituierten Verbindungen (**R**)-14-*m* bzw. (**S**)-14-*m* wurden daher mit nur 4 statt 9 moläquivalenten Zinn(II)chlorid durchgeführt. Da die Reaktion langsamer ablief, wurde sie bei leichter Erwärmung bei 40 °C durchgeführt. Die Verbindungen (**R**)-16-*m* und (**S**)-16-*m* bzw. (**R**)-16-*m*-G und (**S**)-16-*m*-G wurden nach der Kupplung der Aniline mit 6-Di-*O*-Pivaloylcarboxyfluorescein (**2**-(**6**)) oder 6-Di-*O*-pivaloylfluoresceinamidoessigsäure (**2**-(**6**)-G) in überwiegend besseren Ausbeuten (~60 %) erhalten (Abbildung 4.21).

4.3.5. Phosphoramiditkupplung und Entschützungsreaktion zu den diastereomerreinen fluoresceinmarkierten Inhibitoren

Die Kupplung der chiralen fluoresceinkonjugierten α -Hydroxymethylphosphonate (**R**)/(**S**)-16-*m*/*p* an das Cytidinphosphoramidit **1** erfolgte wie bereits für die Synthese der racemischen Sonden beschrieben (Kapitel 4.2.4). Die Entschützung wurde nicht mit der üblichen zweistufigen Methode mit palladiumkatalysierten Allyltransfer auf Dimedon^[190] und anschließender Chromatographie vor der basischen Entschützung^[77,78,191], sondern in einem Arbeitsschritt durch die Reaktion mit Pd(PPh₃)₄ und K₂CO₃ in Methanol nach einer Methode von THAYUMANAVAN *et al.*^[190] durchgeführt. Die Base erzeugt *in situ* Methanolat, welches das Allyl aus dem Palladiumkomplex abspaltet. Unter diesen Reaktionsbedingungen gelang neben der Synthese von (**R**)- oder (**S**)-8-*m*-(**G**)-(6) auch die Entschützung zu den *para*-substituierten Verbindungen (**R**)-8-*p*-(6) und (**S**)-8-*p*-(6) (Abbildung 4.22).

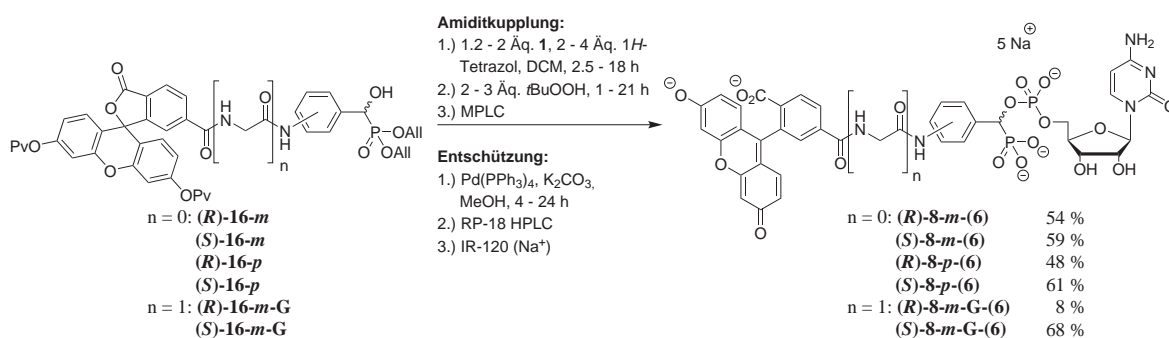


Abb. 4.22.: Phosphoramiditkupplung und Entschützungsreaktion zu den diastereomerreinen fluoresceinmarkierten Inhibitoren.

4.3.6. Bestimmung der Diastereomerenüberschüsse

Die abschließende Bestimmung der Diastereomerenüberschüsse erfolgte anhand der ^1H -NMR-Signale des Cytidin H-5 oder H-1', die isoliert von den aromatischen und aliphatischen Signalen zwischen 6.0 und 5.5 ppm auftraten und deren chemische Verschiebungen eine große Abhängigkeit von der Stereoisomerie aufwiesen. Die Signale der *S*-Isomere erschienen gegenüber den Signalen der *R*-Isomere tieffeldverschoben, nur bei (***R***)-8-*m*-(6) war die Reihenfolge vertauscht und die Signale der *R*-Isomere erschienen im Tieffeld. Eine Ursache dafür kann eine andere Konzentration der Verbindung bei der NMR-Messung sein (Abbildung 4.23). Die Kopplungskonstanten der H-1'-Dubletts der *S*-Isomere waren mit 4.4–4.6 Hz größer als die der *R*-Isomere mit 2.5–3.9 Hz (Tabelle 4.2). Auch bei den diastereomergemischten Verbindungen wurden entsprechend Kopplungskonstanten von 4.4–4.6 Hz für das tieffeld- und 3.3–3.8 Hz für das hochfeldverschobene H-1'-Signal gemessen (Spektren im Anhang ab Seite 229). Das H-1'-Hauptsignal von (***R***)-8-*m*-(6) hatte gegenüber dem Restsignal die kleinere Kopplungskonstante. Dies bestätigte, dass es sich trotz der inversen relativen chemischen Verschiebungen um das *R*-Isomer handelte.

Es wurden für jede Verbindung die Signale integriert, deren *R*- und *S*-Isomerensignale die beste Separation aufwiesen. Die Diastereomerenüberschüsse (83–84 % *de*) entsprachen den Enantiomerenüberschüssen der α -Hydroxymethylphosphonate (83–87 % *ee*), abgesehen von Verbindung (***R***)-8-*p*-(6), dessen *de* mit 71 % deutlich unter dem zu erwartenden Wert von 83 % (*ee* für (***R***)-*p*-6) lag (Tabelle 4.1).

Die ^{31}P -NMR Spektren zeigten die tieffeldverschobenen Phosphonat- und die hochfeldverschobenen Phosphatsignale, die beide aufgrund der P,P-Kopplung zu Dubletts

Tab. 4.2.: Diastereomerenüberschüsse der FP-Sonden aus der stereoselektiven Synthese.

Verbindung	^1H -Signal	$\Delta\delta$ [ppm]	Isomer		% <i>de</i>	3J (H-1')
			(<i>R</i>)	(<i>S</i>)		
(<i>R</i>)-8- <i>m</i> -(6)	H-5	0.067	91.4 %	8.6 %	82.8	2.5 Hz
(<i>S</i>)-8- <i>m</i> -(6)		0.091	7.8 %	92.2 %	84.4	4.4 Hz
(<i>R</i>)-8- <i>p</i> -(6)	H-1'	0.050	85.6 %	14.4 %	71.2	3.9 Hz
(<i>S</i>)-8- <i>p</i> -(6)		0.052	8.5 %	91.5 %	83.0	4.6 Hz
(<i>R</i>)-8- <i>m</i> -G-(6)	H-5	0.071	92.1 %	7.9 %	84.2	3.5 Hz
(<i>S</i>)-8- <i>m</i> -G-(6)		0.037	8.7 %	91.3 %	82.6	4.6 Hz

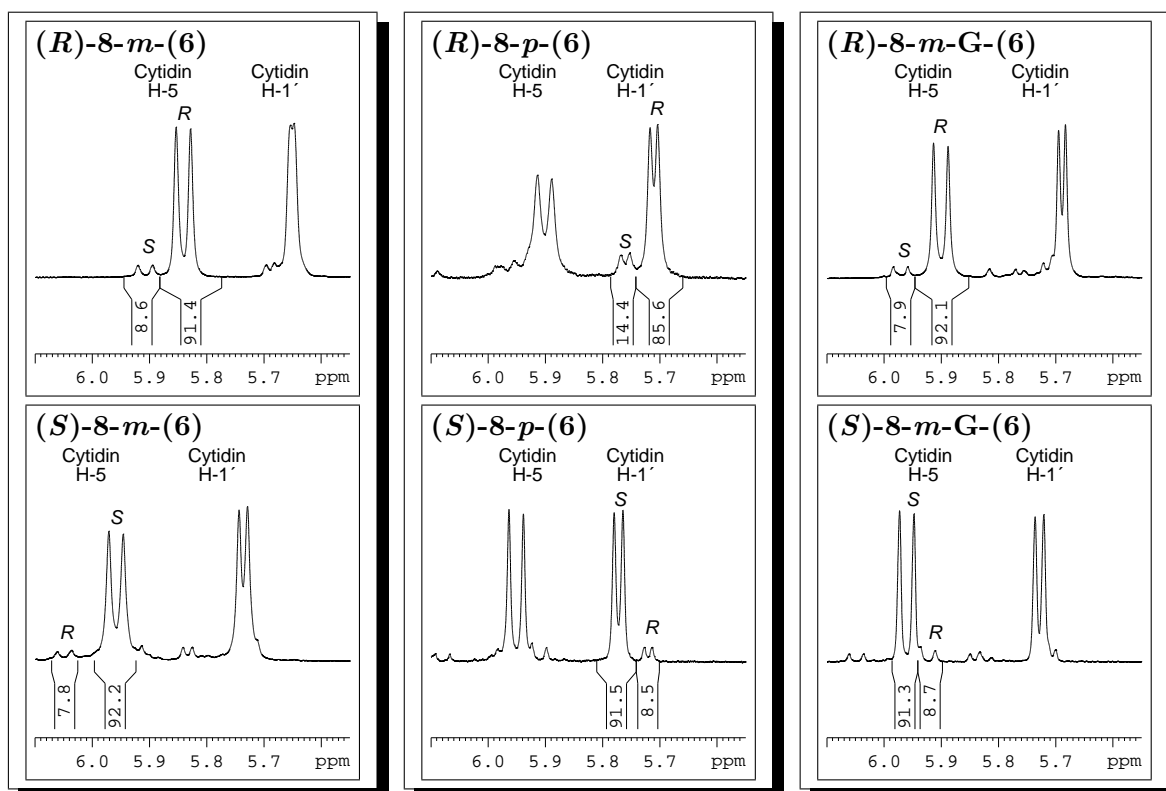


Abb. 4.23.: Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren (300 MHz, D_2O) zur Bestimmung der Diastereomerenüberschüsse.

aufspalteten. Die Restsignale des Unterschussisomers erschienen als leicht versetzte Dubletts geringer Intensität (Spektren im Anhang ab Seite 229).

4.3.7. Ergebnisse der stereoselektiven Synthese

Die *meta*- ((R) -8-*m*-(6), (S) -8-*m*-(6)), *meta*-Glycin ((R) -8-*m*-(G)-(6), (S) -8-*m*-(G)-(6)) und *para*-substituierten ((R) -8-*p*-(6), (S) -8-*p*-(6)) fluoresceinmarkierten Inhibitoren wurden in Diastereomerenüberschüssen zwischen 71–84% *de* dargestellt.

Bereits die Testreaktion für die Reduktion und Kupplung mit Carboxyfluorescein zeigte, dass diese Syntheseroute gegenüber dem Syntheseweg für die Darstellung der diastereomergemischten FP-Sonden vorteilhaft ist, da das Label an einer späten Stufe der Synthese eingefügt wird. Die Allyl-geschützten Verbindungen waren unter der einfach durchzuführenden einstufigen Entschützungsreaktion stabil, so dass auch die Darstellung der *para*-substituierten Verbindungen (R) -8-*p*-(6) und (S) -8-*p*-(6) in guten Ausbeuten gelang.

4.4. Synthese unmarkierter Inhibitoren

Für die Validierung der FP-Sonden (Kapitel 5.4) wurden unmarkierte Liganden des Rezeptors benötigt, die als kompetitive Inhibitoren bekannt sind und die FP-Sonde aus ihrem Enzymkomplex verdrängen können. Dafür wurde das Analogon **18** (**ix-c** aus Abbildung 2.9) der fluoresceinmarkierten Inhibitoren, CDP als schwacher Inhibitor (kommerziell erhältlich) und ein neues vereinfachtes Übergangszustandsanalogon (**19**) dargestellt. Die Inhibitoren werden wie folgt bezeichnet: **ii-a**: **I-CDP**, **18**: **I-NHAc** und **19**: **I-NO₂** (Abbildung 4.24).

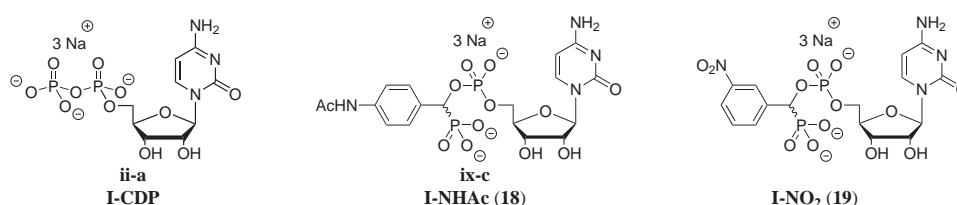


Abb. 4.24.: Inhibitoren für die FP-Sondenvalidierung.

4.4.1. Darstellung des *N*-Acetyl-substituierten Inhibitors

Die Synthese von **I-NHAc** erfolgte mit der bereits etablierten Synthesemethode über die Pudovik-Reaktion und Phosphoramiditroute (Abbildung 4.25). Die Entschützung von Verbindung **22** zum **I-NHAc** wurde nach der Methode von THAYUMANAVAN *et al.* in einem Schritt durchgeführt und ergab **I-NHAc** in mäßiger Ausbeute (24% über zwei Stufen). Die Trennung der Diastereomere bei der HPLC-Reinigung war auch bei dieser Verbindung nicht möglich. Sowohl das ¹H-NMR als auch das ³¹P-NMR zeigten

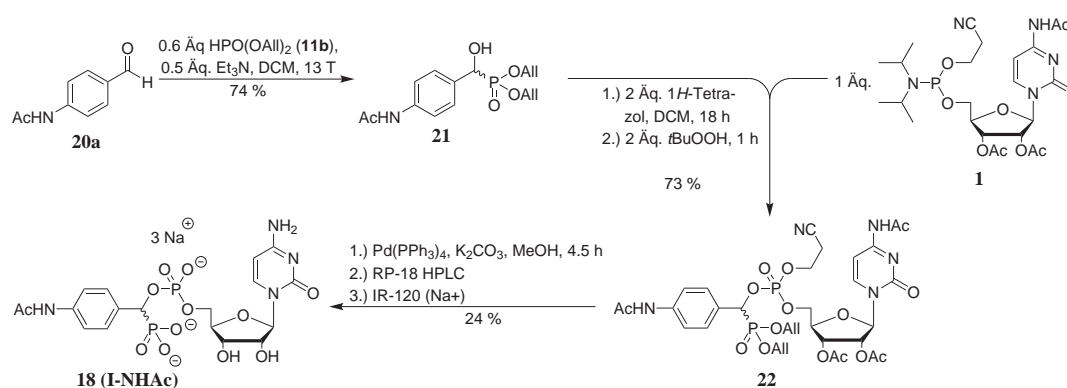


Abb. 4.25.: Darstellung des Inhibitors **I-NHAc**.

das 1:1 Verhältnis des *R*- und *S*-Isomers aufgrund der stereounspezifischen Pudovik-Reaktion (Abbildung 4.26). Wie bei den fluoresceinmarkierten Inhibitoren zeigte das hochfeldverschobene Protonensignal des H-1' die kleinere Kopplungskonstante ($\delta = 5.82$ ppm: $J = 4.4$ Hz; $\delta = 5.75$ ppm: $J = 3.2$ Hz).

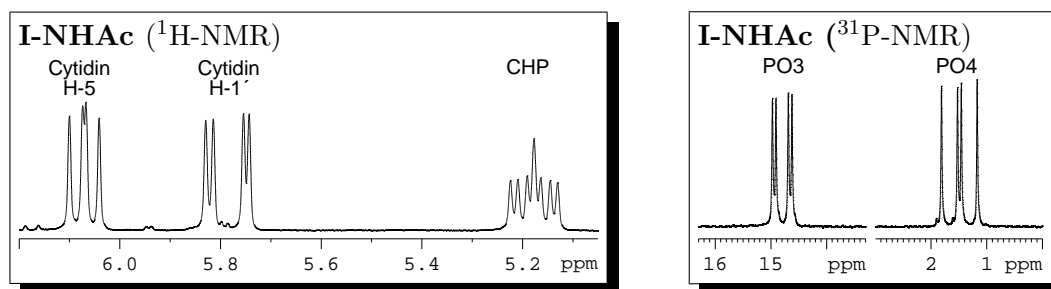


Abb. 4.26.: Ausschnitte aus den NMR-Spektren (^1H : 300 MHz, ^{31}P : 122 MHz, D_2O) des Inhibitors **I-NHAc**.

4.4.2. Darstellung des *m*-Nitro-substituierten Inhibitors

Die Darstellung des Inhibitors **I-NO₂** (**19**) erfolgte mit dem benzylgeschützten Phosphonat (Abbildung 4.27). Durch die elektronenziehende *meta*-Nitrosubstitution ist das Benzaldehyd **23** reaktiv und reagierte schnell mit dem basenaktivierten Benzylphosphonat. Die anschließende Phosphoramiditkupplung ergab den geschützten Inhibitor **24**, der analog zu den benzylgeschützten fluoresceinmarkierten Verbindungen entschützt wurde (Kapitel 4.2.4). Die Diastereomere konnten bei der HPLC Reinigung getrennt werden, wurden aber nur mit einer geringen Gesamtausbeute von 12 % erhalten. Ih-

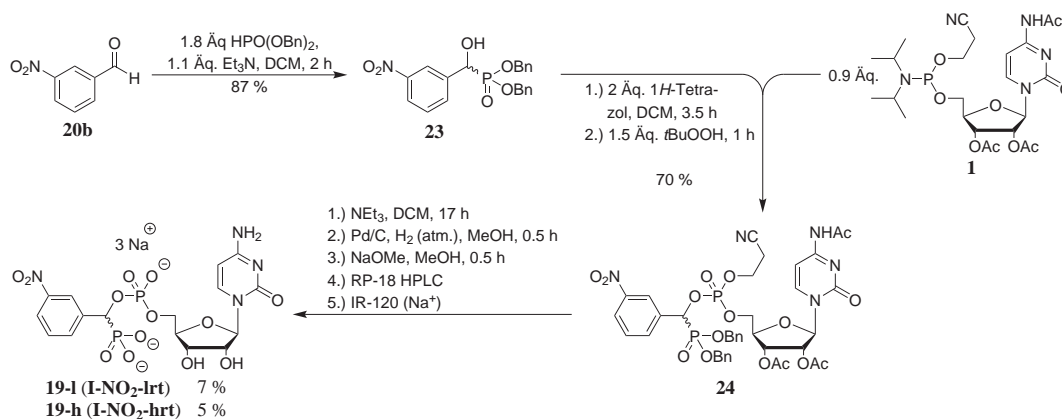


Abb. 4.27.: Darstellung des Inhibitors **I-NO₂**.

re Konfiguration ist unbekannt und sie werden daher gemäß ihrer Elutionsreihenfolge benannt (h/lrt für „high retention time“ und l/lrt für „low retention time“).

Die Bestimmung der Diastereomerenreinheiten der Verbindungen **I-NO₂-lrt** und **I-NO₂-hrt** erfolgte wie unter Kapitel 4.3.6 beschrieben. Weder bei **I-NO₂-lrt** noch **I-NO₂-hrt** konnte ein Restsignal des H-5 oder H-1' des jeweiligen anderen Isomers detektiert werden (Abbildung 4.28). Auch im ³¹P-NMR Spektrum wurde kein Restsignal des jeweils anderen Isomers beobachtet. Das H-1' von **I-NO₂-lrt** ($\delta = 5.82$ ppm: $J = 4.0$ Hz) erscheint gegenüber dem Signal von **I-NO₂-hrt** ($\delta = 5.76$ ppm: $J = 3.3$ Hz) tieffeldverschoben und hat die größere Kopplungskonstante. Dies stimmt mit den Beobachtungen zu den fluoresceinmarkierten Inhibitoren überein, bei denen die Signale der *S*-Isomere gegenüber denen der *R*-Isomere hochfeldverschoben sind. Unter der Annahme, dass dies auch für **I-NO₂** zutrifft, wäre **I-NO₂-lrt** das *S*-Isomer und **I-NO₂-hrt** das *R*-Isomer.

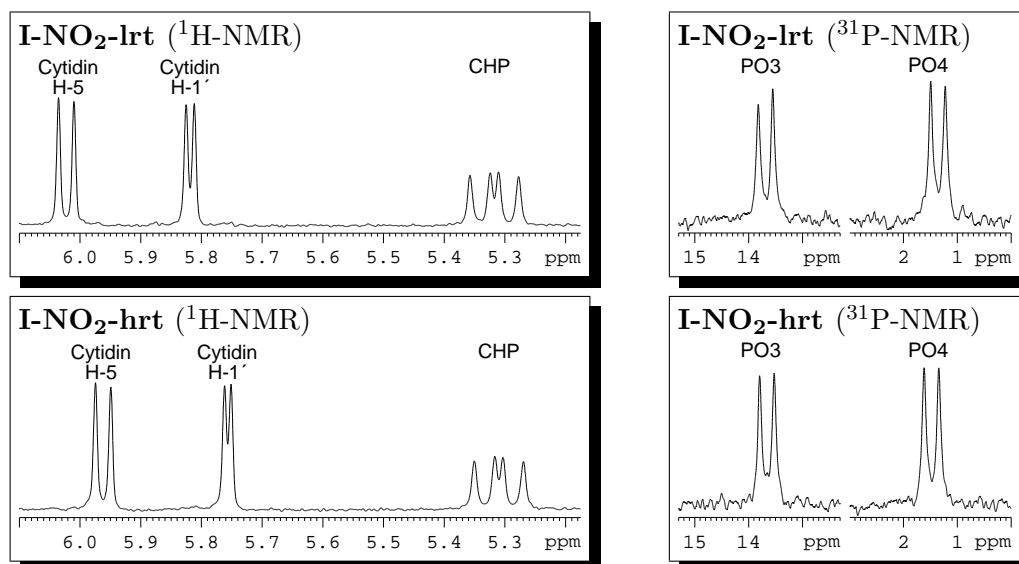


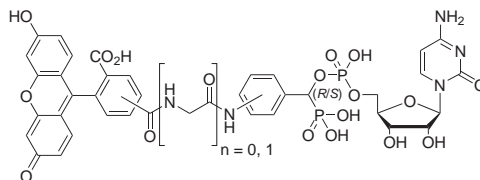
Abb. 4.28.: Ausschnitte aus den NMR-Spektren (¹H: 300 MHz, ³¹P: 122 MHz, D₂O) der Inhibitoren **I-NO₂-lrt** und **-hrt** zur Bestimmung der Diastereomerenüberschüsse.

5. Entwicklung eines HT-fähigen FP-Assays für Sialyltransferasen

Die – wie in Kapitel 4 beschrieben – dargestellten fluoresceinmarkierten Inhibitoren (Tabelle 5.1) sollten in Fluoreszenzpolarisationsassays auf ihre Eignung als FP-Sonden getestet werden. Dazu sollten sie mit verschiedenen Sialyltransferasen titriert und ihre Affinitäten sowie ihre Anisotropieeigenschaften bestimmt werden. Mit bekannten Inhibitoren mußte in FP-Verdrängungsassays überprüft werden, ob die FP-Sonden reversibel an die Sialyltransferasen binden. Damit der FP-Verdrängungsassay für HT-Screening geeignet ist, musste er gegenüber DMSO robust sein, da die Testsubstanzen der chemischen Bibliotheken in DMSO gelöst vorlagen.

Tab. 5.1.: Die FP-Sonden im Überblick.

Grundstruktur:



FP-Sonden	Stereo-konfig.	Aromat. Subst.	Glycin (n = x)	Flu.-Konfig.	Nummer
m5	<i>R/S</i>	<i>m</i>	0	5	8- <i>m</i> -(5)
m6	<i>R/S</i>	<i>m</i>	0	6	8- <i>m</i> -(6)
(<i>R</i>)m6	<i>R</i>	<i>m</i>	0	6	(<i>R</i>)-8- <i>m</i> -(6)
(<i>S</i>)m6	<i>S</i>	<i>m</i>	0	6	(<i>S</i>)-8- <i>m</i> -(6)
p6	<i>R/S</i>	<i>p</i>	0	6	8- <i>p</i> -(6)
(<i>R</i>)p6	<i>R</i>	<i>p</i>	0	6	(<i>R</i>)-8- <i>p</i> -(6)
(<i>S</i>)p6	<i>S</i>	<i>p</i>	0	6	(<i>S</i>)-8- <i>p</i> -(6)
mG5	<i>R/S</i>	<i>m</i>	1	5	8- <i>m</i> -G-(5)
mG6	<i>R/S</i>	<i>m</i>	1	6	8- <i>m</i> -G-(6)
(<i>R</i>)mG6	<i>R</i>	<i>m</i>	1	6	(<i>R</i>)-8- <i>m</i> -G-(6)
(<i>S</i>)mG6	<i>S</i>	<i>m</i>	1	6	(<i>S</i>)-8- <i>m</i> -G-(6)

Die potentiellen FP-Sonden basieren auf einem Inhibitor (**ix-c**, Abbildung 2.9), der den Übergangszustand des Donorsubstrates imitiert. Dies könnte eine Bindung der markierten Inhibitoren an alle Sialyltransferasen ermöglichen, da denen das Donorsubstrat CMP-Neu5Ac gemeinsam ist. Im Zeitraum der praktischen Arbeiten zu dieser Dissertation waren zwei Säugetier- (rST3Gal II^[192] und hST6Gal I^[193]) und zwei bakterielle Sialyltransferasen (Pd2,6ST(N)^[194] und PmST1^[171]) in gereinigter Form kommerziell erhältlich (Tabelle 5.2). Daher war es möglich, die fluoresceinmarkierten Inhibitoren sowohl gegen die Säugetiersialyltransferasen als auch gegen die strukturell anders aufgebauten prokaryotische Sialyltransferasen zu testen.

Tab. 5.2.: Kommerziell verfügbare Sialyltransferasen.

Transferase	Ursprung	Verknüpfung	Substrat	Masse
rST3Gal II	Säugetier	$\alpha 2,3-(O)$	Gal β 1,3GlcNAc-Termini	40 kDa
hST6Gal I	Säugetier	$\alpha 2,6-(N)$	<i>N</i> -Acetyllactosamin-Termini	42 kDa
Pd2,6ST(N)	Bakterium	$\alpha 2,6-(N)$	<i>N</i> -Acetyllactosamin-Termini	57 kDa
PmST1	Bakterium	$\alpha 2,3-(O)$	<i>N</i> -Acetyllactosamin-Termini	46 kDa

5.1. Theorie von Fluoreszenzpolarisations-Assays

5.1.1. Die Bestimmung der Anisotropie

Für die Berechnung der Anisotropie (A) werden die Intensitäten der parallel und senkrecht zur Anregungsachse orientierten Fluoreszenzemissionen gemessen. Die Berechnung erfolgt nach Gleichung 5.1, wobei ein Gewichtungsfaktor (G) eingesetzt wird, um unterschiedliche Sensitivitäten der Photodetektoren für die parallele und senkrechte Lichtemission zu kompensieren. Der G -Faktor ist eine Gerätekonstante und wird durch Kalibrierung der Polarisation¹ auf 27 mP für eine Lösung aus 1 nM Fluorescein in 0.01 M NaOH^[195] bestimmt. Die totale Fluoreszenz (I_T) ergibt sich nach Gleichung 5.2. Zur Korrektur der Anisotropien gegenüber der Hintergrundfluoreszenz werden die Intensitäten $I_{||}$ und I_{\perp} einer Leermessung von den Intensitäten der Probe abgezogen.

$$A = \frac{(I_{||} - I_{\perp})}{(I_{||} + 2I_{\perp})} = \frac{(I_{||} - GI_{\perp})}{(I_{||} + 2GI_{\perp})} \quad (5.1)$$

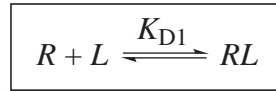
¹Anisotropie und Polarisation lassen sich wie folgt ineinander überführen: $A = 2P/(3 - P)$ und $P = 3A/(2+A)$.

$$I_T = I_{\parallel} + 2I_{\perp} = I_{\parallel} + 2GI_{\perp} \quad (5.2)$$

Die gemessene Anisotropie (A_{Obs}) heterogener Fluorophorpopulationen wird durch die Summe der Anisotropien der einzelnen vorliegenden Spezies beschrieben (Gleichung 5.3). A_m ist die Anisotropie einer Spezies m und f_m der Anteil der m ten Fraktion an der observierten Anisotropie.

$$A_{\text{Obs}} = \sum_m f_m A_m \quad \text{wobei} \quad \sum_m f_m = 1 \quad (5.3)$$

5.1.2. Direkter FP-Bindungsassay



Bei dem direkten FP-Bindungsassay liegen drei verschiedene Spezies im Gleichgewicht miteinander vor. Der freie Rezeptor R , der ungebundene Ligand L , und der Komplex aus Rezeptor und Ligand RL . Die Interaktion von R und L werden durch die folgenden Gleichungen beschrieben, wobei $[R]_T$ und $[L]_T$ den totalen Konzentrationen des Rezeptors und des markierten Liganden entspricht. F_{SB} ist die Fraktion des gebundenen markierten Liganden und K_{D1} die Dissoziationskonstante des RL -Komplexes.

$$K_{D1} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} \quad (5.4)$$

$$[R]_T = [R] + [RL] \quad (5.5)$$

$$[L]_T = [L] + [RL] \quad (5.6)$$

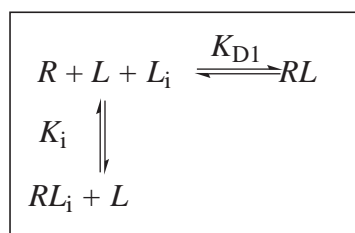
$$F_{\text{SB}} = 1 - \frac{[L]}{[L]_T} \quad (5.7)$$

Kleine Dissoziationskonstanten und hohe Rezeptorkonzentrationen führen zu einem höheren Bindungsgrad F_{SB} und dessen Abhängigkeit von K_{D1} und R_T ist in Abbildung 5.1-A simuliert.

Im FP-Bindungsassay kann durch die Titration des Liganden L mit dem Rezeptor R direkt die Dissoziationskonstante K_{D1} des Komplexes RL bestimmt werden. Bei einer totalen Konzentration des Rezeptors von $1 \times K_{D1}$ ist die Hälfte des markierten Liganden im Komplex RL gebunden. Daher darf die Konzentration $[L]_T$ nicht größer $2 \times K_{D1}$ sein, um eine stöchiometrische Titration durch den Rezeptor zu vermeiden.

Wäre $[L]_T > 2 \times K_{D1}$, würde die Konzentration des Rezeptors am K_{D1} nicht ausreichen, um die Hälfte des markierten Liganden zu binden und es würden scheinbar höhere Dissoziationskonstanten gemessen^[151].

5.1.3. Kompetitiver FP-Verdrängungsassay



Bei kompetitiven FP-Verdrängungsassays konkurrieren ein unmarkierter Ligand L_i und der fluorophormarkierte Ligand L um die Bindung an den Rezeptor R . Durch den unmarkierten Liganden wird die freie Konzentration des Rezeptors R reduziert. Eine vollständige Verdrängung liegt vor, wenn sich die Bindungen des markierten und unmarkierten Liganden gegenseitig ausschließen. Zusätzlich zu den Gleichungen 5.4, 5.6 und 5.7 wird dieses System durch die Gleichungen 5.8, 5.9 sowie 5.10 beschrieben.

$$K_i = \frac{[R] \cdot [L_i]}{[RL_i]} \quad (5.8)$$

$$[R]_T = [R] + [RL_i] \quad (5.9)$$

$$[L_i]_T = [L_i] + [RL_i] \quad (5.10)$$

Eine Simulation der Abhängigkeit der gebundenen Fraktion F_{SB} von der totalen Verdrängerkonzentration $[L_i]_T$ und der Dissoziationskonstante K_i des Komplexes RL_i ist in Abbildung 5.1 B dargestellt^[196]. Mit kleineren Dissoziationskonstanten des Komplexes RL_i wird die Steigung der Kurve von F_{SB} in Abhängigkeit von $[L_i]_T$ kleiner und bei ($K_i \ll K_{D1}$) findet eine schlagartige Verdrängung des unmarkierten Liganden statt, sobald der Verdränger die Konzentration des markierten Liganden erreicht. Die Affinität des markierten Liganden limitiert dabei die Auflösung der Inhibitionskonstanten^[151].

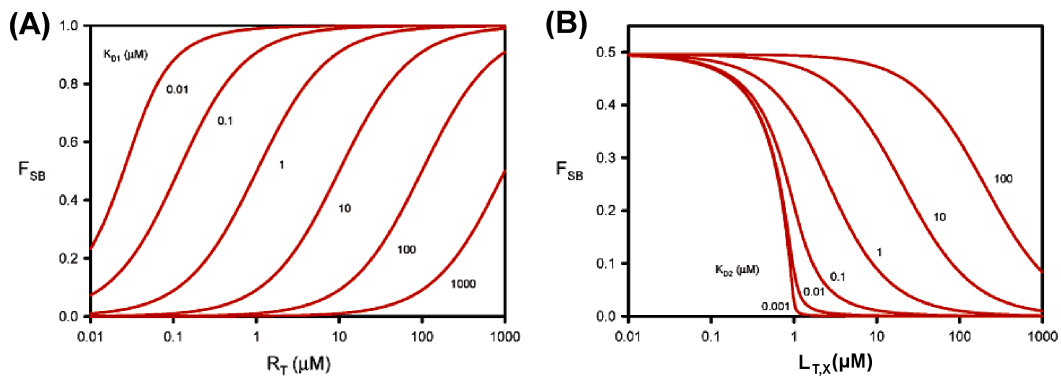
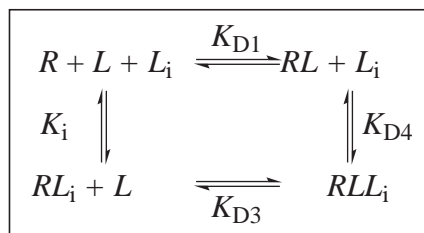


Abb. 5.1.: (A) Direktes Bindungsmodell: F_{SB} in Abhängigkeit von R_T bei verschiedenen K_{D1} ; (B) Kompetitives Bindungsmodell: F_{SB} in Abhängigkeit von $L_{T,X}$ bei verschiedenen K_{D2} (R_T und K_{D1} sind beiderseits auf $1 \mu\text{M}$ gesetzt; $K_{D2} = K_i$).^[196]

5.1.4. Nichtkompetitiver FP-Verdrängungsassay



Schließen sich die Bindungen des markierten und unmarkierten Liganden nicht aus, kann die markierte Sonde nicht vollständig vom Rezeptor verdrängt werden^[156,197]. Dies äußert sich in einem asymptotischen Limit für F_{SB} , das größer als null ist. Beschreiben lässt sich dies mit einem Modell aus vier Bindungszuständen, bei dem der Rezeptor mit dem markierten als auch dem unmarkierten Liganden einen ternären Komplex RLL_i ausbilden kann.

5.1.5. Einfluss von Fluoreszenzquenching des Ligand-Rezeptor-Komplexes auf die Anisotropie

Diverse Faktoren wie Hydrophobizität, Viskosität, pH-Wert und Mobilität können den elektronisch angeregten Zustand eines Fluorophors beeinflussen und damit auch die Fluoreszenzintensität verändern^[152,198]. Die Fluoreszenzquantenausbeuten von markierten Liganden können sich daher für den gebundenen und ungebundenen Zustand unterscheiden, so dass der Beitrag der beiden Spezies nicht mehr mit dem fraktionellen

Anteil gleichzusetzen ist und Gleichung 5.3 eines Korrekturfaktors bedarf, der die Intensitätsänderung berücksichtigt. Q ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der gebundenen und freien Spezies. Aus Gleichung 5.3 folgt für die Mischung zweier Spezies mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten die Gleichung 5.11 mit den Anisotropien der gebundenen und freien Sonde A_B und A_F ^[196].

$$A_{Obs} = \frac{Q \cdot F_{SB} \cdot A_B + (1 - F_{SB})A_F}{1 - (1 - Q)F_{SB}} \quad \text{mit } Q = I_B/I_F \quad (5.11)$$

Diese Formel kann nach F_{SB} aufgelöst werden und ermöglicht die Berechnung des realen fraktionellen Anteils der gebundenen Spezies aus den gemessenen Anisotropien unter Berücksichtigung des Fluoreszenzintensitätsverhältnis Q (Gleichung 5.12).

$$F_{SB} = \frac{A_{Obs} - A_F}{Q(A_B - A_{Obs}) + (A_{Obs} - A_F)} \quad (5.12)$$

Bei der Bestimmung der Affinitäten der FP-Sonden müssen die Fluoreszenzintensitäten analysiert werden und gegebenenfalls aus den Anisotropien die F_{SB} -Werte berechnet werden.

5.1.6. Assayqualität

Die Qualität eines Assays wird mit dem von Zhang *et al.* eingeführten Z' -Faktor beschrieben (Gleichung 5.13). Er berücksichtigt sowohl den Dynamikbereich als auch die Signalvarianzen des hohen und tiefen Assaysignals. Der Z' -Faktor ist eine dimensionslose Größe zwischen $-\infty < Z' \leq 1$ und berechnet sich aus dem Dynamikbereich abzüglich der Summe der dreifachen Standardabweichungen des hohen und tiefen Signals, dividiert durch den Dynamikbereich (Gleichung 5.13).

$$Z' = \frac{|\bar{A}_B - \bar{A}_F| - (3\sigma_B + 3\sigma_F)}{|\bar{A}_B - \bar{A}_F|} \Leftrightarrow Z' = 1 - \frac{(3\sigma_B + 3\sigma_F)}{|\bar{A}_B - \bar{A}_F|} \quad (5.13)$$

Mit großen Dynamikbereichen und kleinen Standardabweichungen strebt der Z' -Faktor eines Assays gegen den Idealwert von 1. Im Allgemeinen werden Assays mit einem Z' -Faktor zwischen 0.5 und 1 als exzellent für Screenings geeignet betrachtet. Bei einem Z' -Faktor kleiner null würden die Bereiche des Positiv- und Negativsignals überlappen und der Assay wäre für Screeningzwecke ungeeignet^[199].

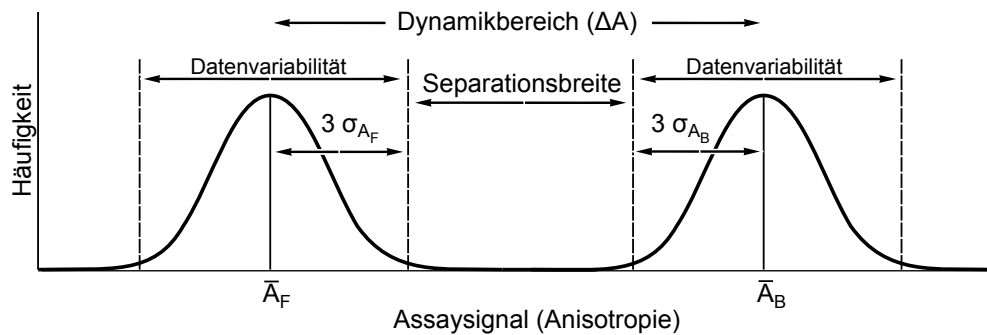


Abb. 5.2.: Die Definition der Separationsbreite: Aufgetragen ist die Häufigkeit eines beobachteten Assaysignals gegen den Wert des Assaysignals (Abbildung modifiziert nach Zhang *et al.*^[199]).

5.2. Assaydurchführung

Die Assays wurden bei einem pH von 7.4 in 50 mM Cacodylatpuffer mit 0.1 % Triton X-100 durchgeführt, so dass Fluorescein in der Dianionform vorlag und die höchste Quantenausbeute lieferte^[177]. Bei einer FP-Sondenkonzentration von 10 nM war das Fluoreszenzsignal linear und 40mal so hoch wie die Hintergrundfluoreszenz. Diese hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Anisotropien, wurde aber dennoch bei den Messungen abgezogen, da die Fluoreszenzintensität der FP-Sonden bei der Bindung an den Rezeptor abnehmen kann. Um möglichst geringe Proteinmengen einzusetzen, wurden die Assays auf „small-volume“ 384er Mikrotiterplatten bei einem Arbeitsvolumen von 3.5 μ L durchgeführt. Sobald das Anisotropiesignal unveränderlich war (Endpunktbestimmung), wurden die Platten mit einem Plattenlesegerät (Safire 2, Tecan) vermessen.

5.3. Direkter FP-Bindungsassay

Im direkten FP-Bindungsassay wurden die FP-Sonden mit den Sialyltransferasen titriert, um deren Anisotropieeigenschaften und Affinitäten zu ermitteln. Eine ideale FP-Sonde vereint eine hohe Affinität, ein großes Dynamikfenster und eine bindungsunabhängige Fluoreszenz.

5.3.1. Auswertung der FP-Bindungsassays

Die observierten Anisotropien (A_{obs}) wurden logarithmisch gegen die Enzymkonzentrationen aufgetragen und die sigmoidal verlaufenden Werte mit einem 4-Parameter logistischen (4-PL) nicht-linearen Regressionsmodell (Gleichung 5.14) angepasst.

$$f(x) = \text{Minimum} + \frac{(\text{Maximum} - \text{Minimum})}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x) \cdot \text{HillSlope}}} \quad (5.14)$$

Der Regressionsanalyse wurden die Werte der minimalen und maximalen Asymptoten entnommen, die der minimal (A_{min}) und maximal erreichbaren Anisotropie (A_{max}) entsprachen, deren Differenz (ΔA) wiederum den Dynamikbereich des Assays ergab. A_{max} wurde aufgrund der limitierten Proteinkonzentrationen der Sialyltransferasen nicht von allen FP-Sonden erreicht. Beim direkten FP-Bindungsassay ist $A_{\text{min}} = A_{\text{F}}$ und $A_{\text{max}} = A_{\text{B}}$. Der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve des Fits von A_{obs} wird im Folgenden als $EC_{50_{A_{\text{obs}}}}$ bezeichnet. Ihm liegt nur dann eine biologische Bedeutung zugrunde, wenn die FP-Sonde im freien als auch gebundenen Zustand identische Fluoreszenzquanten-

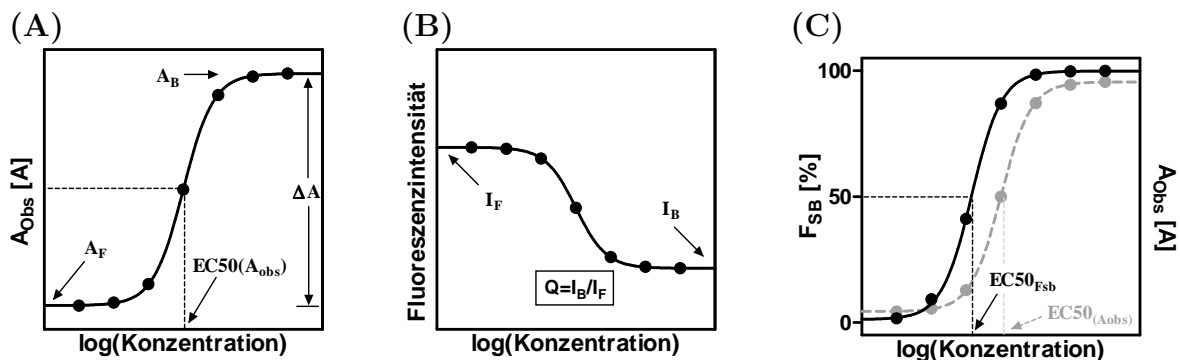


Abb. 5.3.: Auswertung der direkten FP-Bindungsassays: (A) Analyse der observierten Anisotropien zur Bestimmung von A_{min} , A_{max} , ΔA und $EC_{50_{A_{\text{obs}}}}$, (B) Analyse der totalen Fluoreszenzintensitäten zur Ermittlung von Q und (C) Bestimmung von $EC_{50_{F_{\text{SB}}}}$ anhand der Analyse von F_{SB} .

ausbeuten aufweist (Abbildung 5.3 A).

Die totalen Fluoreszenzintensitäten wurden ebenfalls logarithmisch gegen die Enzymkonzentrationen aufgetragen und wiesen einen sigmoidalen Verlauf auf. Die Messwerte wurden mit der 4-PL nicht-linearen Regressionsanalyse ausgewertet und das Maximum und Minimum der Regression für die Intensitäten der gebundenen (I_B) und freien (I_F) FP-Sonde bestimmt, deren Quotient den Korrekturfaktor Q (Gleichung 5.11) ergab (Abbildung 5.3 B).

Mit Q sowie A_F , A_B und A_{obs} konnten schließlich die realen gebundenen Fraktionen F_{SB} (Gleichung 5.12) der FP-Sonden berechnet werden. Der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve der 4-PL nicht-linearen Regression entspricht der Enzymkonzentration, bei der die Hälfte der FP-Sonde in gebundenem Zustand vorliegt und wird mit $\text{EC50}_{F_{\text{SB}}}$ bezeichnet (Abbildung 5.3 B). Bei unveränderlicher Fluoreszenzintensität ($Q = 0$) wird $\text{EC50}_{A_{\text{obs}}}$ gleich $\text{EC50}_{F_{\text{SB}}}$.

Aufgrund der logarithmischen Skalierung kann die x-Achse die Konzentration $0 \mu\text{M}$ nicht darstellen und es wurde manuell eine sehr kleine Konzentration ($\log(c) = -20$) festgelegt. Die Analyse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad*).

5.3.2. rST3Gal II

Die rST3Gal II wurde in einer Konzentration von $19 \mu\text{M}$ in 50 % Glycerolpuffer ausgeliefert, so dass die maximal einsetzbare Konzentration des Enzyms begrenzt war, da andernfalls die Viskosität durch das Glycerol zu einem unerwünschten Anisotropieanstieg führte. Daher wurden die FP-Sonden ($c = 10 \text{ nM}$) mit $0\text{--}0.5 \mu\text{M}$ der rST3Gal II titriert, wobei die Negativkontrolle Fluorescein keinen viskositätsbedingten Anstieg der Anisotropie zeigte. Bei den Fluoreszenzintensitäten wichen die Messwerte sowohl der höchsten Enzymkonzentration als auch ohne Enzym auffällig vom sigmoidalen Verlauf ab. Dies wurde möglicherweise durch einen systematischen Pipettierereffekt hervorgerufen und die Fluoreszenzintensitäten der höchsten Enzymkonzentration und ohne Enzym wurden von der Regression ausgeschlossen (Abbildung 5.4).

Die *meta*-Glycin-Sonden wiesen mit $\Delta A = 194\text{--}215 \text{ mA}$ die höchsten Dynamikbereiche der FP-Sonden auf und zeigten leichte Abhängigkeiten der Fluoreszenzintensitäten von der Bindung ($Q = 0.82\text{--}1.0$). Die Unterschiede zwischen dem 5- und 6-Isomer **mG5** und **mG6** als auch zwischen dem *R*- und *S*-Isomer (**R**)**mG6** und (**S**)**mG6** waren nur sehr gering. So hatten (**S**)**mG6** und **mG6** lediglich ein etwas höheres Dynamikfenster ($\Delta\Delta A \sim 20 \text{ mA}$). Die *meta*-Glycin-Sonden zeigten sehr gute Affinitäten, die sich mit

$EC50_{F_{SB}} = 22.2\text{--}24.7\text{ nM}$ nicht signifikant voneinander unterschieden (Tabelle 5.3).

Die Dynamikbereiche der *meta*-Sonden waren mit $\Delta A = 144\text{--}182\text{ mA}$ kleiner als die der *meta*-Glycin-Sonden und sie zeigten ebenfalls eine leichte Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeuten vom Bindungsgrad ($Q = 0.69\text{--}1.0$). Die *meta*-Sonden waren hochaffine Liganden der rST3Gal II und hatten Affinitäten zwischen $EC50_{F_{SB}} = 34.0\text{--}44.8\text{ nM}$.

Bei den *para*-Sonden hatte die Stereoisomerie sowohl auf die Dynamikfenster als auch auf die Affinitäten einen sichtbaren Einfluss. **(R)p6** hatte ein kleines Dynamikfenster von $\Delta A = 132\text{ mA}$, aber die Affinität ($EC50_{F_{SB}} = 24.5\text{ nM}$) war mit denen der *meta*-Glycin-Sonden vergleichbar. Dagegen war das Dynamikfenster von **(S)p6** größer ($\Delta A = 180\text{ mA}$), aber sie band mit einer geringeren Affinität von $EC50_{F_{SB}} = 78.9\text{ nM}$ an die rST3Gal II. Die Fluoreszenzintensitäten waren von der Bindung abhängig ($Q = 0.79\text{--}0.84$).

Die FP-Sonde mit den besten Eigenschaften gegenüber der rST3Gal II war **(S)mG6**. Diese Sonde zeigte eine Affinität von $EC50_{F_{SB}} = 23.5\text{ nM}$ und ein Dynamikfenster von $\Delta A = 215\text{ mA}$ und wies gegenüber den anderen FP-Sonden den Vorteil einer konstanten Fluoreszenzquantenausbeute ($Q = 1$) auf.

Tab. 5.3.: rST3Gal II: Ergebnisse des FP-Bindungsassays.

FP-Sonde	$EC50_{F_{SB}}$ [nM] ^a	$EC50_{A_{Obs}}$ [nM] ^a	ΔA [mA] ^a	Q	$[L]_T/EC50_{F_{SB}}$ ^b
m5	34.0 ± 1.7	37.8 ± 2.1	173.9 ± 6.3	0.83	0.3
m6	46.3 ± 4.1	51.1 ± 5.0	155.4 ± 9.3	0.86	0.2
(R)m6	41.0 ± 1.9	51.1 ± 2.6	181.5 ± 6.1	0.69	0.2
(S)m6	44.8 ± 0.8	44.8 ± 0.8	144.1 ± 1.6	1	0.2
p6	40.8 ± 1.8	47.3 ± 2.3	132.8 ± 3.6	0.84	0.2
(R)p6	24.5 ± 0.7	28.3 ± 0.9	131.5 ± 2.7	0.79	0.4
(S)p6	78.9 ± 4.5	96.6 ± 6.8	180.3 ± 6.7	0.79	0.1
mG5	22.2 ± 0.7	24.2 ± 2.0	196.8 ± 4.2	0.88	0.5
mG6	24.7 ± 1.0	26.5 ± 1.1	215.1 ± 5.7	0.88	0.4
(R)mG6	23.9 ± 0.6	26.5 ± 0.6	194.3 ± 2.9	0.82	0.4
(S)mG6	23.5 ± 0.9	23.5 ± 0.9	214.5 ± 5.4	1	0.4

^a \pm Standardfehler; ^b $L_T = 10\text{ nM}$.

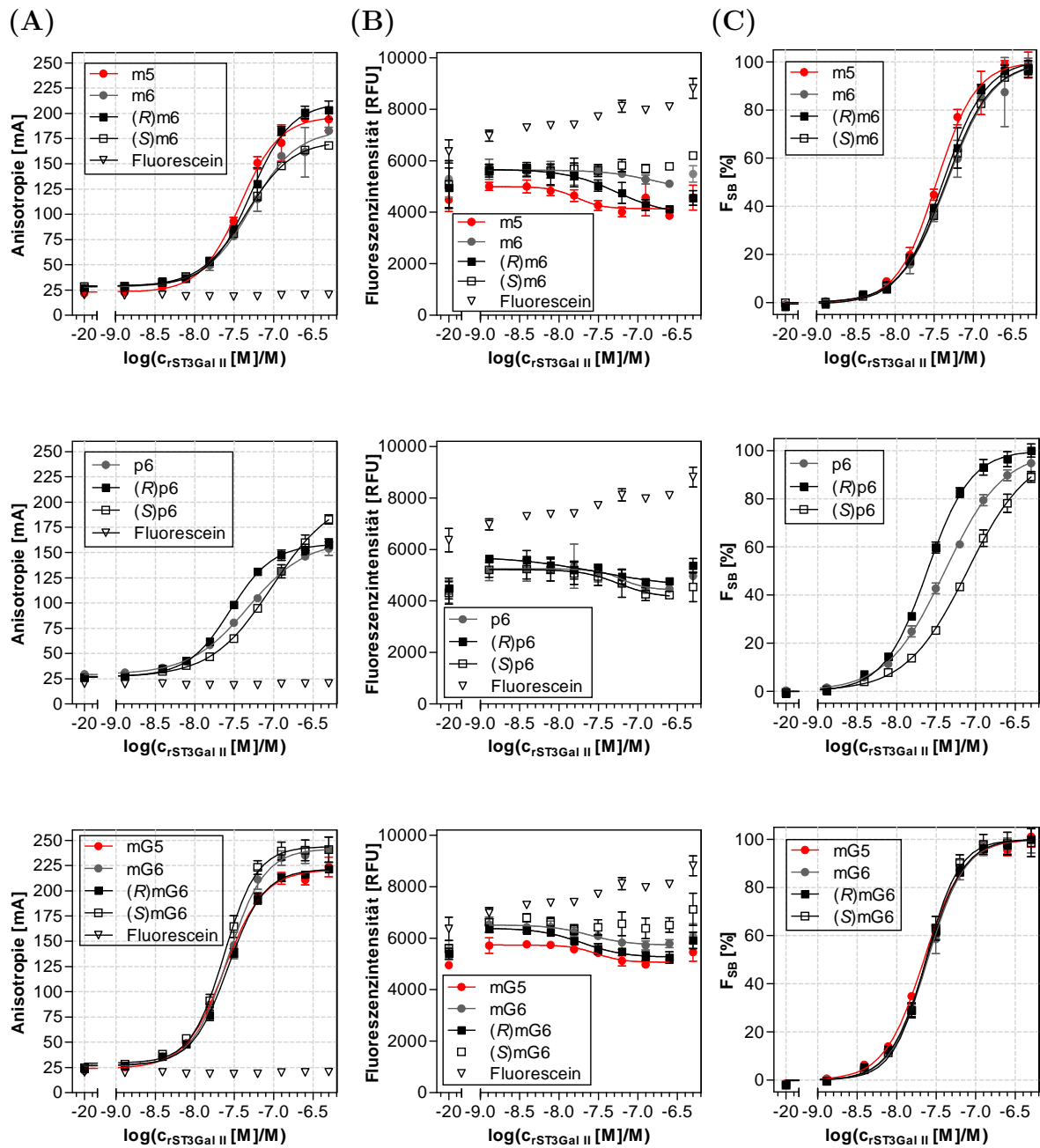


Abb. 5.4.: rST3Gal II (direkter FP-Bindungsassay): Auftragung von (A) A_{obs} , (B) den Fluoreszenzintensitäten und (C) F_{SB} gegen $\log(c_{\text{Enzym}})$. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus den Mittelwerten dreier Dreifachbestimmungen, die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung.

Assaybedingungen: 50 mM Cacodylatpuffer (pH 7.4), 0.1% Triton X-100, FP-Sondenkonzentration: 10 nM, rST3Gal II-Konzentration: 0–0.5 μM .

5.3.3. hST6Gal I

Ebenso wie die rST3Gal II lag die hST6Gal I in einem 50%igen Glycerolpuffer vor, bei einer Enzymkonzentration von 4.9 μM . Die Titration der FP-Sonden ($c = 10 \text{ nM}$) erfolgte daher bis zu einer maximalen Konzentration von 0.25 μM . Das Restglycerol interferierte nicht mit dem Assay, wie die Negativkontrolle Fluorescein zeigte. Die Anisotropien der FP-Sonden stiegen mit zunehmender Proteinmenge stark an und erreichten zwischen $A_B = 181$ und 241 mA die Sättigung des Signals. Die Dynamikbereiche waren mit $\Delta A = 178$ –213 mA ähnlich hoch wie bei der rST3Gal II (Abbildung 5.5 und Tabelle 5.4).

Die *meta*-Glycin-Sonden waren hochaffine Liganden der hST6Gal I ($\text{EC}_{50_{\text{FSB}}} = 12.8$ –18.4 nM) mit großen Dynamikbereichen ($\Delta A = 178$ –209 mA). Die Stereoisomerie am α -Hydroxymethylphosphonat hatte für (**R**)mG6 und (**S**)mG6 keinen wesentlichen Einfluss auf ihre Bindungscharakteristika. Das 5-Isomer mG5 zeigte gegenüber dem 6-Isomer mG6 einen um 30 mA reduzierten Dynamikbereich. Die Sonden wiesen mäßige bis leichte Abhängigkeiten der Fluoreszenzintensitäten vom Bindungsgrad auf ($Q = 0.68$ –1.0).

Auch die *meta*-Sonden waren hochaffin ($\text{EC}_{50_{\text{FSB}}} = 9.0$ –22.2 nM) mit großen Dynamikbereichen ($\Delta A = 184$ –213 mA). Wie für die *meta*-Glycin-Sonden, war der Dynamikbereich von dem 5-Carboxyfluoresceinisomer m5 gegenüber dem des 6-Isomers m6 um 30 mA reduziert. Das *S*-Isomer (**S**)m6 band doppelt so gut an die hST6Gal I wie das

Tab. 5.4.: hST6Gal I: Ergebnisse des FP-Bindungsassays.

FP-Sonde	$\text{EC}_{50_{\text{FSB}}} [\text{nM}]^a$	$\text{EC}_{50_{A_{\text{Obs}}}} [\text{nM}]^a$	$\Delta A [\text{mA}]^a$	Q	$[L]_{\text{T}}/\text{EC}_{50_{\text{FSB}}}^b$
m5	21.6 \pm 0.9	21.6 \pm 0.9	184.2 \pm 4.4	1	0.5
m6	17.2 \pm 0.7	21.7 \pm 0.8	207.2 \pm 4.9	0.67	0.6
(<i>R</i>)m6	22.2 \pm 0.4	24.4 \pm 0.4	213.2 \pm 2.5	0.85	0.5
(<i>S</i>)m6	9.0 \pm 0.3	12.3 \pm 0.3	184.8 \pm 2.8	0.53	1.1
p6	15.3 \pm 0.3	15.3 \pm 0.3	185.0 \pm 2.3	1	0.7
(<i>R</i>)p6	21.5 \pm 0.6	21.5 \pm 0.6	152.2 \pm 2.7	1	0.5
(<i>S</i>)p6	11.3 \pm 0.2	11.3 \pm 0.2	205.0 \pm 2.7	1	0.9
mG5	15.5 \pm 0.5	19.0 \pm 0.6	178.4 \pm 3.9	0.68	0.6
mG6	18.4 \pm 0.5	19.4 \pm 0.5	207.4 \pm 3.5	0.90	0.5
(<i>R</i>)mG6	17.9 \pm 0.3	17.9 \pm 0.3	205.0 \pm 2.0	1	0.6
(<i>S</i>)mG6	12.8 \pm 0.2	13.8 \pm 0.2	208.9 \pm 2.3	0.86	0.8

^a \pm Standardfehler; ^b $L_{\text{T}} = 10 \text{ nM}$.

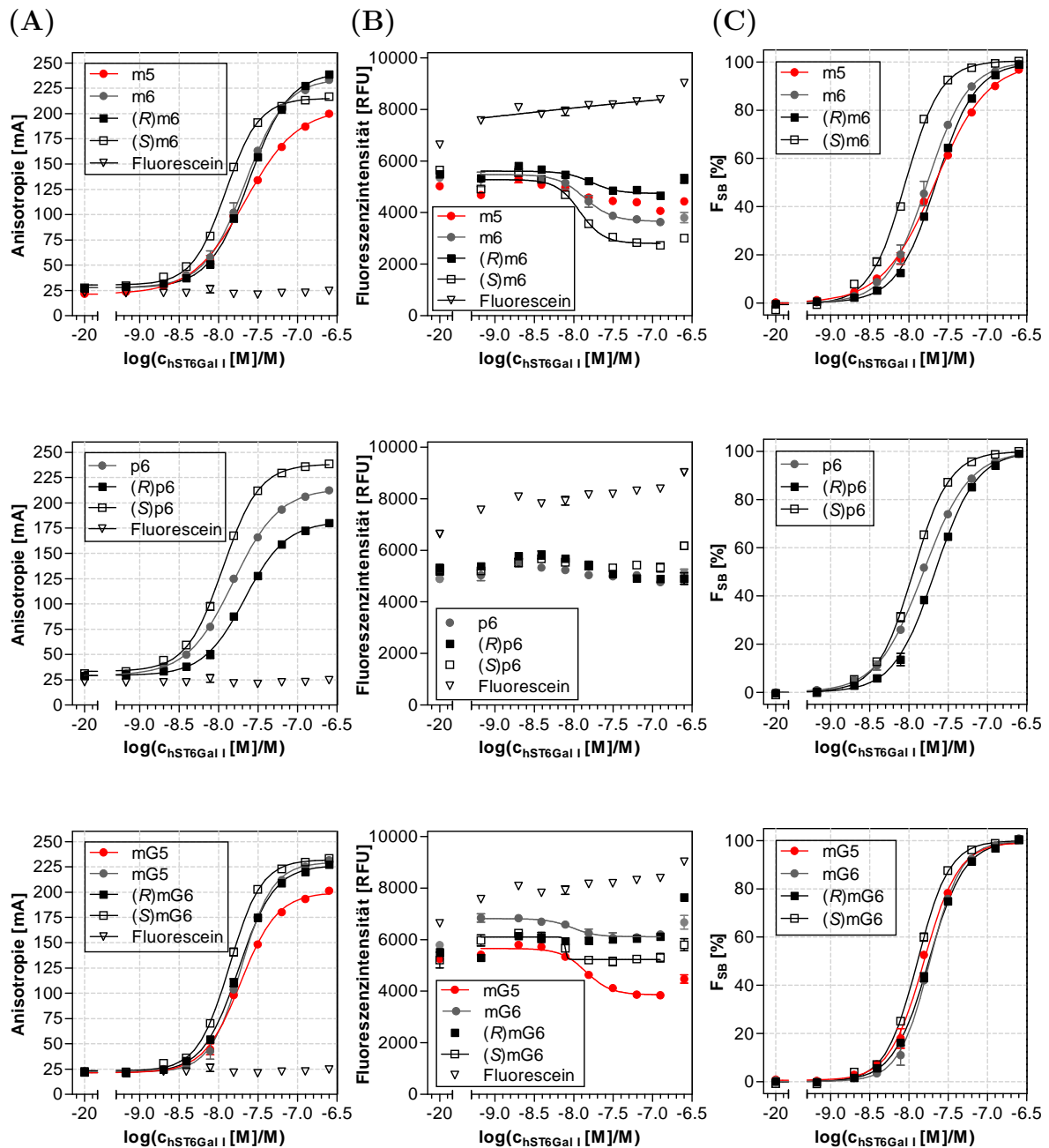


Abb. 5.5.: hST6Gal I (direkter FP-Bindungsassay): Auftragung von (A) A_{obs} , (B) den Fluoreszenzintensitäten und (C) F_{SB} gegen $\log(c_{\text{Enzym}})$. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus den Mittelwerten zweier Doppelbestimmungen, die Fehlerbalken indizieren den Wertebereich.

Assaybedingungen: 50 mM Cacodylatpuffer (pH 7.4), 0.1% Triton X-100, FP-Sondenkonzentration: 10 nM, hST6Gal I-Konzentration: 0–0.25 μM .

R-Isomer (**R**)**m6**, wies dafür aber einen kleineren Dynamikbereich auf.

Die Diastereomere der *para*-Sonden hatten sehr unterschiedliche Eigenschaften. (**S**)**p6** ($EC50_{F_{SB}} = 11.3 \text{ nM}$) war nahezu doppelt so affin wie das *R*-Isomer (**R**)**p6** ($EC50_{F_{SB}} = 21.5 \text{ nM}$) und sein Dynamikbereich um 53 mA größer. Die Isomerenmischung **p6** lag mit seinen Parametern zwischen den Diastereomeren. Ihre Fluoreszenzquantenausbeuten waren von der Bindung unabhängig ($Q = 1$).

Die besten Eigenschaften der FP-Sonden vereint (**S**)**p6**, welche eine hohe Affinität ($EC50_{F_{SB}} = 11.3 \text{ nM}$), einen hohen Dynamikbereich ($\Delta A = 205 \text{ mA}$) und eine konstante Fluoreszenzintensität aufwies.

5.3.4. Pd2,6ST(N)

Die bakterielle Pd2,6ST(N) wurde als Lyophilisat mit Pufferbestandteilen (MES, NaCl) erhalten. Die FP-Sonden wurden mit Konzentrationen bis $4 \mu\text{M}$ der Pd2,6ST(N) titriert, aber nur (**R**)**p6** erreichte eine deutliche Sättigung der Anisotropie, die mit $EC50_{F_{SB}} = 83.9 \text{ nM}$ die affinste FP-Sonde mit einem großen Dynamikbereich war ($\Delta A = 159 \text{ mA}$). Das *S*-Isomer (**S**)**p6** ($EC50_{F_{SB}} = 590.7 \text{ nM}$) band wesentlich schwächer an die Pd2,6ST(N) (Abbildung 5.6 und Tabelle 5.5).

Die FP-Sonde **m5** hatte das höchste Dynamikfenster ($\Delta A = 202 \text{ mA}$) aller FP-Sonden und die höchste Affinität der *meta*-Sonden ($EC50_{F_{SB}} = 390.8 \text{ nM}$). Die *meta*-Glycin-Sonden zeigten ähnlich geringe Affinitäten im mikromolaren Bereich, nur Verbindung

Tab. 5.5.: Pd2,6ST(N): Ergebnisse des FP-Bindungsassays.

FP-Sonde	$EC50_{F_{SB}}$ [nM] ^a	$EC50_{A_{Obs}}$ [nM] ^a	ΔA [mA] ^a	Q	$[L]_T/EC50_{F_{SB}}$ ^b
m5	390.8 ± 28.0	390.8 ± 28.0	202.1 ± 5.5	1	< 0.1
m6	> 1000	> 1000	165.4 ± 7.5	1	< 0.1
(<i>R</i>)m6	924.6 ± 157.5	> 1000	193.3 ± 15.5	0.72	< 0.1
(<i>S</i>)m6	> 1000	> 1000	180.1 ± 28.5	1	< 0.1
p6	232.0 ± 16.1	232.0 ± 16.1	148.2 ± 3.9	1	< 0.1
(<i>R</i>)p6	83.9 ± 5.1	83.9 ± 5.1	159.2 ± 4.5	1	0.1
(<i>S</i>)p6	590.7 ± 48.5	519.4 ± 40.5	163.2 ± 4.7	1.09	< 0.1
mG5	562.6 ± 91.7	562.4 ± 91.7	157.8 ± 8.5	1	< 0.1
mG6	557.9 ± 99.5	> 1000	161.5 ± 11.3	0.6	< 0.1
(<i>R</i>)mG6	53.2 ± 13.9	416.6 ± 273.0	75.1 ± 11.6	0.34	0.2
(<i>S</i>)mG6	> 1000	> 1000	182.1 ± 9.4	1	< 0.1

^a± Standardfehler; ^b $L_T = 10 \text{ nM}$.

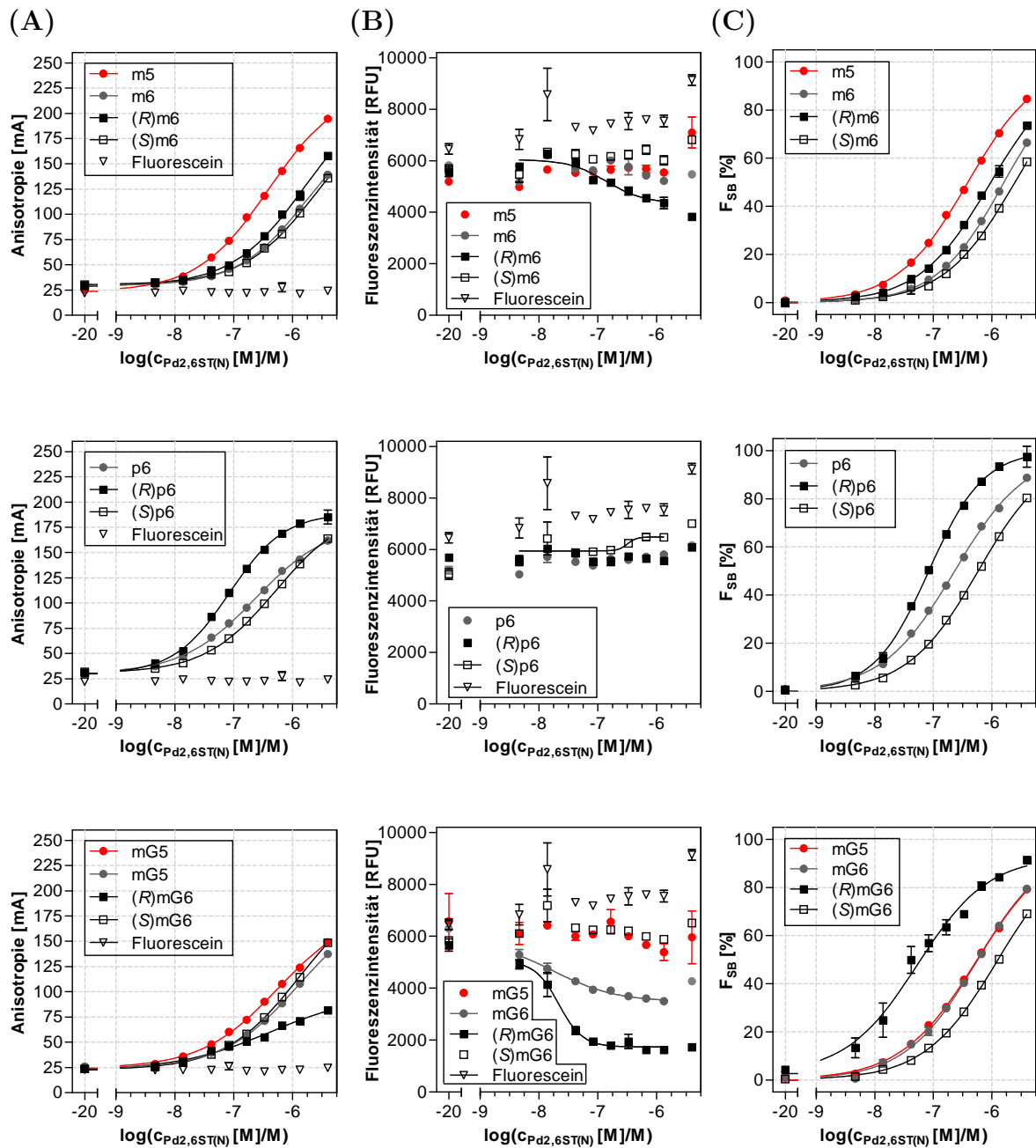


Abb. 5.6.: Pd_{2,6}ST(N) (direkter FP-Bindungsassay): Auftragung von (A) A_{obs} , (B) den Fluoreszenzintensitäten und (C) F_{SB} gegen $\log(c_{\text{Enzym}})$. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus den Mittelwerten zweier Doppelbestimmungen, die Fehlerbalken indizieren den Wertebereich.

Assaybedingungen: 50 mM Cacodylatpuffer (pH 7.4), 0.1% Triton X-100, FP-Sondenkonzentration: 10 nM, Pd_{2,6}ST(N)-Konzentration: 0–4.0 μM .

(R)mG6 hatte mit $EC50_{F_{SB}} = 53.2 \text{ nM}$ eine hohe Affinität. Ihr Dynamikbereich war aber mit $\Delta A = 75 \text{ mA}$ außerordentlich klein und ihre Fluoreszenzabhängigkeit von der Bindung war groß ($Q = 0.34$).

5.3.5. PmST1

Die PmST1 lag – wie die andere bakterielle Sialyltransferase – als Lyophilisat mit Pufferbestandteilen (MES, NaCl) vor. Eine maximale Enzymkonzentration von $2 \mu\text{M}$ reichte aus, um bei den meisten FP-Sonden das Anisotropiesignal zu sättigen, aber sie erreichten mit $\Delta A = 104\text{--}179 \text{ mA}$ nicht die Dynamikbereiche wie gegenüber den Säugetiersialyltransferasen. Die Affinitäten der FP-Sonden ($EC50_{F_{SB}} = 11.5\text{--}184.6 \text{ nM}$) waren allgemein höher als gegenüber der anderen bakteriellen Sialyltransferase PmST1. Allerdings zeigten alle FP-Sonden (bis auf **(S)p6**) eine Fluoreszenzintensitätsänderung ($Q = 0.38\text{--}0.86$). Die PmST1 band die *R*-Isomere **(R)m6**, **(R)p6** und **(R)mG6** generell besser, die allerdings eine starkes Quenching der Fluoreszenz bei der Bindung zeigten ($Q = 0.23\text{--}0.47$), während die *S*-Isomere **(S)m6**, **(S)p6** und **(S)mG6** nur schwach gequench wurden ($0.82\text{--}1$). Die 5-Carboxyfluoresceinisomere **m5** und **mG5** hatten etwas größere Dynamikbereiche als die 6-Isomere **m6** und **mG6** (Abbildung 5.7 und Tabelle 5.6).

Tab. 5.6.: PmST1: Ergebnisse des FP-Bindungsassays.

FP-Sonde	$EC50_{F_{SB}}$ [nM] ^a	$EC50_{A_{Obs}}$ [nM] ^a	ΔA [mA] ^a	Q	$[L]_T/EC50_{F_{SB}}$ ^b
m5	97.3 ± 8.2	150.2 ± 11.1	179.0 ± 5.8	0.67	0.1
m6	116.9 ± 8.0	217.6 ± 14.4	146.3 ± 4.2	0.56	0.1
(<i>R</i>)m6	33.6 ± 1.8	128.2 ± 11.0	160.7 ± 6.2	0.23	0.3
(<i>S</i>)m6	183.8 ± 7.9	221.0 ± 9.0	140.3 ± 2.7	0.82	0.1
p6	19.8 ± 1.0	24.2 ± 1.2	124.3 ± 2.8	0.79	0.5
(<i>R</i>)p6	11.5 ± 0.6	23.5 ± 1.6	133.7 ± 4.2	0.38	0.9
(<i>S</i>)p6	26.5 ± 1.0	26.5 ± 1.0	157.7 ± 2.8	1	0.4
mG5	60.1 ± 5.0	95.1 ± 8.1	154.2 ± 5.1	0.72	0.2
mG6	51.2 ± 6.6	99.7 ± 14.9	132.3 ± 7.2	0.63	0.2
(<i>R</i>)mG6	12.7 ± 1.0	23.6 ± 1.5	139.0 ± 4.1	0.47	0.8
(<i>S</i>)mG6	184.6 ± 21.0	211.8 ± 22.6	104.3 ± 5.2	0.86	0.1

^a± Standardfehler; ^b $L_T = 10 \text{ nM}$.

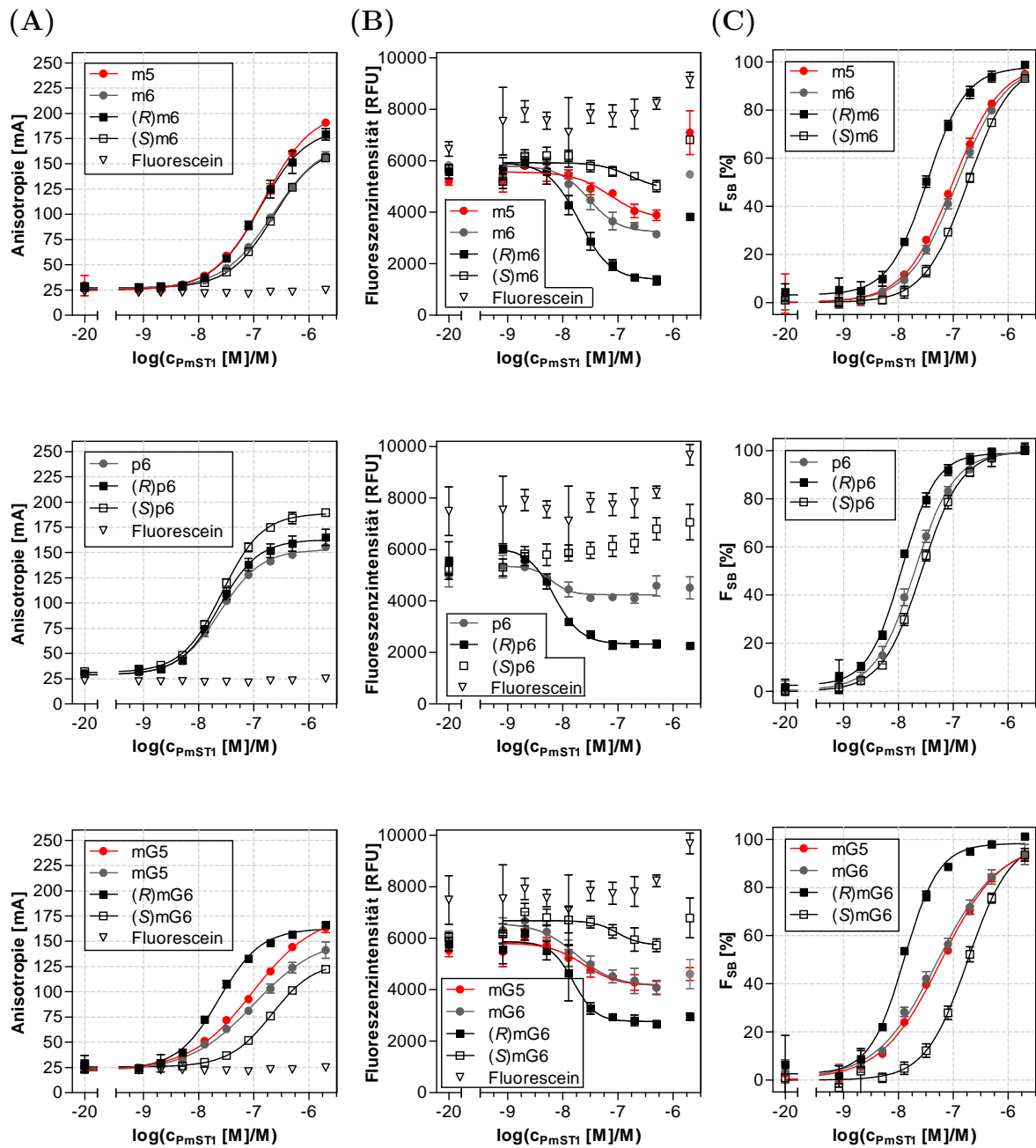


Abb. 5.7.: PmST1: (direkter FP-Bindungsassay): Auftragung von (A) A_{obs} , (B) den Fluoreszenzintensitäten und (C) F_{SB} gegen $\log(c_{\text{Enzym}})$. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus den Mittelwerten dreier Doppelbestimmungen, die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung.

Assaybedingungen: 50 mM Cacodylatpuffer (pH 7.4), 0.1% Triton X-100, FP-Sondenkonzentration: 10 nM, PmST1-Konzentration: 0–2.0 μM .

5.4. FP-Verdrängungsassay

Für die FP-Verdrängungsassays wurde für jede Sialyltransferase diejenige FP-Sonde ausgewählt, die bei konstanter Quantenausbeute die höchste Affinität und optimalerweise ein großes Dynamikfenster hatte:

- rST3Gal II und **(S)mG6**: $EC50_{F_{SB}} = 23.5 \text{ nM}$, $\Delta A = 215 \text{ mA}$, $Q = 1$
- hST6Gal I und **(S)p6**: $EC50_{F_{SB}} = 11.3 \text{ nM}$, $\Delta A = 205 \text{ mA}$, $Q = 1$
- Pd2,6ST(N) und **(R)p6**: $EC50_{F_{SB}} = 83.9 \text{ nM}$, $\Delta A = 159 \text{ mA}$, $Q = 1$
- PmST1 und **(S)p6**: $EC50_{F_{SB}} = 26.5 \text{ nM}$, $\Delta A = 158 \text{ mA}$, $Q = 1$

Die Sialyltransferasen wurden in einer Konzentration im Bereich des $EC50_{F_{SB}}$ der verwendeten FP-Sonde ($c = 10 \text{ nM}$) mit dieser vorinkubiert und sowohl mit den bekannten Inhibitoren Cytidindiphosphat (**I-CDP**) und **I-NHAc** als auch den neuen Verbindungen **I-NO₂-hrt** und **-lrt** titriert. Letztere waren schwach fluoreszent und wurden bis zu einer maximalen Konzentration von $32 \mu\text{M}$ eingesetzt.

5.4.1. Auswertung der FP-Verdrängungsassays

Die Verdrängung der FP-Sonde aus ihrem Komplex mit dem Rezeptor wurde durch Anisotropiemessungen quantifiziert und erfolgte ähnlich wie bei dem direkten Bindungsassay. Die observierten Anisotropien A_{obs} der Experimente wurden gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen und mit einem 3-PL nicht-linearen Regressionsmodell gefittet, wobei der Parameter der maximalen Anisotropie (A_{max}) auf den Mittelwert der Anisotropien der unverdrängten FP-Sonde ($0 \mu\text{M}$ Inhibitor) festgelegt wurde. Die Fluoreszenzquantenausbeuten der ausgewählten FP-Sonden waren unabhängig vom Bindungsgrad, so dass die Anisotropien nicht in F_{SB} umgerechnet werden mussten. Die Konzentration des Inhibitors, bei der die Hälfte der FP-Sonde aus ihrem Komplex verdrängt wird, ist als der $IC50$ des Verdrängers definiert und entspricht der Konzentration am Wendepunkt der sigmoidalen Kurve des Fits der Anisotropien.

5.4.1.1. Berechnung der Inhibitionskonstanten

Die $IC50$ -Werte hängen von den Parametern des Experiments ab und können zwischen unterschiedlich aufgebauten Assays nicht verglichen werden. Sie werden sowohl von der eingesetzten Enzym- als auch Sondenkonzentration beeinflusst. Klassischerweise

wird mit einer für Rezeptor-Ligandenbindungsassays generalisierten Form der CHENG-PRUSOFF-Gleichung aus dem IC50-Wert eines Inhibitors dessen Inhibitionskonstante K_i berechnet, sofern die Dissoziationskonstante K_{D1} der Sonde bekannt ist (Gleichung 5.15).

$$K_i = \frac{IC50}{\left(1 + \frac{[L]}{K_D}\right)} \quad (5.15)$$

Sie beschreibt ursprünglich Michaelis-Menten-Enzymreaktionen und beinhaltet zwei Näherungen: 1.) Der IC50 ist die totale Inhibitorkonzentration, anstatt der freien Inhibitorkonzentration bei 50%iger Inhibition einer Reaktion oder Bindung. 2.) $[L]$ ist die totale Konzentration des Liganden, anstatt die des freien Liganden^[200]. Unter den Reaktionsbedingungen kinetischer Enzymassays ist die Abweichung vernachlässigbar, da die Substrate und Inhibitoren in sehr großem Überschuss eingesetzt werden und die freien und totalen Konzentration in erster Näherung gleich sind^[201]. Bei den Ligand-Rezeptorbindungsstudien in einem FP-Assay werden die markierten Liganden jedoch in Konzentrationen eingesetzt, die im Bereich ihres K_D -Wertes oder darunter liegen. Nach CHENG-PRUSOFF werden daher zu große scheinbare Inhibitionskonstanten bestimmt, die stark von den IC50-Werten abhängen^[202].

COLESKA und WANG entwickelten eine mathematische Beschreibung (Gleichung 5.16), die eine akkuratere Berechnung der K_i -Werte von Inhibitoren ermöglicht, die weitgehend unabhängig von den experimentellen Parametern ist^[202].

$$K_i = \frac{[I]_{50}}{\left(\frac{[L]_{50}}{K_D} + \frac{[P]_0}{K_D} + 1\right)}, \quad (5.16)$$

Dabei ist $[I]_{50}$ die Konzentration des freien Inhibitors und $[L]_{50}$ die des freien markierten Liganden bei 50% Inhibition, $[P]_0$ die Konzentration des freien Proteins bei 0% Inhibition und K_D die Dissoziationskonstante des Rezeptor-Ligand-Komplexes. Die Formeln für die Berechnung der Parameter $[I]_{50}$, $[L]_{50}$ und $[P]_0$ sind im Anhang (Seite 269) aufgeführt.

Die Inhibitionswerte von **I-CDP** dienten als Referenz, zu denen alle IC50-Werte und Inhibitionskonstanten der anderen Inhibitoren ins Verhältnis gesetzt wurden. Die Aktivität von **I-CDP** wurde auf eins normiert und die relativen Potenzen ergaben sich aus $\frac{IC50(CDP)}{IC50(Inhibitor)}$ bzw. $\frac{K_i(CDP)}{K_i(Inhibitor)}$. Bei den nach COLESKA und WANG berechneten K_i -Werten verschoben sich die relativen Potenzen leicht zugunsten der affineren Verbin-

dung, wichen aber gegenüber den relativen IC₅₀-Aktivitäten um maximal 10 % ab.

5.4.2. rST3Gal II und (S)mG6

Die Sonde (S)mG6 wurde durch die Titration mit den Inhibitoren vollständig aus ihrem Komplex mit der rST3Gal II verdrängt. Daraus folgt, dass die Bindung von (S)mG6 vollständig reversibel war.

Die Affinitäten der Inhibitoren **I-CDP** ($K_i = 32.83 \pm 4.31 \mu\text{M}$) und **I-NHAc** ($K_i = 0.66 \pm 0.03 \mu\text{M}$) lagen in der Größenordnung der Inhibitionskonstanten, wie sie in Enzymkinetikassays bestimmt wurden (**I-CDP**: $K_{i,\text{Lit}} = 50 \mu\text{M}$ (für eine α -(2,3)-ST)^[74]; **I-NHAc**: $K_{i,\text{Lit}} = 0.3 \mu\text{M}$ (für eine α -(2,6)-ST)^[81]). Die Affinität von **I-NO₂** hing von der Stereoisomerie ab. **I-NO₂-hrt** ($K_i = 0.07 \pm 0.01$) band um eine Größenordnung besser als **I-NO₂-lrt** ($K_i = 0.65 \pm 0.03 \mu\text{M}$), dessen Affinität der von **I-NHAc** entsprach. **I-NO₂-hrt** band fast 500mal so gut an die rST3Gal II wie der Referenzinhibitor **I-CDP**.

5.4.3. hST6Gal I und (S)p6

Die Bindung der (S)p6 Sonde an die hST6Gal I konnte mit allen Inhibitoren gehemmt werden.

Die Inhibitionskonstante von **I-CDP** bei der hST6Gal I ($K_i = 3.50 \pm 0.41 \mu\text{M}$) ist vergleichbar mit den Werten früher Bestimmungen in Kinetikassays (CDP: $K_{i,\text{Lit}} = 10 \mu\text{M}$ (für eine α -(2,6)-ST)^[29]) und auch **I-NHAc** ($K_i = 0.78 \pm 0.09 \mu\text{M}$) zeigte im FP-Verdrängungsassay eine Inhibitionskonstante, die mit den Literaturangaben ($K_{i,\text{Lit}} = 0.3 \mu\text{M}$ (für eine α -(2,6)-ST)^[81]) korreliert. Die **I-NO₂**-Isomere hatten gegenüber der hST6Gal I ähnliche, aber inverse Affinitäten wie zur rST3Gal II. Bei der hST6Gal I war **I-NO₂-lrt** ($K_i = 0.08 \pm 0.01 \mu\text{M}$) affiner als **I-NO₂-hrt** ($K_i = 0.51 \pm 0.06 \mu\text{M}$).

5.4.4. Pd2,6ST(N) und (R)p6

Auch bei der bakteriellen Pd2,6ST(N) band die untersuchte FP-Sonde (R)p6 reversibel und konnte durch alle Inhibitoren verdrängt werden.

I-CDP war der affinste Inhibitor ($K_i = 0.09 \pm 0.01 \mu\text{M}$) und band an die Pd2,6ST(N) um zwei Größenordnungen besser als an die Säugetiersialyltransferasen. Die übergangszustandsanalogen Inhibitoren **I-NHAc** ($K_i = 0.36 \pm 0.02 \mu\text{M}$) und **I-NO₂** (**lrt**: $K_i =$

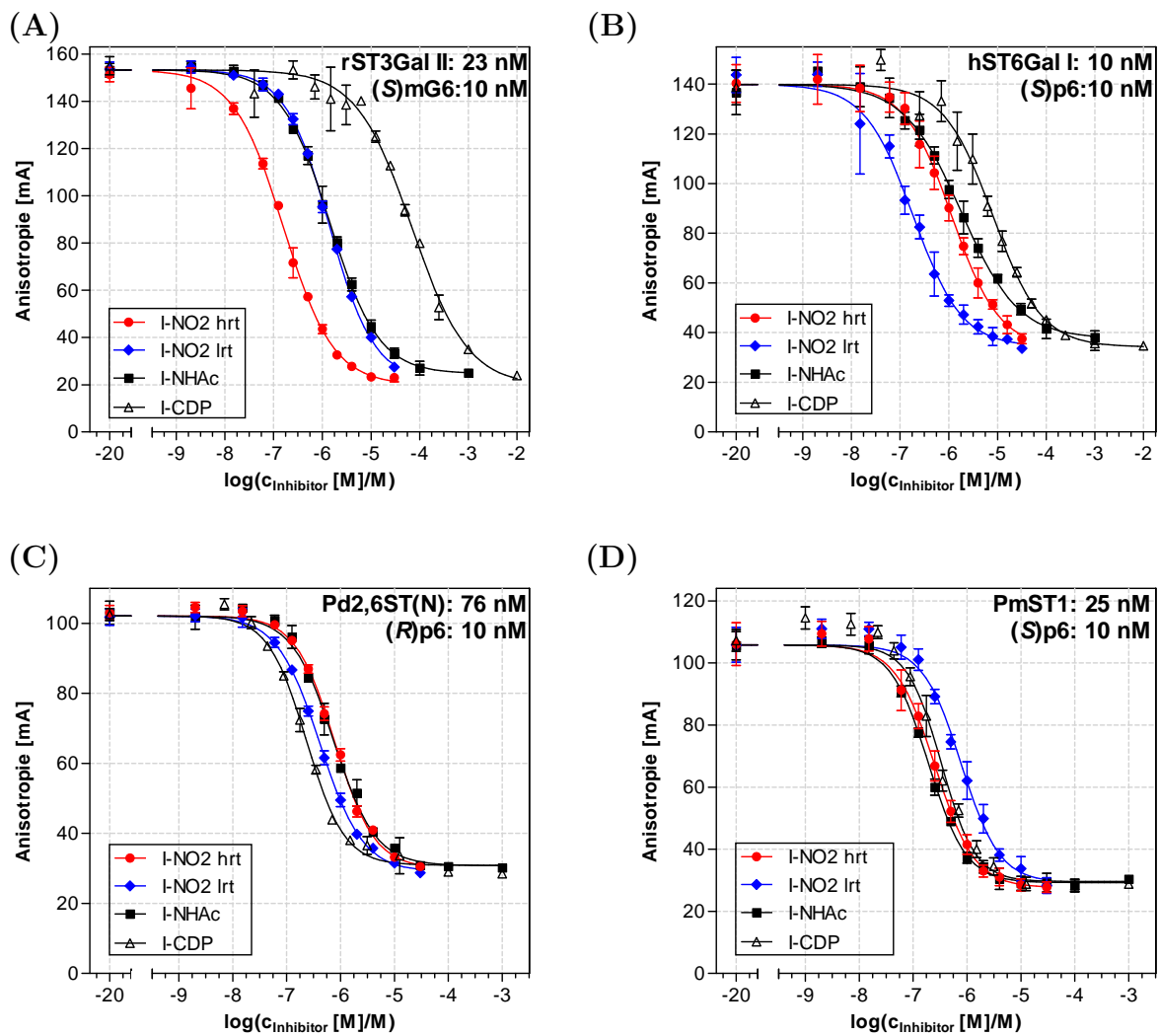


Abb. 5.8.: FP-Verdrängungsassays: Auftragung der Anisotropien gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration für: (A) rST3Gal II und (S)mG6; (B) hST6Gal I und (S)p6; (C) Pd2,6ST(N) und (R)p6; (D) PmST1 und (S)p6.

$0.19 \pm 0.01 \mu\text{M}$, hrt: $K_i = 0.38 \pm 0.02 \mu\text{M}$) zeigten zwar ähnliche Affinitäten wie gegenüber der Säugetiersialyltransferasen, aber sie banden deutlich schwächer als **I-CDP** an die Pd2,6ST(N). Die Affinitäten der **I-NO₂**-Isomere unterschieden sich nur gering.

5.4.5. PmST1 und (S)p6

Bei der Titration der PmST1 und (S)p6 konnten alle Inhibitoren die FP-Sonde vollständig verdrängen. **I-CDP** ($K_i = 0.15 \pm 0.01 \mu\text{M}$) band – ähnlich wie bei der anderen bakteriellen Sialyltransferase – überraschend gut an die PmST1. Der donoraloge

Tab. 5.7.: Ergebnisse des FP-Verdrängungsassays.

	Inhibitor	IC50 [μM] ^a	rel. Aktivität ^b	K_i [μM] ^{a,c}	rel. Aktivität ^b	ΔA [mA] ^a	Z'
rST3 ^d	I-CDP	69.69 \pm 9.14	1	32.83 \pm 4.31	1	129.5 \pm 4.1	0.87 ^x
	I-NHAc	1.42 \pm 0.06	49	0.66 \pm 0.03	50	128.4 \pm 4.0	0.88 ^x
	I-NO2-lrt	1.39 \pm 0.05	50	0.65 \pm 0.03	51	125.8 \pm 3.7	0.88 ^x
	I-NO2-hrt	0.16 \pm 0.01	437	0.07 \pm 0.01	479	130.3 \pm 4.7	0.88 ^x
hST6 ^e	I-CDP	8.02 \pm 0.94	1	3.50 \pm 0.41	1	104.6 \pm 8.0	0.73 ^x
	I-NHAc	1.79 \pm 0.21	4	0.78 \pm 0.09	4	101.9 \pm 9.5	0.64 ^x
	I-NO2-lrt	0.19 \pm 0.02	42	0.08 \pm 0.01	43	108.2 \pm 7.5	0.67 ^x
	I-NO2-hrt	1.17 \pm 0.14	7	0.51 \pm 0.06	7	103.9 \pm 8.5	0.67 ^x
PdST ^f	I-CDP	0.23 \pm 0.01	1.00	0.09 \pm 0.01	1.00	74.2 \pm 2.5	0.88 ^y
	I-NHAc	0.74 \pm 0.04	0.31	0.36 \pm 0.02	0.26	72.5 \pm 2.5	0.83 ^y
	I-NO2-lrt	0.41 \pm 0.01	0.56	0.19 \pm 0.01	0.50	73.9 \pm 2.4	0.88 ^y
	I-NO2-hrt	0.78 \pm 0.03	0.30	0.38 \pm 0.02	0.25	72.1 \pm 2.6	0.87 ^y
PmST1 ^e	I-CDP	0.33 \pm 0.02	1.00	0.15 \pm 0.01	1.00	77.4 \pm 5.6	0.44 ^y
	I-NHAc	0.19 \pm 0.01	1.72	0.08 \pm 0.01	1.79	75.8 \pm 5.6	0.73 ^y
	I-NO2-lrt	0.83 \pm 0.06	0.39	0.38 \pm 0.03	0.38	77.9 \pm 6.9	0.70 ^y
	I-NO2-hrt	0.26 \pm 0.02	1.28	0.11 \pm 0.01	1.29	78.4 \pm 6.1	0.68 ^y

^a \pm Standardfehler; ^brel. Aktivität gegenüber I-CDP; ^c Berechnet nach COLESKA-WANG; ^d(S)mG6; ^e(S)p6; ^f(R)p6; ^x_n = 9; ^y_n = 6.

Inhibitor **I-NHAc** ($K_i = 0.08 \pm 0.01 \mu\text{M}$) war um eine Größenordnung affiner wie gegenüber den Säugetiersialyltransferasen und der potenteste Ligand der PmST1. Die Affinitäten der **I-NO₂**-Isomere (**lrt**: $K_i = 0.38 \pm 0.03 \mu\text{M}$, **hrt**: $K_i = 0.11 \pm 0.01 \mu\text{M}$) waren mit der Affinität von **I-CDP** vergleichbar und unterschieden sich untereinander nur wenig.

5.4.6. Einfluss von DMSO auf den Verdrängungsassay

Die Sialyltransferasen und FP-Sonden wurden mit **I-NHAc** in Gegenwart von 0%, 0.25% oder 1% DMSO titriert. Die K_i -Werte waren von der DMSO-Konzentration unabhängig. Bei der rST3Gal II wurde das Dynamikfenster bei 1% DMSO gegenüber 0% DMSO um 12 mA reduziert, war aber bei den anderen Transferasen gegenüber der DMSO-Variation stabil (Abbildung 5.9 und Tabelle 5.8).

Nach Gleichung 5.13 wurde der Z'-Faktor berechnet, der aufgrund der geringen Anzahl an Messpunkten (9 für die rST3Gal II und 6 für die hST6Gal I) nur eine qualitative Be-

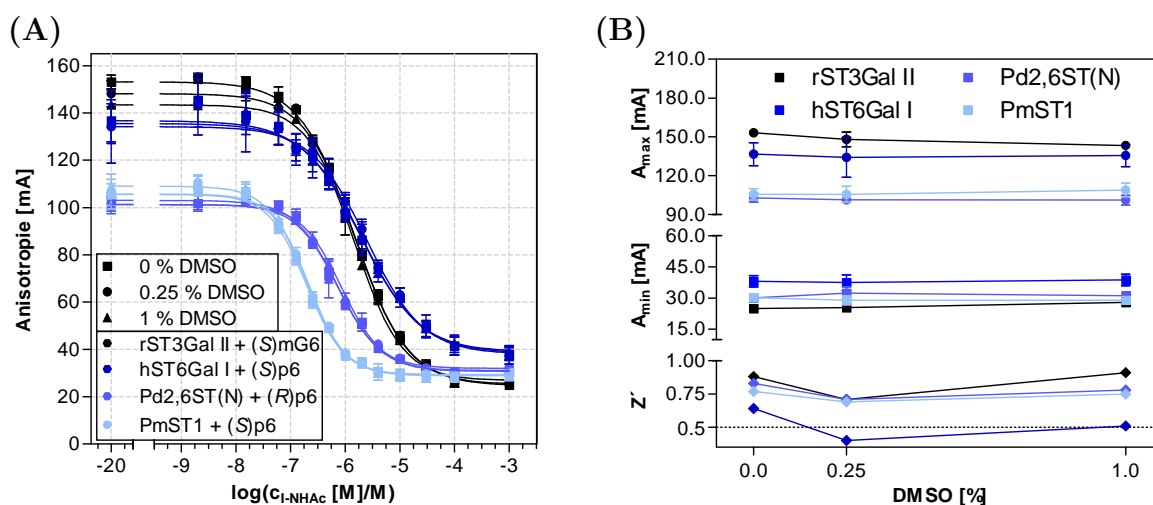


Abb. 5.9.: Einfluss von DMSO auf den FP-Verdrängungsassay: (A) Auftragung von A_{obs} gegen den Logarithmus der **I-NHAc** Konzentration; (B) Auftragung der Qualitätsparameter des Assays gegen die DMSO-Konzentration.

Tab. 5.8.: Einfluss von DMSO auf den FP-Verdrängungsassay.

	DMSO	IC50 [μ M] ^a	A_{min} [mA] ^a	A_{max} [mA] ^a	ΔA [mA] ^a	Z'
rST3 ^b	0 %	1.42 ± 0.06	25.0 ± 1.0	153.2 ± 2.9	128.2 ± 4.0	0.88 ^x
	0.25 %	1.55 ± 0.10	25.4 ± 1.4	148.1 ± 5.6	122.7 ± 7.0	0.71 ^x
	1.00 %	1.48 ± 0.07	27.9 ± 0.1	143.4 ± 0.7	115.5 ± 0.7	0.91 ^x
hST6 ^c	0 %	1.94 ± 0.24	38.0 ± 2.7	136.7 ± 8.9	98.7 ± 11.6	0.64 ^x
	0.25 %	2.49 ± 0.42	37.5 ± 3.7	134.2 ± 15.5	96.7 ± 19.2	0.40 ^x
	1.00 %	2.01 ± 0.29	38.7 ± 2.8	135.5 ± 8.4	96.8 ± 11.2	0.51 ^x
Pd2,6 ^d	0 %	0.76 ± 0.04	30.2 ± 0.4	103.0 ± 3.4	72.9 ± 3.8	0.83 ^y
	0.25 %	0.72 ± 0.04	32.4 ± 3.0	101.3 ± 2.9	68.9 ± 5.9	0.71 ^y
	1.00 %	0.81 ± 0.03	31.2 ± 0.9	101.2 ± 3.8	70.0 ± 4.8	0.78 ^y
PmST1 ^c	0 %	0.18 ± 0.02	30.3 ± 1.2	105.6 ± 4.5	75.2 ± 5.8	0.73 ^y
	0.25 %	0.21 ± 0.06	29.0 ± 2.2	105.7 ± 6.2	76.7 ± 8.4	0.72 ^y
	1.00 %	0.21 ± 0.01	29.0 ± 1.8	109.0 ± 5.2	80.0 ± 7.0	0.79 ^y

^a± Standardfehler; ^b(S)mG6; ^c(S)p6; ^d(R)p6; ^xn = 9; ^yn = 6.

wertung war. Die Werte lagen mit einer Ausnahme über 0.5 und prognostizierten einen sehr robusten Assay mit exzellenter Signalseparation, der bei DMSO-Konzentrationen zwischen 0–1 % für HT-Screenings geeignet war.

5.5. Ergebnisse der HT-FP-Assay Entwicklung

Die fluoresceinmarkierten Inhibitor-derivate (Tabelle 5.1) erwiesen sich alle als Liganden der vier getesteten Sialyltransferasen rST3Gal II, hST6Gal I, Pd2,6ST(N) und PmST1 und mit ihnen konnte ein miniaturisierter Hochdurchsatz-FP-Assays entwickelt werden. Gegenüber den Säugetiertransferasen erstreckten sich ihre Affinitäten über eine Größenordnung ($EC_{50_{F_{SB}}} = 9.0\text{--}78.9\text{ nM}$) und sie hatten sehr unterschiedliche Dynamikfenster ($\Delta A = 132\text{--}215\text{ mA}$). Ihre Bindungen an die bakteriellen Sialyltransferasen charakterisierte sich durch sehr unterschiedliche und überwiegend geringere Affinitäten ($EC_{50_{F_{SB}}} = 11.5\text{ bis } >1000\text{ nM}$) sowie kleinere Dynamikfenster ($\Delta A = 75\text{--}193\text{ mA}$) als für die Säugetiertransferasen. Für alle FP-Sonden galt, dass $[L]_T/EC_{50_{F_{SB}}} < 2$ ist, so dass sie durch die Sialyltransferasen nicht stöchiometrisch titriert wurden. Die *R*-konfigurierten FP-Sonden **(R)m6**, **(R)p6** und **(R)mG6** wurden von der rST3Gal II etwas und von der PmST1 als auch Pd2,6ST(N) deutlich besser als die *S*-Diastereomere **(S)m6**, **(S)p6** und **(S)mG6** gebunden. Die hST6Gal I band die *S*-konfigurierten FP-Sonden etwas besser (Tabelle 5.9).

Viele der FP-Sonden zeigten eine Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute von ihrer Bindung, wobei dies keine generelle Eigenschaft der FP-Sonden war, sondern von der jeweiligen Sialyltransferase abhing. So reduzierte sich z.B. bei der Bindung von **(R)p6** die Fluoreszenzintensität bei der PmST1 auf ca. $1/3$ und bei der rST3Gal II auf rund die Hälfte der Intensität der ungebundenen FP-Sonde, war aber bei der hST6Gal I und Pd2,6ST(N) von der Bindung unabhängig.

Nicht alle FP-Sonden zeigten optimale Eigenschaften, um sie in Verdrängungsassays einzusetzen. Die Fluoreszenzquantenausbeute sollte von der Bindung der Sonde unabhängig sein, so dass die observierten Anisotropien für die IC₅₀-Bestimmung einfach in die gebundene Fraktion F_{SB} umrechenbar waren. Für HT-Screenings ist außerdem ein großes und stabiles Dynamikfenster erstrebenswert (Z' -Faktor > 0.5), so dass Verdränger mit hoher Robustheit detektiert werden. Um einen großen Affinitätsbereich von Inhibitoren aufzulösen, muss die FP-Sonde hochaffin sein. Eine hohe Affinität ist auch für einen geringen Proteinverbrauch für Screenings großer Bibliotheken vorteil-

Tab. 5.9.: Übersicht über alle FP-Sonden ($EC50_{F_{SB}}$ und ΔA).

FP-Sonde	rST3Gal II		hST6Gal I		Pd2,6ST(N)		PmST1	
	$EC50_{F_{SB}}$ [nM]	ΔA [mA]	$EC50_{F_{SB}}$ [nM]	ΔA [mA]	$EC50_{F_{SB}}$ [nM]	ΔA [mA]	$EC50_{F_{SB}}$ [nM]	ΔA [mA]
m5	34.0	174	21.6	184	390.8	202	97.3	179
m6	46.3	155	17.2	207	> 1000	165	116.9	146
(<i>R</i>)m6	41.0	182	22.2	213	924.6	193	33.6	161
(<i>S</i>)m6	44.8	144	9.0	185	> 1000	180	183.8	140
p6	40.8	133	15.3	185	232.0	148	19.8	124
(<i>R</i>)p6	24.5	132	21.5	152	83.9	159	11.5	134
(<i>S</i>)p6	78.9	180	11.3	205	590.7	163	26.5	158
mG5	21.6	197	15.5	178	562.6	158	60.1	154
mG6	24.7	215	18.4	207	557.9	162	51.2	132
(<i>R</i>)mG6	23.9	194	17.9	205	53.2	75	12.7	139
(<i>S</i>)mG6	23.5	215	12.8	209	> 1000	182	184.6	104

Die Daten der jeweiligen Kombination aus Sialyltransferase und FP-Sonde, die für die FP-Verdrängungsassay eingesetzt wurden, sind fett gedruckt.

haft, die üblicherweise bei $c_{Enzym} \sim EC50_{F_{SB}}$ durchgeführt werden^[195]. Der Nutzen der diastereomerreinen FP-Sonden zeigte sich bei der Selektion der FP-Sonden für die FP-Verdrängungsassays anhand der *para*-Sonden besonders deutlich: Bei der hST6Gal I hatte das *S*-Isomer (**S**)p6 sowohl die höhere Affinität als auch das größere Dynamikfenster im Vergleich zu dem *R*-Isomer (**R**)p6. Bei der PmST1 war nur aufgrund der Isomerentrennung eine ideale FP-Sonde verfügbar, da nur bei (**S**)p6 die Fluoreszenzquantenausbeute von der Bindung unabhängig war. Bei der Pd2,6ST(N) war das *R*-Isomer 7mal affiner als das *S*-Isomer, so dass mit der Isomerenmischung p6 nur eine mäßig affine FP-Sonde zur Verfügung stünde. Die FP-Sonde, die den jeweils besten Kompromiss bildeten, sind:

- rST3Gal II: (**S**)mG6 ($EC50_{F_{SB}} = 23.5$ nM, $\Delta A = 215$ mA, $Q = 1$)
- hST6Gal I: (**S**)p6 ($EC50_{F_{SB}} = 11.3$ nM, $\Delta A = 205$ mA, $Q = 1$)
- Pd2,6ST(N): (**R**)p6 ($EC50_{F_{SB}} = 83.9$ nM, $\Delta A = 159$ mA, $Q = 1$)
- PmST1: (**S**)p6 ($EC50_{F_{SB}} = 26.5$ nM, $\Delta A = 158$ mA, $Q = 1$)

Deren reversibler Bindungsmechanismus wurde anhand von Verdrängungsexperimenten mit den Inhibitoren **I**-CDP, **I**-NHAc und **I**-NO₂-lrt sowie **I**-NO₂-hrt gezeigt. Bei den Säugetiertransferasen hatten die **I**-NO₂-Isomere sehr unterschiedliche Affinitäten, die bis in den mittleren nanomolaren Bereich gingen. Bei den bakteriellen

Tab. 5.10.: Vergleich der Affinitäten des unmarkierten (**I-NHAc**) und markierten Inhibitors (**p6**).

	I-NHAc: K_i [nM]^a	p6: $EC50_{FSB}$ [nM]^a	rel. Aktivität^b
rST3Gal II	660 ± 30	40.8 ± 1.8	16.2
hST6Gal I	780 ± 90	15.3 ± 0.3	51.0
Pd2,6ST(N)	360 ± 20	232.0 ± 16.1	1.6
PmST1	80 ± 10	19.8 ± 1.0	4.0

^a± Standardfehler, ^b $K_i(\mathbf{I-NHAc})/EC50_{FSB}(\mathbf{p6})$

Sialyltransferasen lagen die Inhibitionskonstanten im mittleren bis hohen nanomolaren Bereich. Überraschenderweise zeigten die übergangszustandsanalogen Inhibitoren keinen Affinitätsvorteil gegenüber **I-CDP** und bei der Pd2,6ST(N) war **I-CDP** sogar der potenteste Verdränger.

Der Vergleich der Affinitäten des unmarkierten Inhibitors **I-NHAc** mit denen der analogen fluoresceinmarkierten FP-Sonde **p6** zeigte, dass bei den Säugetiersialyltransferasen die Modifikation mit dem Fluoresceinlabel die Affinität stark erhöhte. An die rST3Gal II band **p6** 16mal und an die hST6Gal I 51mal so gut, wie **I-NHAc**. Bei den bakteriellen Sialyltransferasen hatte die Fluoresceinmarkierung einen geringen Einfluss. Die Sonde **p6** war gegenüber der Pd2,6ST(N) 1.6mal und gegenüber der PmST1 4.0mal so affin wie **I-NHAc** (Tabelle 5.10).

Der FP-Verdrängungsassay war gegenüber einer screeningtypischen DMSO-Konzentration von 1% robust und mit Z' -Faktoren zwischen 0.51–0.91 (bei 1% DMSO) uneingeschränkt für HTS-Zwecke geeignet.

6. Fluoreszenzpolarisation-basiertes HT-Screening einer Sialyltransferase

Der entwickelte HT-Assay (Kapitel 5) wurde in der Screening-Unit des FMP-Berlin unter realen HTS-Bedingungen für den Screen einer Sialyltransferase mit den Substanzbibliotheken des FMP-Berlin eingesetzt. Die rST3Gal II war im Vergleich zu den drei anderen kommerziell verfügbaren Sialyltransferasen in verhältnismäßig hoher Konzentration erhältlich und ermöglichte in Kombination mit der hochaffinen FP-Sonde (**S**)**mG6** einen geringen Proteinverbrauch im Screen. Das Screening unterteilte sich in drei Stufen, bestehend aus:

1. Primärscreen: Test der Bibliothekssubstanzen in einem vereinfachten Verdrängungsassay bei einer Konzentration der Testverbindungen. Anschließende statistische Auswertung und Hit-Selektion für die Validierung
2. Hit-Validierung: Titration der Sialyltransferase mit einer seriellen Verdünnung der Primärhits sowie Qualitätsanalyse (LC/MS) der Hit-Compounds und strukturelle Identifizierung der „frequent hitter“ und reaktiven Substanzen.
3. Leitstrukturelektion

6.1. Primärscreen

Es wurden mehrere Substanzbibliotheken des FMP-Berlin gescreent, die gemeinsam 28.864 Testsubstanzen umfassten. Dazu gehörte die ChemBioNet Collection^[203] mit über 20.000 Verbindungen (*ChemDiv*), die fragmentbasiert nach Analyse des World Drug Index (WDI) nach allgemeinen Gerüst- und Substrukturen zusammengestellt wurde und bekannte bioaktive Elemente repräsentiert. Jeweils ~ 4500 Verbindungen

umfassten eine Fragmentbibliothek mit Aminen, Ketonen und Carboxylaten (*Chem-Div*) und ein Diversitätsset (*Art-Chem GmbH*). Die Substanzen lagerten in 96er REMP-Platten bei -20°C (10 mM in DMSO) und wurden für die Primärscreens auf 384er Mikrotiterplatten umformatiert und auf 1 mM verdünnt.

6.1.1. Screen-Design und Logistik

Der Assay im Primärscreen glich dem bereits beschriebenen Verdrängungsassay (Kapitel 5.4), war aber für einen hohen Durchsatz optimiert. Daher wurden die Testsubstanzen nicht zu dem Enzym titriert, sondern nur eine Einfachbestimmung bei einer Konzentration durchgeführt. Die Konzentration der Testsubstanzen auf den Mutterplatten betrug 1 mM und das minimale Transfervolumen war $0.2\ \mu\text{L}$. Um eine Screenkonzentration von $10\ \mu\text{M}$ zu erreichen, betrug das finale Assayvolumen $20.2\ \mu\text{L}$.

Die letzten beiden Spalten der Mutterplatten waren mit reinem DMSO gefüllt und ließen Platz für die Kontrollen. Diese bestanden aus einer Spalte mit der Negativkontrolle, bei der die FP-Sonde unverdrängt war ($A_{\text{max}} \approx 130\ \text{mA}$; $c_{(\text{S})\text{mG6}} = 10\ \text{nM}$, $c_{\text{rST3Gal II}} = 18\ \text{nM}$), und einer Spalte mit der Positivkontrolle, bei der die FP-Sonde ungebunden vorlag ($A_{\text{min}} \approx 22\ \text{mA}$; $c_{(\text{S})\text{mG6}} = 10\ \text{nM}$). Die Testlösung und Negativkontrolle wurde in einem Arbeitsschritt mit einem Dispenser auf die Platten gegeben. Sie unterschieden sich nach dem Transfer der Testverbindungen durch die Zugabe von reinem DMSO zu den Kontrollpositionen.

Der Transfer der Testsubstanzen von den Mutterplatten auf die Screenplatten erfolgte mit einem Sciclone ALH-3000 Pipettierroboter und war der zeitlich limitierende Arbeitsschritt (5 min pro Transfer inkl. aller Wasch- und Trockenschritte). Daraus ergab sich ein theoretischer Durchsatz von 12 Platten/h (exklusive Kontrollen). Nach dem Compoundtransfer wurden die Platten intensiv geschüttelt, anschließend zentrifugiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie mit einem Plattenlesegerät

Tab. 6.1.: Arbeitsablauf des Screenings

Arbeitsschritt	Zeitaufwand	Eingesetzte Geräte
Testlsg. + A_{min} -Kontrolle	1 min	Dispenser + Mehrkanalpipette
Compoundtransfer	5 min	Sciclone ALH-3000 (<i>Caliper</i>)
Schütteln + Zentrifugieren	1.5 min	Eppendorf Schüttler und Zentrifuge
Inkubation	20 min	-
FP-Auslesen	4 min	Tecan Sapphire2

vermessen wurden. Die Gesamtbearbeitungszeit einer Platte, angefangen mit der Beladung bis zur vollständigen Auslesung der Anisotropien, betrug ~ 32 min. Durch den automatisierten Compoundtransfer und die Beladung der Platten mit der Testlösung mit einem Dispenser war der theoretische Durchsatz von 12 Platten/h auch von einer Einzelperson erreichbar.

6.1.2. HTS-Qualität

Die Qualität und Robustheit des Screens wurde anhand verschiedener Methoden kontrolliert und bewertet. Da beim Screening von großen Substanzbibliotheken enorme Datenmengen akkumuliert werden, bedarf es einer automatisierten statistischen Auswertung. Wenige unnatürliche Messwerte können dabei den Mittelwert als auch die Standardabweichung der Messwerte stark beeinflussen und es ist daher vorteilhaft, auf robuste Statistikmethoden zurückzugreifen, da eine Sichtung der Rohdaten gegenüber Ausreißern sehr zeitaufwendig wäre. Anstatt des arithmetischen Mittels (\bar{x}) wurde der Median¹ (\tilde{x}) der Messwertpopulationen verwendet, der gegenüber wenigen extrem abweichenden Werten robust ist. Die Variabilität wurde mit dem MAD (median absolute deviation from the median) abgeschätzt, der ebenfalls robust gegenüber wenigen Ausreißern ist^[204]. Bei einer idealen Normalverteilung ist der Median gleich dem Mittelwert, da die Werte symmetrisch um den Mittelwert angeordnet sind und der doppelte MAD (von $-MAD$ bis $+MAD$) beinhaltet 50% aller Werte einer Normalverteilung. Für eine Gaußsche Verteilung ist der theoretische MAD nahe 0.6745 mal der theoretischen Standardabweichung σ , so dass durch Multiplikation des MAD mit 1.43 dieser der Standardabweichung genähert werden kann^[205].

Die Berechnung der robusten z-scores² erfolgte aus den Medianen und den MADs, die der Standardabweichung genähert wurden (Gleichung 6.1). Die z-scores und Z'-Werte, die unter Verwendung der robusten Statistik berechnet wurden, werden im Folgenden mit z_r-score und Z'_r-Wert bezeichnet (Gleichung 6.2).

$$z_{r\text{-score}_i} = \frac{x_i - \text{Median}}{(MAD \cdot 1.43)} \quad (6.1)$$

¹Der Median von n Datenwerten ist der mittlere Wert, nach Sortierung der Werte von niedrig nach hoch, wenn n ungerade ist und der Durchschnitt der zwei mittleren Werte, wenn n gerade ist. Der Median stellt den Wert dar, der eine Verteilung in zwei gleich große Teile teilt.

²Der z-score (standard score) beschreibt, wieviele Standardabweichungen ein Messwert über oder unter dem Mittelwert aller Messwerte liegt.

$$Z'_r = 1 - \frac{(3\sigma_{\max} + 3\sigma_{\min})}{|\tilde{A}_{\max} - \tilde{A}_{\min}|} \quad \text{mit} \quad \sigma_x = MAD_x \cdot 1.43 \quad (6.2)$$

6.1.2.1. Z'-Faktorplatte

Vor der Durchführung des Screens wurde der Assaysetup mit einer Z'-Faktorplatte überprüft. Dazu wurden gemäß dem Screeningprotokoll eine Platte mit dem Dispenser zur einen Hälfte mit der Negativ- (A_{\max}) und zur anderen mit der Positivkontrolle (A_{\min}) befüllt und von einer weiteren Platte 0.2 μ L DMSO mit dem Roboter zugegeben. Die Analyse der Anisotropien ergab hervorragende Werte von $Z' = 0.84$ unter Anwendung der Standardstatistik und $Z'_r = 0.93$ mit der robusten Statistik.

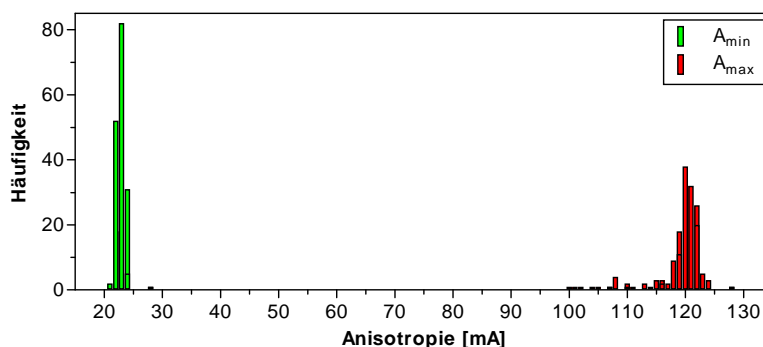


Abb. 6.1.: Anisotropien der Z'-Faktorplatte.

6.1.2.2. Stabilität des Assaysignals

Die Mediane der Anisotropien der Negativ- und Positivkontrollen (\tilde{A}_{\min} und \tilde{A}_{\max}) der einzelnen Platten zeigten ein stabiles Signal über den zeitlichen Verlauf des Screens (Abbildung 6.2 A). Eine detailliertere Betrachtung der Plattenmediane in einer Qualitätsregelkarte³[204] ließ für die Negativkontrolle (A_{\min}) zwei Populationen erkennen, die mit +1 bzw. -1 SD symmetrisch um den Mittelwert verteilt waren und sich im Laufe des Screens mehrmals abwechselten. Ab Platte 50 wurde das Signal stabiler und näherte sich einer Abweichung von 0 SD an. Die Positivkontrolle (A_{\max}) zeigte zu Beginn stärkere Abweichungen mit bis zu -3 SD, stabilisierte sich aber nach der 18ten Platte

³Aufgetragen sind die Standardabweichungen der Plattenmediane von Mittelwert der Plattenmediane, geordnet nach der Messzeit der Platte. Mit einer Qualitätsregelkarte lassen sich zeitliche Änderungen des Assaysignals identifizieren.

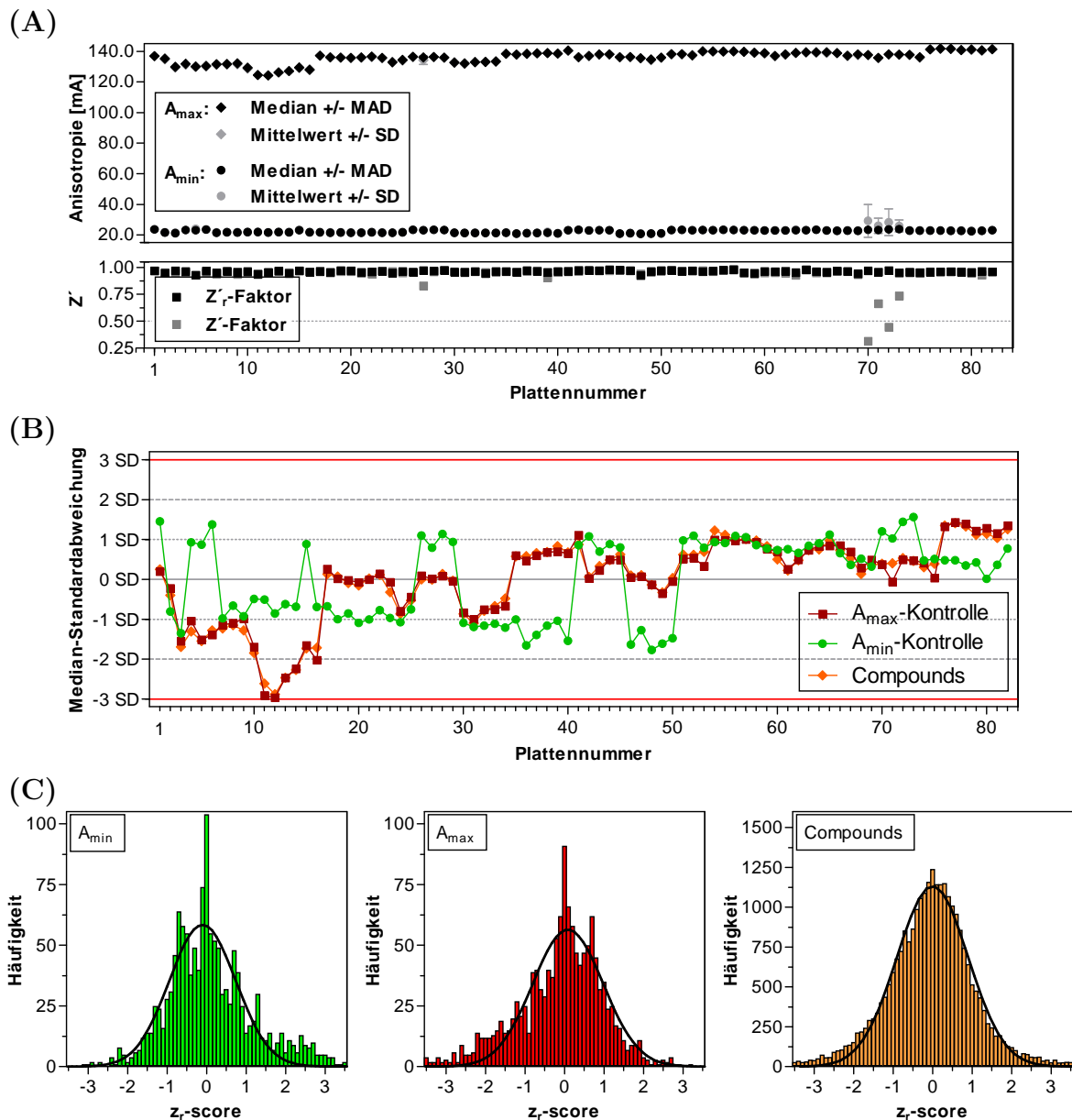


Abb. 6.2.: Qualitätskontrolle des HTS-Assays: (A) Die Mediane und Mittelwerte der Anisotropien und Z' -Werte der Kontrollen; (B) Qualitätsregelkarte der Kontrollen und Compounds; (C) z_r -score-Verteilung der Kontroll- und der Compoundsignale (genähert mit einer Gauß-Verteilung).

auf ± 1 SD. Die Plattenmediane der Testverbindungen zeigten die gleichen Abweichungen wie die Positivkontrollen. Die Standardabweichung der Plattenmediane war für die Kontrollen sehr klein ($\bar{A}_{\min} = 22.3 \pm 0.9$ mA und für $\bar{A}_{\max} = 136.1 \pm 4.0$ mA).

Die Bestimmung der Z'_r -Werte mit der robusten Statistik ergab für die 82 Assayplatten

exzellente Werte zwischen 0.93 und 0.98 (Abbildung 6.2 A). Bei den Platten 70–73 war aufgrund eines apparativen Fehlers jeweils ein well der Positivkontrolle (A_{\min}) nicht befüllt. Da dort nur das polarisierte Streulicht detektiert wurde, waren die Anisotropien entsprechend sehr hoch und führten bei Verwendung der unrobusten Statistik zu Z' -Werten von 0.31–0.74. Hier zeigte sich deutlich der Nutzen der robusten Statistik.

6.1.2.3. z-score Verteilung und Heat-Map-Analyse

Die Signale der Kontrollen und auch der Testsubstanzen sollten näherungsweise eine Gleichverteilung zeigen. Die Auftragung der z_r -scores (berechnet nach Gleichung 6.1) der Kontrollen und ein Fit mit einer Gauß-Verteilung zeigten eine annähernde Gleichverteilung der Werte um den Median. Die Negativkontrolle (A_{\max}) zeigte eine leichte Verschiebung der z_r -scores zu kleineren Werten, während die Positivkontrolle (A_{\min}) zu höheren Abweichungen verschoben war. Somit streuten die Messwerte leicht in das Signalfenster zwischen den Kontrollen. Die z_r -scores der Testsubstanzen wichen ebenfalls leicht von einer Normalverteilung ab und zeigten wie die Negativkontrolle ein schwaches Tailing hin zu negativen z_r -scores (Abbildung 6.2). Zwar waren die Abweichungen von einer Normalverteilung gering, aber dennoch könnte dies in einer überhöhten Hit-Rate resultieren und musste bei der späteren Hit-Selektion berücksichtigt werden.

Um zu untersuchen, ob möglicherweise systematische Platteneffekte für die leichte Abweichung von der Normalverteilung verantwortlich waren, erfolgte eine Heat-Map-Analyse. Die z_r -scores wurden in einer 2D-Farbdarstellung der Screenplatten visualisiert. Rand- und Eckeneffekte, wie sie durch ungleichmäßige Temperaturen oder Puffer- evaporation hervorgerufen werden können, oder Fehler beim Dispensieren äußern sich in leicht zu erkennenden Farbstreifen oder Feldern. Bei einigen Platten wurde ein leichter Ecken- (Abbildung 6.3 A) oder Randeffekt bei der Reihe P beobachtet (Abbildung 6.3 B). Er war zu gering, um zu übermäßig vielen Falsch-Positiven zu führen, steht aber in Übereinstimmung mit dem leichten Tailing der Negativkontrolle und der Compoundsignale.

6.1.2.4. Störeffekte durch Testverbindungen

Bei FP-basierten Screenings ist prinzipbedingt mit Störeffekten durch autofluoreszente und unlösliche Verbindungen zu rechnen^[206].

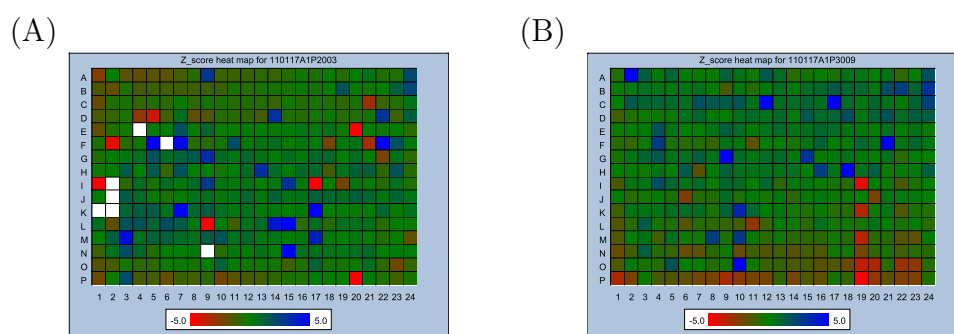


Abb. 6.3.: Ausgewählte Platten-Heat-Maps (rot: kleinster z-score; blau grösster z-score; weiß: kein Messwert).

Da die Konzentration der getesteten Testsubstanzen gegenüber der FP-Sondenkonzentration sehr viel größer war (Faktor 1000), können bereits schwach fluoreszente Verbindungen den Assay massiv stören. Ihr Fluoreszenzlicht ist depolarisiert und dies führt bei Betrachtung der Anisotropien zu Falsch-Positiven, die aber anhand ihrer von den Kontrollen abweichenden totalen Fluoreszenzintensität leicht identifiziert werden können. Ist eine autofluoreszente Substanz jedoch ein Verdränger der FP-Sonde, liegen Falsch-Falsch-Positive vor. Die Depolarisation würde nicht auf die FP-Sondenverdrängung sondern auf die Autofluoreszenz zurückgeführt werden. Sie von den Falsch-Positiven zu unterscheiden ist im FP-Assay nicht möglich. Bei 68 Verbindungen überstieg die Autofluoreszenz sogar die maximale Signalintensität (weiße Felder in den Heat-Maps, Abbildung 6.3 A).

Un- oder schwerlösliche Substanzen, die Partikel bilden, streuen das Licht. Dieses ist polarisiert und erhöht die totale Fluoreszenzintensität. Substanzen, die zwar die FP-Sonde aus ihrem Komplex verdrängen, aber durch Streulicht die Anisotropie erhöhen, können die Anisotropiereduktion durch die verdrängte FP-Sonde maskieren. Solche Falsch-Negative lassen sich ebenfalls nicht mit dem FP-Assay erkennen.

Eine weitere mögliche Interferenz ist die Filterung des Lichts durch farbige Substanzen. Dies wirkt sich nur auf die Fluoreszenzintensität aus und beeinflusst nicht die gemessene Anisotropie^[160].

In einem Scatterplot der Fluoreszenzintensitäten, aufgetragen gegen die Anisotropien, können diese Effekte qualitativ betrachtet werden (Abbildung 8.5 A; die Daten wurden mit einer Polynomfunktion 4ter Ordnung gefittet). Da die Quantenausbeute der gewählten FP-Sonde (**S**)**mG6** bei der Bindung an die rST3Gal II konstant war, ist eine veränderte Fluoreszenzintensität immer auf einen Effekt durch die Testsubstanzen

zurückzuführen. Deutlich war die Tendenz ersichtlich, dass mit abnormal hohen Anisotropien auch eine erhöhte Fluoreszenzintensität einherging, wie es von lichtstreuenden Partikeln zu erwarten war. Zu kleinen Anisotropien hin teilten sich die Substanzen in zwei Populationen. Die eine Gruppe setzte sich aus autofluoreszenten Verbindungen zusammen, erkennbar an der Zunahme der Fluoreszenzintensität bei abnehmender Anisotropie, und die zweite Gruppe zeigte unveränderte Fluoreszenzintensitäten, trotz reduzierter Anisotropien. Letztere Gruppe sind in der Definition des Screens Primärhits.

6.1.3. Hit-Selektion

Bei der Betrachtung der Störeffekte wurde bereits ersichtlich, dass die Reduktion der Anisotropie als alleiniges Hit-Kriterium nicht genügt. Vielmehr mussten zunächst alle autofluoreszenten Verbindungen gegenselektiert werden. Dazu wurde eine pragmatische Obergrenze für die maximalen Fluoreszenzintensität von 125 % des Medians der Kontrollfluoreszenzintensitäten festgelegt (entspricht ~ 10 SD). Dies ergab 556 (1.9 %) der 28.864 gescreenten Substanzen (totale Konzentration 10 μ M), die von der weiteren statistischen Analyse bei der Hit-Selektion ausgeschlossen wurden.

Klassischerweise wird als Hitselektionskriterium eine willkürliche Aktivitäts- oder Inhibitions-grenze festgelegt, die Verbindungen über- oder unterschreiten müssen, um als Hit selektiert zu werden. Eine andere Möglichkeit basiert auf scoring-Methoden, bei der Hits als Abweichler aus der großen Maße der überwiegend inaktiven Testsubstanzen (deren Aktivitäten normalverteilt sind) erkannt werden. Als Schwellenwert für die Abweichung werden häufig ± 3 SD („-“ für Inhibition und „+“ für Aktivierung) vom Mittelwert aller Proben verwendet^[205]. Dies führte zu einer sehr hohen Hitzahl (734, 2.59 % aller gescreenten Substanzen) und die 2D-Farbdarstellung der Summe aller Hits pro well über den gesamten Screen in einer Heat-Map zeigt eine Hit-Akkumulation in der Reihe P (Abbildung 8.5), wie sie bereits bei der z_r -score-Analyse prognostiziert wurde. Als weiteres Hit-Kriterium für die 734 verbliebenen Testsubstanzen wurde eine Mindestaktivität (rel. Aktivität = $\frac{Signal - A_{min}}{A_{max} - A_{min}}$) von 10 % festgelegt. Dies ergab 149 Primärhits (0.52 % aller gescreenten Substanzen) für die Hit-Validierung.

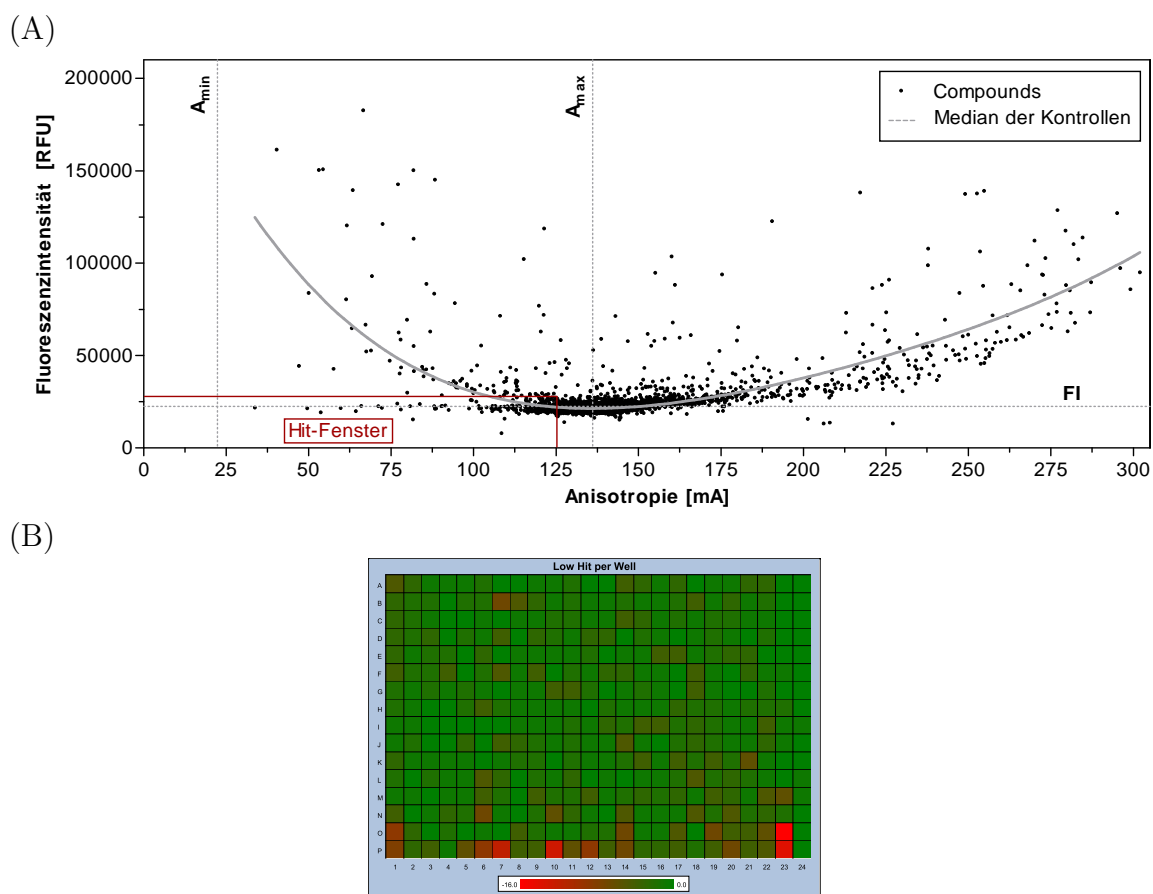


Abb. 6.4.: (A) Scatterplot der Fluoreszenzintensitäten der gescreenteten Testsubstanzen, aufgetragen gegen die Anisotropien; (B) Hit-Selektion Heat-Map (Farbskala: Gesamtzahl Hits; Beispiel: Auf 82 Platten wurde bei O22 16mal ein Inhibitor gefunden).

6.2. Hit-Validierung

In der Hit-Validierung wurden die Eigenschaften der 149 selektierten Hits des Primärscreens charakterisiert und verbliebene Falsch-Positive eliminiert. Dazu wurden ihre Inhibitionspotenzen bestimmt (IC₅₀-Validierung) und die Integrität und Reinheit der Testsubstanzen überprüft (LC/MS-Qualitätskontrolle). Die Betrachtung der chemischen Strukturen gab Aufschluss über „frequent hitter“ und Protein-reaktive Testverbindungen.

6.2.1. IC50-Validierung

Die Hit-Validierung wurde wie der Primärscreen durchgeführt, allerdings erfolgte nun eine Titration der rST3Gal II mit einer seriellen Verdünnung der Primärhit-Compounds ($c = 0.1\text{--}50.0\ \mu\text{M}$). Die Vorverdünnung mit DMSO und der Compoundtransfer wurden automatisiert mit dem Pipettierroboter durchgeführt. Die anschließende Analyse der Messdaten erfolgte ebenfalls automatisiert. Für jede Assayplatte wurde mit den Kontrollen (A_{max} und A_{min}) der Dynamikbereich berechnet (ΔA). Die Anisotropien der Testverbindungen in Relation zum Dynamikbereich ergaben die relativen Aktivitäten, die gegen den Logarithmus der InhibitorKonzentration aufgetragen und mit einer 4-PL nicht linearen Regression (Gleichung 5.14 auf Seite 64) angenähert wurden. Bei der Regression mußten folgende Kriterien erfüllt sein: 1.) $\sigma_{\text{IC50}} < \text{IC50}$; 2.) Aktivität $> 25\%$. Diese Kriterien wurden von 44 der 149 validierten Hit-Verbindungen nicht erfüllt, die von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden⁴.

Die übrigen 105 validierten Substanzen hatten IC50-Werte zwischen 0.5 und 46.7 μM , bei einem Mittelwert von 14.6 μM (Tabelle 6.2). Einige der Verbindungen waren nicht in der Lage, die FP-Sonde vollständig zu verdrängen und ihre Aktivitäten wurden vorzeitig gesättigt (z.B. Compounds 200918, 207032, 214784 und 401984).

6.2.2. LC/MS-Qualitätskontrolle

Die Bibliotheken des FMP-Berlin werden bei $-20\ ^\circ\text{C}$ gelagert und nur für die Zeitdauer eines Screens aufgetaut. Dennoch sind nicht alle Verbindungen bei einer Langzeitlagerung in DMSO stabil, so dass ihre Integrität überprüft werden musste^[207]. Mit einer automatisierten LC/MS-Analyse wurde die Reinheit der Testsubstanzen durch Messung der Absorption bei 254 nm abgeschätzt. Die Zuordnung des Signalpeaks erfolgte über die hochauflösende Massenanalyse. Rund ein Drittel der 105 IC50-validierten Hit-Compounds zeigte eine Reinheit $< 80\%$, ein Zehntel hatte eine Reinheit zwischen 80 und 90 % und mit einem Drittel war der überwiegende Teil sehr sauber (Reinheit $> 90\%$) (Tabelle 6.2).

⁴Compound IDs: 100678, 200867, 202564, 204778, 204821, 204822, 205319, 205724, 206287, 206528, 207030, 208280, 211176, 214783, 215283, 215288, 303559, 400312, 400656, 401741, 401796, 402094, 402278, 402374, 403255, 404080; keine Aktivität: 100004, 101942, 202478, 204822, 205707, 206533, 213232, 215038, 215875, 301349, 301759, 301897, 301906, 302175, 302526, 304068, 401723, 403561

Tab. 6.2.: IC50 und MS-Analyse der Hit-Compounds.

Reinheit ^a	Anzahl (%)	IC50			
		< 5 µM	5–15 µM	15–25 µM	> 25 µM
>90 %	63 (60.0 %)	13	20	21	9
80-90 %	10 (9.5 %)	2	5	3	0
< 80 %	32 (30.5 %)	8	10	8	6
Summe	105 (100 %)	23 (21.9 %)	35 (33.3 %)	32 (30.5 %)	15 (14.3 %)

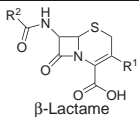
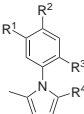
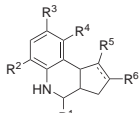
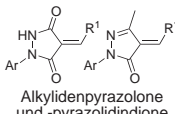
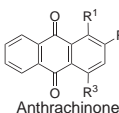
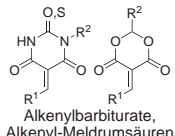

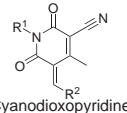
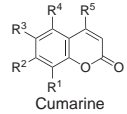

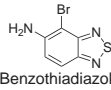
^aUV bei 254 nm.

6.2.3. Reaktive Testverbindungen und „Frequent Hitter“

Viele Substanzen der Bibliotheken wurden aus Derivaten biologisch aktiver Substanzen oder Verbindungsklassen sowie Naturprodukten zusammengestellt^[203]. Darunter sind zahlreiche – auch in Anwendung befindliche – Wirkstoffe, die als irreversibel bindende Inhibitoren agieren und proteinreaktiv sind. Die Synthesen von Bibliotheken sind meist darauf ausgelegt, mit wenig Aufwand eine hohe Diversität zu erreichen, bringen aber bisweilen Strukturklassen – wie alkylierende und acylierende Systeme – hervor, die mit Proteinen und biologischen Nukleophilen reagieren können^[208]. Weitere interferierende Substanzen können aus den Synthesen verbliebene Kontaminanten sein^[208] oder Abbauprodukte, die bei der Langzeitlagerung (auch bei ununterbrochener Kühlung) in DMSO entstehen und für die biologische Aktivität verantwortlich sind^[209,210].

Zahlreiche Substanzklassen tauchen überaus häufig als Hits in Screening-Kampagnen auf (sogenannte „frequent hitter“), obgleich der Mechanismus ihrer Interferenz mit den jeweiligen Assays nicht immer offensichtlich ist. Der Hauptstörfaktor für diesen FP-basierenden Screen waren die autofluoreszenten Verbindungen, die jedoch leicht zu identifizieren waren und bereits größtenteils ausselektiert wurden. Mit der statistischen Analyse von HT-Screens (basierend auf dem AlphaScreen-System) haben BAELL und HOLLOWAY zahlreiche Substanzklassen aufgezeigt, die als „frequent hitter“ auftreten^[210]. Ergänzend mit einem NMR-Assay unter Verwendung eines reaktiven Proteins, haben HUTH *et al.* diverse Struktur motive als proteinreaktiv identifiziert. Anhand dieser Informationen und mit den Erfahrungen der Screening-Unit wurden alle Substanzen auf mögliche Struktur motive hin überprüft, die auf frequent hitter“ und/oder proteinreaktive Substanzen hinweisen. Die identifizierten Strukturen wurden – soweit möglich – in Klassen zusammengefasst und sind in Tabelle 6.3 aufgeführt.

Tab. 6.3.: „frequent hitter“ und reaktive Verbindungen.

Klasse ⁵	Kernstruktur ^a	Anzahl Hits	IC50 [μ M]	IC50 < 15 μ M	Reinheit > 80 %	Mechanismus
I	 β -Lactame	28	2.7–30.0	11	24	Cephalosporinsystem ^[211]
II	 N-Arylpyrrole	11	0.9–21.0	10	8	unbekannt ^[210]
III	 Cyclopentenquinoline	7	1.5–18.3	6	4	unbekannt ^[210]
IV	 Alkylidenpyrazolone und -pyrazolidinone	8	4.7–29.2	5	2	Michael-Akzeptoren ^[210]
V	 Anthraquinone	5	3.3–41.5	3	6	Michael Akzeptoren ^[209,212,213]
VI	 Alkenylbarbiturate, Alkenyl-Meldrumsäuren	4	12.5–37.1	1	1	Michael-Akzeptoren, Oxidatoren ^[164,214–216]
VII	 Catechole	2	0.5–34.6	1	2	Oxidation zu Chinonen ^[209,211,217]
VIII	 Cyanodioxopyridine	2	5.3–6.4	2	1	elektrophiles Nitril ^[218]
IX	 Cumarine	2	15.9–25.5	0	1	Michael-Akzeptoren
X	 Alkylidenrhodanin	1	0.7	1	0	Michael- Akzeptoren ^[219,220]
XI	 Benzothiadiazole	1	11.5	1	1	Thiolelektrophile

^aDie vollständigen Strukturen sind im Anhang aufgeführt.

Die größte Gruppe proteinreaktiver Substanzen umfasst 28 Cephalosporine (Klasse I), die ein alkoholreaktives β -Lactamsystem als reaktive Kernstruktur gemein haben^[221]. Die zweitgrößte Gruppe besteht aus 11 *N*-Aryl-2,5-dimethylpyrrolderivaten (Klasse II), die überaus häufig in Screeningkampagnen^[222–227] erscheinen. Für sie ist bekannt, dass es Abbauprodukte sind, die für die biologische Aktivität verantwortlich sind. Weder der Mechanismus, noch die Struktur dieser Abbauprodukte sind bislang identifiziert worden^[210]. Die fusionierten Cyclopentenchinoline (Klasse III), von denen sieben als Hits auftraten, sind „frequent hitter“^[222,223,227–232], deren Mechanismus bei der Interferenz mit den Assays unbekannt ist. Mehrere häufig beschriebene und höchstwahrscheinlich proteinreaktive Michael-Akzeptoren (Klasse IV: Pyrazolidin-3,5-dione und 2,4-Dihydropyrazol-3-one^[220,224,233–237]; Klasse VI: Alkyliden-substituierten Barbiturate und Meldrumsäuren^[154,164,214,216,223,224,234,238–243]; Klasse IX: Cumarine; Klasse X: Alkylidenrhodanine^[219,220,225,228,233,234,236,238–240,244,245]), die als „frequent hitter“ dokumentiert sind^[210], traten auch bei diesem Screen auf. Chinoide Strukturen (Klasse V) und Catechole (Klasse VII), die wiederum durch Oxidation Chinone bilden^[217], können ebenfalls mit nukleophilen Proteinseitenketten reagieren^[212,213,227,246] und als Redoxzyklusreagenzien reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erzeugen^[156,230,242,243,247]. Die Cyanopyridone (Klasse VIII) können mit ihrer elektrophilen Nitrilgruppe mit Cysteinen reagieren^[218] und sind als „frequent hitter“ dokumentiert^[224,241,248,249]. Der letzte identifizierte „frequent hitter“ ist ein 4-Brom-2,1,3-benzothiadiazol-5-amin (Klasse XI), deren Sulfonamidderivate häufig als Hits in Screenings^[230,250–253] gefunden werden. Sie sind bekannte hochreaktive Thioelektrophile^[254] und werden als Fluorophorlabel^[255] eingesetzt.

Für neue Leitstrukturen ist ein reversibler Bindungsmechanismus notwendig, um durch Structure-Affinity-Relationship-Studien (SAR) die Affinitäten zu optimieren. Bei reaktiven Verbindungen würde möglicherweise lediglich ihre Reaktivität gegenüber dem Zielprotein optimiert, ohne die selektiven Wechselwirkungen zum Rezeptor zu optimieren^[208]. Daher schieden die aufgeführten Verbindungen aufgrund ihrer möglichen Proteinreaktivität aus.

⁵**Klasse I:** 204779, 207618, 209053, 214610, 214611, 214762, 214764, 214765, 214766, 214767, 214768, 214769, 214773, 214775, 214778, 214780, 214781, 214782, 214784, 400592, 401552, 401619, 401677, 401740, 401799, 402279, 402280, 402372; **Klasse II:** 301109, 301110, 301111, 301113, 301117, 301118, 301120, 301121, 301122, 301123, 301405; **Klasse III:** 203636, 203638, 203640, 203647, 301047, 302408, 303746; **Klasse IV:** 100630, 100639, 100640, 100658, 100683 und 201891, 201904, 205084; **Klasse V:** 200918, 205353, 205354, 300008, 40139; **Klasse VI:** 210358, 402533, 202151 und 208179; **Klasse VII:** 201048, 404093; **Klasse VIII:** 207031, 207032; **Klasse VIII:** 207031, 207032; **Klasse IX:** 200616, 207924; **Klasse X:** 402592; **Klasse XI:** 201630.

6.3. Selektion der Leitstrukturen

Von den 149 Primärhits waren bereits 44 bei der IC₅₀-Validierung ausgeschlossen worden und weitere 71 Verbindungen wurden als „frequent hitter“ und/oder reaktiv identifiziert. Von den 34 verbliebenen Testverbindungen zeigten fünf eine starke Autofluoreszenz und wurden von der Leitstruktureselektion ausgeschlossen. Deren Autofluoreszenz war erst bei den höheren Compoundkonzentrationen (50 μ M) der Validierung störend. Als weiteres Selektionskriterium wurde nun eine Reinheit $\geq 80\%$ festgelegt, die von 26 Verbindungen erreicht wurde. Zuletzt wurde eine pragmatische Untergrenze von 75% für die Aktivität der verbliebenen 26 Verbindungen festgelegt, die von 11 Testverbindungen (Abbildung 6.5) erreicht wurden. Durch Abgleich mit der „PubChem Substance Database“ wurde überprüft, ob die Verbindungen bereits in anderen Screens als Hits dokumentiert wurden. Für vier der 11 Testsubstanzen lagen Daten über die Häufigkeit als Hits in Screens vor: ID 103279 (0/13), ID 201300 (1/9), ID 206290 (0/6), ID 212607 (12/246) und ID 301033 (1/14). Die Gesamtzahl der Assays für eine Beurteilung ist nur für Compound 212607 ausreichend. Sie zeigte in 5% der Bioassays Aktivität und ist vermutlich ein weiterer „frequent hitter“.

Unter der Annahme, dass die 11 Testverbindungen kompetitive Inhibitoren der FP-Sondenbindung sind, wurden aus den IC₅₀-Werten nach der Methode von COLESKA und WANG^[202] (Kapitel 5.4.1) deren K_i -Werte berechnet, um sie mit der Inhibitionskonstante von **I**-CDP ($K_i = 32.83 \mu$ M) zu vergleichen. Die selektierten Verbindungen waren mit $K_i = 1.1\text{--}11.3 \mu$ M deutlich affiner als **I**-CDP, erreichten aber nicht den nanomolaren Affinitätsbereich wie die übergangszustandsanalogen Inhibitoren (Tabelle 6.4).

6.4. Ergebnisse des Screenings

Mit dem HT-FP-Assay wurden mit der Screening-Unit der FMP-Berlin in einem Hochdurchsatz-Screen 28.864 Testverbindungen (bei $c = 10 \mu$ M) gegen die rST3Gal II innerhalb eines Arbeitstages getestet. Der Durchsatz war gerätebedingt auf 12 Platten/h begrenzt, was mit 100.000 Compounds/24 h bereits uHTS-Durchsatz⁶ entspricht. Der Assay erwies sich mit Z_r' -Werten zwischen 0.93 und 0.98 als äußerst robust und zeigte ein stabiles Assaysignal über die Gesamtdauer des Screens. Bei der Hit-Selektion für die

⁶uHTS > 100.000 Compounds/Tag

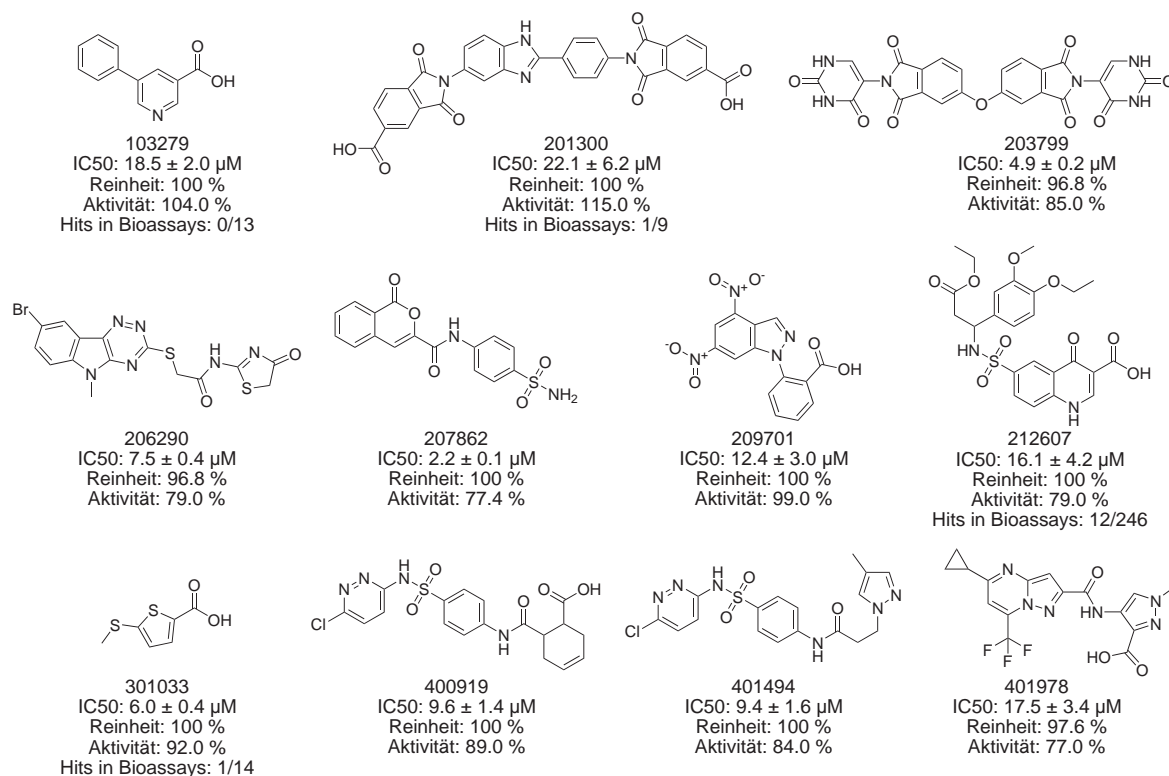


Abb. 6.5.: Die potentiellen Leitstrukturen.

Tab. 6.4.: Daten der potentiellen Leitstrukturen.

Compound	IC50 [μM] ^a	K _i [μM] ^{a,b}	K _i relativ zu CDP ^c	Reinheit ^d	Aktivität
103279	18.5 ± 2.0	9.5 ± 1.0	3.5	100.0 %	104.0 %
201300	22.1 ± 6.2	11.3 ± 3.2	2.9	100.0 %	115.0 %
203799	4.9 ± 0.2	2.5 ± 0.1	13.1	96.8 %	85.0 %
206290	7.5 ± 0.4	3.8 ± 0.2	8.6	96.8 %	79.0 %
207862	2.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	29.8	100.0 %	77.4 %
209701	12.4 ± 3.0	6.4 ± 1.5	5.1	100.0 %	99.0 %
212607 ^e	16.1 ± 4.2	8.2 ± 2.1	4.0	100.0 %	79.0 %
301033	6.0 ± 0.4	3.1 ± 0.2	10.6	100.0 %	92.0 %
400919	9.6 ± 1.4	4.9 ± 0.7	6.7	100.0 %	89.0 %
401494	9.4 ± 1.6	4.8 ± 0.8	6.8	100.0 %	84.0 %
401978	17.5 ± 3.4	9.0 ± 1.7	3.6	97.6 %	77.0 %

^a± 2 Standardfehler ^bBerechnet nach COLESKA–WANG; ^cK_i/K_i(CDP) mit K_i(CDP) = 32.83 μM; ^dUV bei 254 nm; ^evermutl. „frequent hitter“.

Validierung wurden 556 Substanzen (1.9 %) identifiziert, die aufgrund von Autofluoreszenz mit dem Assay interferierten. Von den verbliebenen Testverbindungen wurden 149 Verbindungen als Primärhits ausgewählt, die einen z_r -score < -3 und eine Aktivität von $> 10\%$ aufwiesen.

Die Hit-Validierung umfasste die IC₅₀-Bestimmung mit HT-Durchsatz und die LC/MS-Qualitätskontrolle für alle Testverbindungen. Anhand der chemischen Strukturen wurden zahlreiche Verbindungen als proteinreaktiv und/oder „frequent hitter“ identifiziert. Es verblieben 11 Testverbindungen, die eine Aktivität $> 75\%$ und eine Reinheit $> 80\%$ aufwiesen und nicht fluoreszent waren. Unter der Annahme, dass sie kompetitive Inhibitoren der rST3Gal II sind, wurden ihre K_i -Werte berechnet. Sie haben alle größere Inhibitionspotenzen als Cytidindiphosphat, erreichen aber nicht die nanomolaren Affinitäten der übergangszustandsanalogen Inhibitoren (Abbildung 6.6).

Die potentiellen Leitstrukturen bedürfen einer weitergehenden Charakterisierung in einem sekundären Assaysystem und einer Analyse möglicher unerkannter Proteinreaktivitäten.

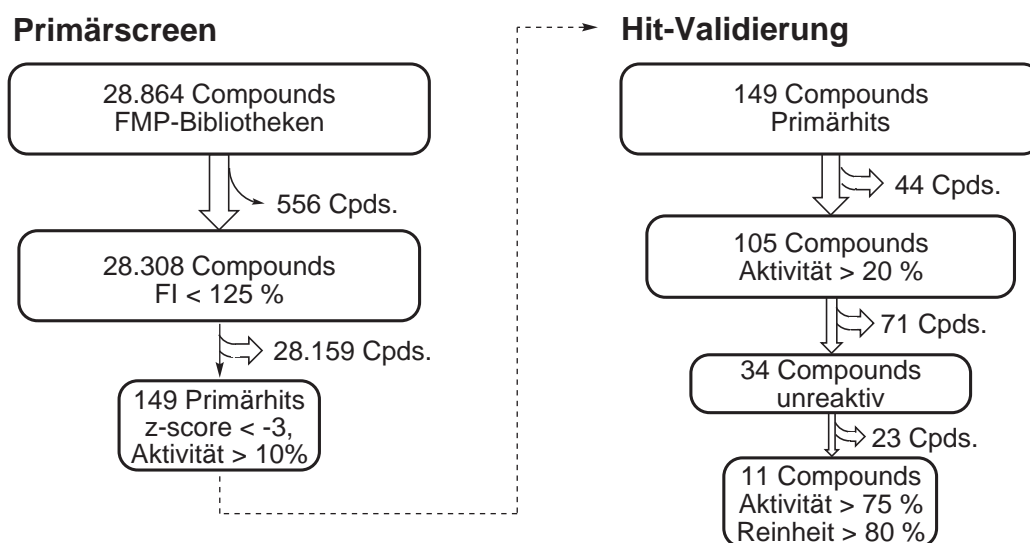


Abb. 6.6.: Ergebnis des Primärscreens und der Hit-Validierung.

7. Entwicklung von Photomarkierern für Sialyltransferasen

Bei verschiedenen Tumorarten wurde eine Korrelation zwischen einer erhöhten Expression von Sialyltransferasen und einer schlechten Prognose für Patienten festgestellt. Ein direkter Nachweis der Sialyltransferaseexpression über die Analyse des Proteoms ist bislang nicht möglich. Durch Entwicklung eines Photomarkierers für Sialyltransferasen sollte ein chemisches Werkzeug dargestellt werden, welches die selektive Markierung von Sialyltransferasen in einem komplexen Proteom ermöglicht.

7.1. Design der Photomarkierer

Die Entwicklung der Photoaffinitätssonden (PAL-Sonde – *photoaffinity labeling probe*) erfolgte auf der Basis der hochaffinen und reversibel bindenden FP-Sonden (siehe Kapitel 4), indem die Struktur um eine photoreaktive Gruppe ergänzt wurde.

7.1.1. Selektion der photoreaktiven Gruppe

Die Größe der photoreaktiven Gruppe musste nicht berücksichtigt werden, da die Sialyltransferasen rST3Gal II, hST6Gal I, Pd2,6ST(N) und PmST1 bereits das voluminöse Fluoresceinmolekül als Modifikation der Inhibitoren tolerierten. Daher konnte das große Benzophenon (BP) verwendet werden, dessen angeregter Zustand reversibel und unreaktiv gegenüber Wasser ist und durch multiple Anregungs- und Relaxationszyklen hohe Markierungsausbeuten ermöglicht. Verschiedene funktionalisierte Derivate des BP sind kommerziell erhältlich, so z.B. unterschiedlich geschützte Formen des 4-Benzoylphenylalaninbausteins (Bpa).

7.1.1.1. Photochemie von Benzophenon

Die Absorption eines Photons durch BP bei ~ 350 nm bewirkt die Anregung eines Elektrons eines nichtbindenden sp^2 -ähnlichen n-Orbitals in ein antibindendes π^* -Orbital der Carbonylgruppe. Die Lebensdauer des angeregten Zustands mit zwei ungepaarten Elektronen im Triplettzustand liegt zwischen 80–120 μ s, dann relaxiert es zum Grundzustand und kann erneut angeregt werden. Im Triplettzustand des Diradikals ist das n-Orbital des elektronenarmen Sauerstoffs elektrophil und reagiert mit schwachen C–H σ -Bindungen. Unter Abspaltung eines H-Atoms wird das halbgefüllte n-Orbital des Sauerstoffs gefüllt. Die gebildeten Ketyl- und Alkylradikale rekombinieren durch C–C-Bindungsbildung miteinander und bilden pinacolähnliche Photocrosslinkingprodukte (Abbildung 7.1 A) [167].

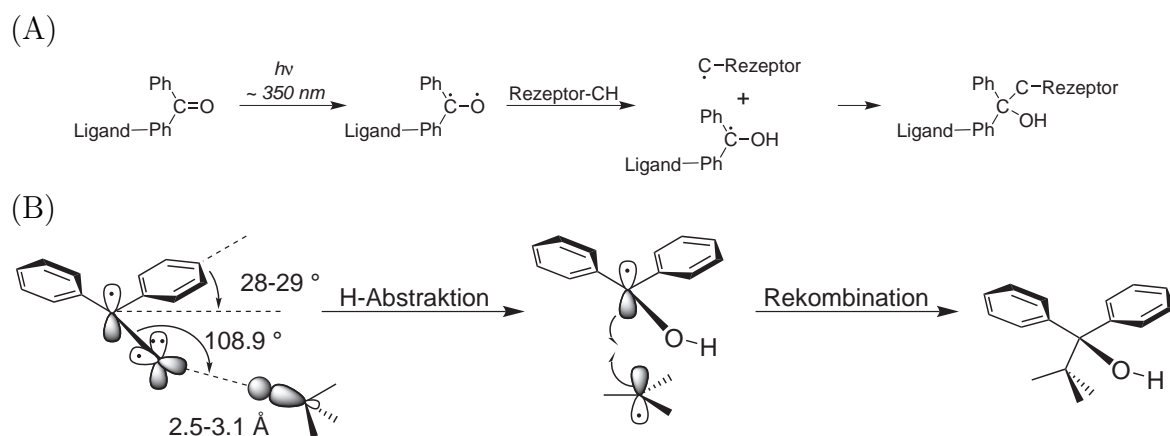


Abb. 7.1.: Benzophenon: (A) Ablauf und (B) geometrische Kontrolle der CH-Insertion [167].

Durch stereoelektronische Faktoren der Molekülorbitale werden bestimmte Winkel und Ebenen bei dem elektrophilen Angriff des Radikals bevorzugt (Abbildung 7.1 B). Die Konformation des Moleküls im $n-\pi^*$ Triplettzustand ist nahezu planar. Das halbgefüllte n-Orbital liegt in dieser Ebene, während das π^* -Orbital senkrecht dazu orientiert ist. *Ab initio* Berechnungen für ein idealisiertes Übergangszustandsmodell zeigen, dass bei der H-Abstraktion die Carbonyl C–O- und die C–H-Bindungen nahezu kollinear angeordnet sind. Die Radikalrekombination birgt eine weitere Stereokontrolle, bei der die p-Orbitale für eine maximale Überlappung kollinear sein müssen. Durch die zwei möglichen Angriffsseiten entstehen racemische oder diastereomere Mischungen der Rekombinationsprodukte [167].

Mit einem Linker zwischen dem bindenden Liganden und BP kann dessen Flexibilität und damit die Wahrscheinlichkeit einer photochemischen Bindungsknüpfung erhöht

werden. Umgekehrt erhöht eine rigide Konformation die regionale Spezifität der Photoreaktion.

7.1.2. Struktur des Photoaffinitätsmarkers

Der Aufbau der PAL-Sonden erfolgte analog zum Design der diastereomerreinen FP-Sonden (Kapitel 4.3), wobei auf die Kontrolle der Stereochemie des α -Hydroxymethylphosphonats verzichtet wurde. Das Fluorescein wurde als Label beibehalten und diente bei den Photomarkierungsexperimenten als Reportergruppe. Außerdem ermöglichte es die Bestimmung der Affinitäten der PAL-Sonden zu den Sialyltransferasen in FP-Bindungsassays. Zwischen den Liganden und das Fluorophor wurde das kommerziell erhältliche 4-Benzoylphenylalanin eingebaut, dessen L- oder D-Isomere zur räumlichen Diversität der Strukturen führten. Es wurde eine PAL-Sonde mit γ -Aminobuttersäure (GABA) als Linker zwischen Ligand und Bpa hergestellt (Abbildung 7.2). Für die Kontrollreaktionen der Photomarkierung wurden die entsprechenden Addukte aus Fluorescein, Bpa und GABA hergestellt, denen der Inhibitorteil fehlte. Die PAL-Sonden wurden entsprechend ihres Aufbaus mit den Bezeichnungen **L-PAL**, **D-PAL** und **GABA-L-PAL** und die Kontrollverbindungen mit **Flu-L-Bpa**, **Flu-D-Bpa** und **Flu-L-Bpa-GABA** benannt.

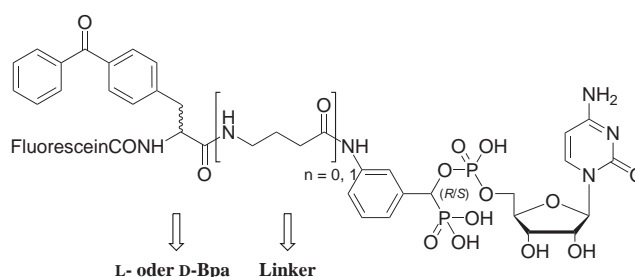


Abb. 7.2.: Design der PAL-Sonden.

7.2. Synthese der Photoaffinitätsmarker

7.2.1. Syntheseplan

Die Darstellung der PAL-Sonden erfolgte nach der Synthesemethode, die für die Darstellung der diastereomerreinen FP-Sonden entwickelt wurde (Kapitel 4.3). Abweichend

von dieser Route wurde das racemische Nitrophosphonat **14-m** verwendet, so dass alle PAL-Sonden **27** als *R/S*-Diastereomeren-Mischungen erhalten wurden. Die Darstellung der Benzoylphenylalanin-Fluorescein-Bausteine **25** erfolgte konvergent zum Anilin **15-m** (Abbildung 7.3). Die Bausteine **25** wurden außerdem entschützt, um sie bei den Photomarkierungsexperimenten als Kontrollverbindungen einsetzen zu können.

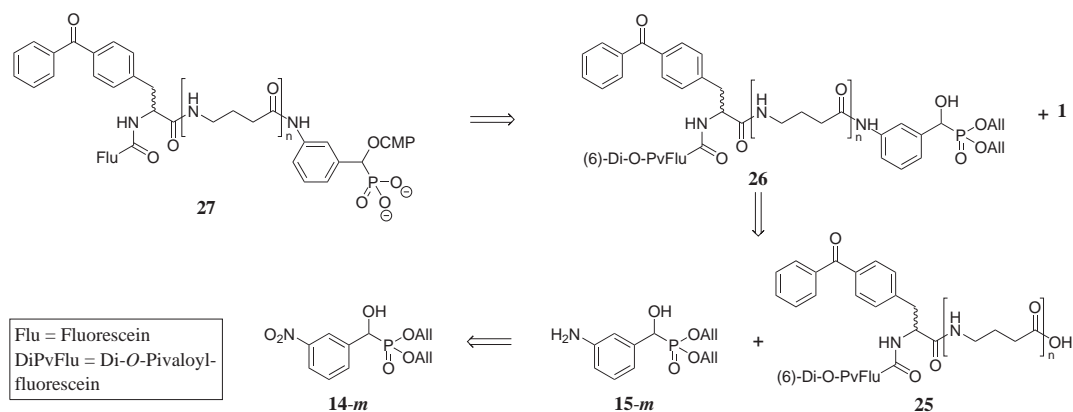


Abb. 7.3.: Synthesepfad zur Darstellung 4-Benzoylphenylalanin-modifizierter PAL-Sonden.

7.2.2. Darstellung der Benzoylphenylalanin-Fluorescein-Bausteine

Die Bausteine L- und D-**25** wurden durch die Reaktion des Hydroxysuccinimidylesters **2-(6)-OSu** mit den ungeschützten Aminosäurederivaten L- und D-4-Benzoylphenylalanin (L-Bpa und D-Bpa) in Lösung dargestellt (Abbildung 7.4).

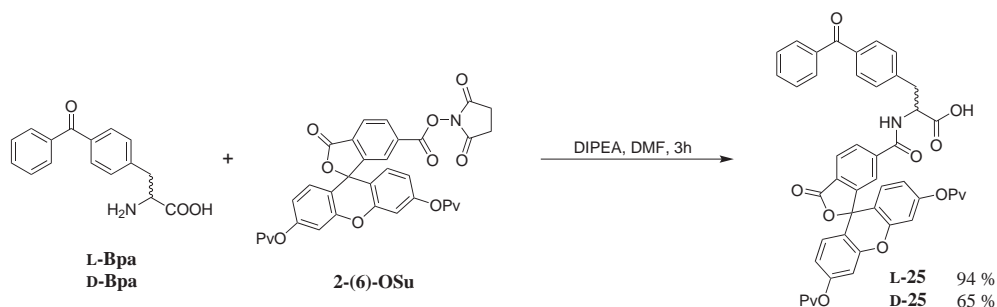


Abb. 7.4.: Kupplung von L- und D-Bpa mit dem OSu-Ester (**2-(6)-OSu**) von Di-*O*-Pivaloylcarboxyfluorescein.

Die Darstellung von L-**25-GABA** beinhaltete zwei Amidbindungsknüpfungen und wurde auf der festen Phase durchgeführt, so dass die Reinigungsschritte nach den Kupp-

lungen entfielen. Als Linkersystem wurde 2-Chlortritylchlorid-funktionalisiertes Polystyrolharz verwendet, auf das im ersten Schritt Fmoc- γ -Aminobuttersäure immobilisiert wurde. Die verbliebenen Funktionalitäten wurden mit Methanol gecappt und die Beladung des getrockneten Harzes **26** durch spektroskopische Quantifizierung des Dibenzofulvens bestimmt, dass bei der Behandlung eines Aliquots des Harzes **26** mit Piperidin in DMF entstand. In zwei Zyklen, bestehend aus Fmoc-Entschützung mit Piperidin/DMF und Kupplung mit Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), wurde erst Fmoc-L-Bpa und dann 6-Di-*O*-Pivaloylcarboxyfluorescein (**2-(6)**) eingeführt. Die Abspaltung des Bausteins L-**25-GABA** vom Harz erfolgte in schwach saurer Lösung mit 1 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan. Bezogen auf die initiale Beladung des Harzes wurde L-**25-GABA** in 95 % Ausbeute erhalten (Abbildung 7.5).

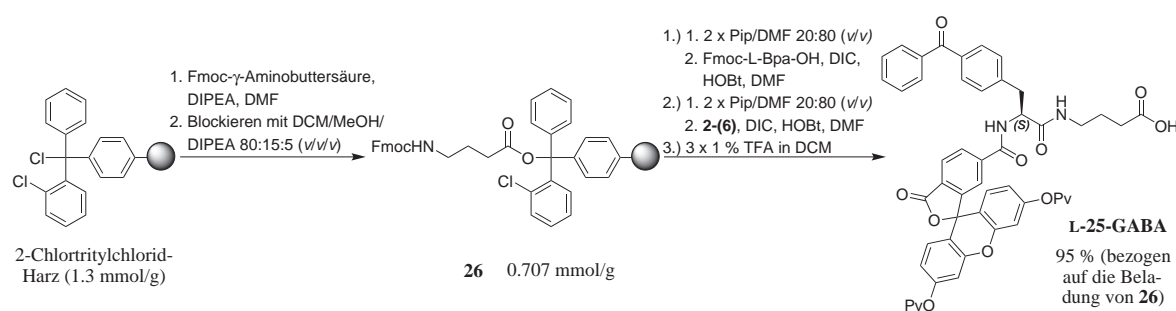


Abb. 7.5.: Darstellung des Fluorescein-L-Bpa- γ -Aminobuttersäure-Bausteins (L-**25-GABA**) auf der festen Phase.

7.2.3. Kupplung der Bpa-Fluorescein-Bausteine mit dem α -Hydroxymethylphosphonat

Die Reduktion des racemischen Nitroaryls **14-m** mit Zinn(II)chlorid zum Anilin **15-m** erfolgte nunmehr im Mikrowellenreaktor bei 60 °C, was eine Reduzierung der Reaktionszeit von mehreren Tagen bei Raumtemperatur auf unter zwei Stunden ermöglichte. Bei der Aktivierung von L- und D-**25** mit EDC-HCl und der Kupplung mit dem frisch dargestellten Anilin **15-m** wurden Nebenreaktionen beobachtet, unter anderem vermutlich die Bildung des Azlactons von L- und D-**25** (LC/MS-Analyse). Die *in situ* Überführung der carbodiimidaktivierten Carbonsäuren in einen Aktivester durch Zugabe von 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) vermied die Nebenreaktionen und die Verbindungen L-**26**, D-**26** und L-**26-GABA** wurden in guten Ausbeuten (55–77 %) als Mischung der *R*- und *S*-Diastereomere erhalten (Abbildung 7.6).

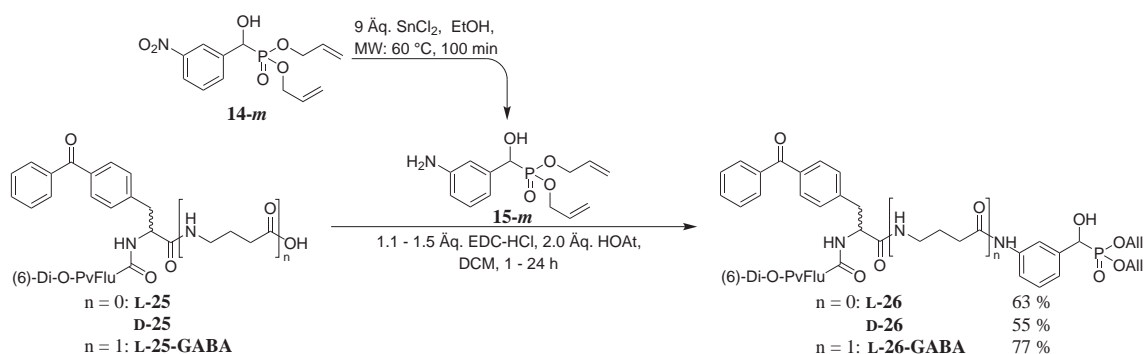


Abb. 7.6.: Kupplung der Fluorescein-Bpa-Bausteine mit dem α -Hydroxymethylphosphonat **15-m**.

7.2.4. Phosphoramiditkupplung und Entschützung zu den PAL-Sonden

In den letzten Stufen zur Darstellung der PAL-Sonden wurden die α -Hydroxymethylphosphonate **L-26**, **D-26** und **L-26-GABA** mit dem Cytidinphosphoramidit **1** gekuppelt und anschließend mit Pd(PPh₃)₄ und K₂CO₃ entschützt, wie bei der Darstellung der diastereomerreinen FP-Sonden beschrieben (Kapitel 4.3.5). Die Produkte **L-27**, **D-27** und **L-27-GABA** wurden in geringen bis mäßigen Ausbeuten erhalten (14–56 %).

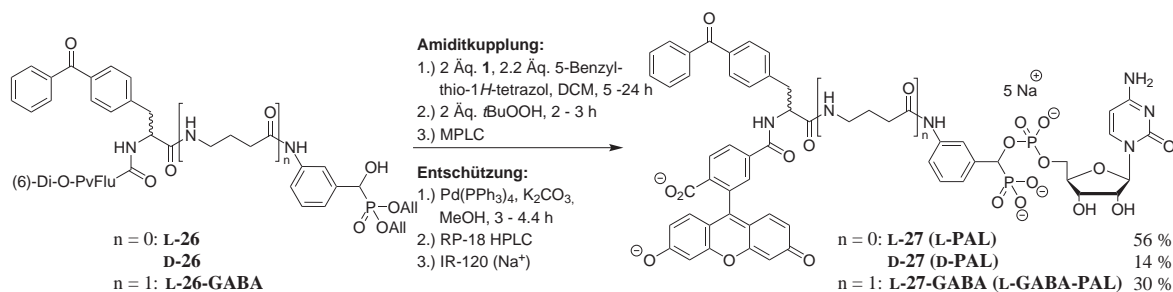


Abb. 7.7.: Phosphoramiditkupplung und Entschützungsreaktion.

Die PAL-Sonden **L-27** und **D-27** zeigten im ¹H-NMR große Linienbreiten. Möglicherweise bildeten sie durch die Kombination der unpolaren BP-Gruppe mit dem geladenen Inhibitor und Carboxyfluorescein in Lösung Addukte. Die Signalauflösung von **L-27** und **D-27** konnte durch Erhöhung der Temperatur von 300 auf 330–340 K bei der Messung verbessert werden. Die PAL-Sonde **L-27-GABA** dagegen zeigte bereits bei 300 K ein Spektrum mit gewöhnlicher Linienbreite. Die ¹H-Messungen erfolgten dennoch bei 315 K, da das Signal des α -Protons von L-Bpa andernfalls durch das HDO-Restsignal

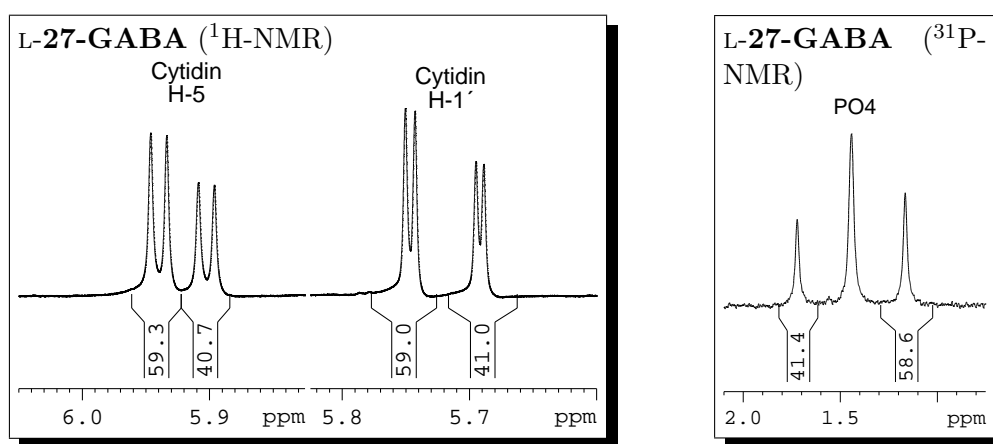


Abb. 7.8.: Ausschnitte aus den ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren des PAL-Sonde L-27-GABA. Im ^{31}P -NMR-Spektrum überlagern sich die Dubletts der beiden Diastereomere (^1H : 600 MHz, ^{31}P : 122 MHz, D_2O)

verdeckt wurde. Die Integration der H-5 und H-1'-Signale ergab für L-27-GABA unerwarteterweise ein Diastereomerenverhältnis von 59:41, obgleich für die Darstellung von L-26-GABA das racemische α -Hydroxymethylphosphonat **15-m** eingesetzt wurde und auch das $^1\text{H-NMR}$ von L-26-GABA ein 1:1 Verhältnis der Diastereomere zeigte. Folglich musste bei der Phosphoramiditkupplung, der Entschützung oder den Aufreinigungsschritten eine Diastereomeren-Trennung stattgefunden haben. Bei den diastereomerrein dargestellten FP-Sonden wurde beobachtet, dass das hochfeldverschobene H-1'-Signal (*R*-Isomer) eine kleinere Kopplungskonstante aufweist, als das im Tieffeld erscheinende Signal (*S*-Isomer). Auch bei L-27-GABA hatte das hochfeldverschobene H-1'-Signal die kleinere Kopplungskonstante ($\delta = 5.75$ ppm: $J = 4.6$ Hz; $\delta = 5.69$ ppm: $J = 3.8$ Hz). Vermutlich lag also (*S*)-L-27-GABA gegenüber (*R*)-L-27-GABA im leichten Überschuss vor.

7.2.5. Synthese der Kontrollverbindungen

Die Darstellung der Kontrollverbindung **D-29** erfolgte in Lösung durch Entschützung des pivaloylgeschützten Fluorescein-Bpa-Adduktes **D-25** mit K_2CO_3 in Methanol. Die Kontrollverbindungen **L-29** und **L-29-GABA** wurden über eine festphasenunterstützte Syntheseroute dargestellt. Die Pivaloylentschützung erfolgte mit Natriummethanolat und die fertigen Kontrollverbindungen **L-29** und **L-29-GABA** wurden nach Abspaltung vom Harz und einer HPLC-Reinigung erhalten (Ausbeuten 37–79%).

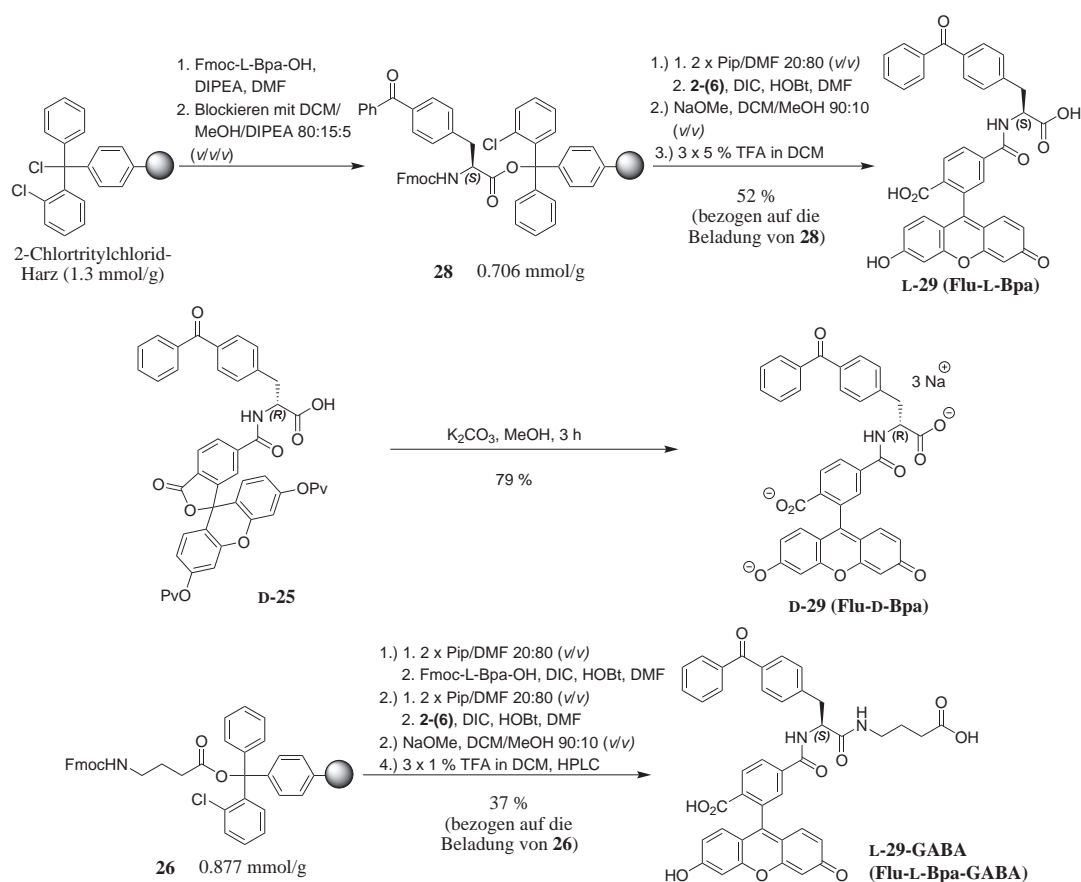


Abb. 7.9.: Synthese der Kontrollverbindungen für die Photomarkierungsexperimente.

7.3. FP-Bindungsassay der PAL-Sonden

Die Verwendung der Reportergruppe Fluorescein ermöglichte es, mit FP-Bindungsassays den Effekt der Bpa-Gruppe auf die Bindung der PAL-Sonden zu den Sialyltransferasen zu untersuchen. Die Assaydurchführung und -auswertung erfolgte wie in Kapitel 5.3 beschrieben.

Im ungebundenen Zustand waren die Anisotropien von L- und D-PAL (~80 mA) etwa 3mal und von L-GABA-PAL (~57 mA) etwa 2mal so hoch wie die Anisotropien der ungebundenen FP-Sonde **mG6**. Dies lässt sich nicht mit dem Größenunterschied der PAL zu den FP-Sonden erklären, zumal die größte PAL-Sonde (L-GABA-PAL) die kleinere Anisotropie aufwies. Bereits bei der 1H -NMR-Charakterisierung wurde eine große Linienbreite beobachtet, die auf mögliche Aggregate der PAL-Sonden zurückgeführt wurde. Entsprechend höhere Rotationskorrelationszeiten könnten hohe Anisotropien der ungebundenen PAL-Sonden erklären.

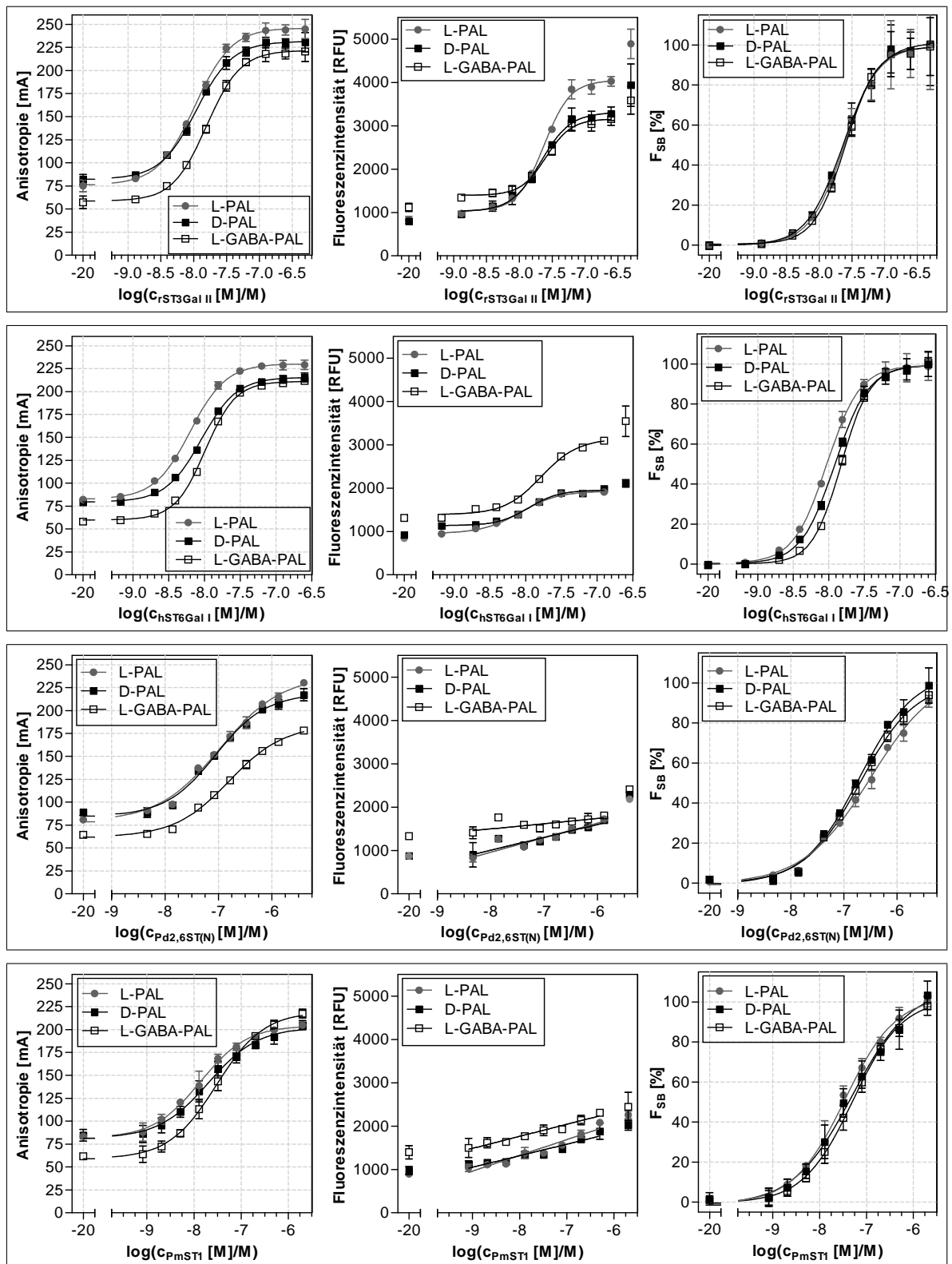


Abb. 7.10.: Die PAL-Sonden im direkten FP-Bindungsassay (rST3Gal II: $c = 0-0.5 \mu\text{M}$; hST6Gal I: $c = 0-0.25 \mu\text{M}$; Pd2,6ST(N): $c = 0-4.0 \mu\text{M}$; PmST1 $c = 0-2.0 \mu\text{M}$); Assaybedingungen: 50 mM Cacodylatpuffer (pH 7.4), 0.1 % Triton X-100, PAL-Sondenkonzentrationen: 10 nM.

Tab. 7.1.: Die PAL-Sonden im direkten FP-Assay mit den kommerziell erhältlichen Sialyltransferasen.

	PAL-Sonde	$EC50_{F_{SB}}$ [nM] ^a	$EC50_{A_{Obs}}$ [nM] ^a	ΔA [mA] ^a	Q	$\frac{[L_T]}{2 \times EC50}$ ^b
rST3	L-PAL	24.0 ± 3.0	10.4 ± 0.5	169.7 ± 4.4	3.92	0.21
	D-PAL	23.4 ± 2.7	11.0 ± 0.5	149.1 ± 4.2	3.24	0.21
	L-GABA-PAL	25.1 ± 1.9	15.8 ± 0.7	163.1 ± 4.4	2.26	0.20
hST6	L-PAL	9.4 ± 0.6	6.3 ± 0.2	147.4 ± 3.5	2.03	0.53
	D-PAL	12.2 ± 0.7	9.0 ± 0.4	135.9 ± 3.5	1.73	0.41
	L-GABA-PAL	14.9 ± 0.4	10.2 ± 0.2	151.2 ± 2.1	2.26	0.34
PdST	L-PAL	321.9 ± 86.4	106.5 ± 16.1	159.4 ± 9.5	1.98	0.02
	D-PAL	195.4 ± 40.1	88.6 ± 11.8	133.7 ± 8.1	1.80	0.03
	L-GABA-PAL	203.3 ± 22.4	159.2 ± 16.4	122.4 ± 5.6	1.20	0.02
PmST1	L-PAL	34.3 ± 4.9	13.6 ± 1.9	123.1 ± 6.5	2.09	0.15
	D-PAL	49.3 ± 12.9	20.1 ± 3.7	121.3 ± 8.3	1.72	0.10
	L-GABA-PAL	50.8 ± 24.8	29.7 ± 3.1	160.4 ± 6.7	1.53	0.10

^a ± Standardfehler; ^b $[L_T] = 10$ nM.

Bei der Bindung an die Säugetiersialyltransferasen erreichten die PAL-Sonden Anisotropien, wie sie auch für die **mG6** FP-Sonde gemessen wurden und sie zeigten eine starke Zunahme der Fluoreszenzintensitäten ($Q = 1.73$ – 3.92). Die maximalen Anisotropien der PAL-Sonden bei den bakteriellen Sialyltransferasen waren größer als für **mG6** und ihre Quantenausbeute nahm mäßig bis stark zu (Abbildung 7.10).

Die Affinitäten der PAL-Sonden zu den Sialyltransferasen (Tabelle 8.2) entsprechen denen der analogen FP-Sonde **mG6**. Die voluminöse Benzophenonsubstitution hatte also keinen sterisch störenden Einfluss bei der Bindung.

7.4. Photomarkierungsexperimente

Die Modifikation der FP-Sonden mit der Bpa-Gruppe hatte keinen negativen Einfluss auf die Bindungscharakteristika, so dass auch die PAL-Sonden hochaffine Liganden der Sialyltransferasen waren. Damit lagen optimale Voraussetzungen für eine affinitätsbasierte und selektive Photomarkierung vor. Die Eigenschaften der PAL-Sonden bei Bestrahlung sollten zunächst mit den kommerziell verfügbaren und gereinigten Sialyltransferasen bestimmt werden. Mit unterschiedlichen Kontrollreaktionen sollte untersucht werden, ob die Photomarkierung affinitätsbasiert ist. Anschließend wurden Bestrahlungsexperimente mit Vollängen-Sialyltransferasen in einem komplexen Proteom durchgeführt.

Die vollständigen Gelbilder sind im Anhang ab Seite 280 aufgeführt.

7.4.1. Durchführung der Bestrahlungsexperimente

Die Photomarkierungsexperimente umfassten mehrere Stufen. Zuerst erfolgte die Bestrahlung der Proben mit UV-Licht, anschließend wurden die Proben per Gelelektrophorese gereinigt und zuletzt wurde ein Fluoreszenzbild des Gels aufgenommen (Abbildung 7.11). Die Integrität der Proteine wurde anschließend mit einer Coomassiefärbung überprüft. Die Fluoreszenzbilder wurden sowohl qualitativ betrachtet, als auch quantitativ ausgewertet, indem die Fluoreszenzintensitäten der Banden bestimmt wurden.



Abb. 7.11.: Ablauf der Photomarkierungsexperimente: Bestrahlung der Reaktionslösungen in einer Mikrotiterplatte mit transparentem Boden mit UV-A Licht, Reinigung der Reaktionsprodukte mit Gelelektrophorese und Dokumentation der Fluoreszenz in den Gelen mit einem Imager.

Bestrahlungsreaktion

Optimale Bestrahlungsbedingungen wurden mit einem Modellsystem¹ gefunden, indem dieses – vorgelegt auf 384-well Mikrotiterplatten mit transparentem Boden – mit einem Transilluminator von unten bestrahlt wurde. Dadurch wurden lange Bestrahlungszeiten ermöglicht, da die Platten mit Folie versiegelt werden konnten, um so die Evaporation der Lösung zu unterbinden. Durch Verwendung von „low-volume“ 384well Mikrotiterplatten konnte der Bestrahlungsassay auf ein Arbeitsvolumen im niedrigen μL -Bereich miniaturisiert werden, so dass die Beladungskapazität der Elektrophorese Gele ($<15 \mu\text{L}$) optimal genutzt werden konnte. Die Bestrahlungsleistung wurde über die Zeit reproduziert, da der Transilluminator über keinen Photosensor zur Messung der emittierten Lichtleistung verfügte. Die Bestrahlung der PAL-Sonden mit den Sialyltransferasen wurde in dem Cacodylat Puffer (50 mM, pH = 7.4, 0.1 % Triton X-100) durchgeführt.

Gelelektrophorese

Nach der Bestrahlung wurden die Proben durch Zugabe von Probenbeladungspuffer und durch Erhitzen denaturiert und über eine Gelelektrophorese von den unreaktierten PAL-Sonden getrennt. Die kleinen und im basischen mehrfach negativ geladenen PAL-Sonden, wanderten schnell durch das SDS-Gel und wurden so von den markierten und unmarkierten Proteinen abgetrennt. Es wurden Fertiggradientengele verwendet, mit denen sich die Experimente besser reproduzieren ließen, als mit selbst hergestellten Gelen.

Geldokumentation

Direkt nach der Elektrophorese wurden die Gele mit einem Bioimager (LAS-4000[®] Imager, *Fujifilm*) fotografiert. Für die Fluoreszenzdetektion wurden sie von einem Transilluminator ($\sim 312 \text{ nm}$) beleuchtet und von oben mit einer Peltierelement-gekühlten ($-30 \text{ }^\circ\text{C}$) CCD Kamera fotografiert. Mit einem 520 nm Filter wurde die Emissionswellenlänge von Fluorescein selektiert. Die Bilder wurden für die Darstellung invertiert, so dass dunkle Banden Fluoreszenz entsprechen. Nur für die Darstellung sehr schwacher Banden wurde gegebenenfalls der Kontrast linear erhöht (dies wird bei den Bildern angegeben).

¹Im Modellsystem wurde die photoinduzierte (360 nm) Dimerisierung von 4-Carboxybenzophenon in Isopropanol^[256] per LC/MS-Analyse verfolgt.

Coomassiefärbung

Zur Kontrolle der Integritäten der Sialyltransferasen während der Bestrahlungsexperimente wurden die Gele mit Coomassie gefärbt. Die Gele wurden ebenfalls mit dem LAS-4000 fotografiert, indem ein Dia-Durchlichteinsatz verwendet wurde. Die Bilder werden als Positiv abgebildet, so dass dunkle Banden coomassiegefärbten Proteinen entsprechen.

Fluoreszenzquantifizierung

Mit der Software Multi-Gauge (*Fujifilm*) wurden die Fluoreszenzbandenintensitäten nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz quantifiziert. Unter der Annahme, dass kein Quenchen der Fluoreszenz gegeben war, wurden die Fluoreszenzintensitäten als proportional zur Markierungsausbeute betrachtet.

7.4.2. Photomarkierung gereinigter Sialyltransferasen

Mit den löslichen und aufgereinigten Transferasen (rST3Gal II, hST6Gal I, Pd2,6ST(N) und PmST1; Tabelle 5.2) wurden die Photomarkierungseigenschaften der PAL-Sonden untersucht. Dazu wurden zunächst die relativen Photomarkierungseffizienzen der Photomarkierer **L-PAL**, **D-PAL**, und **L-GABA-PAL** untereinander und mit denen der Kontrollverbindungen **Flu-L-Bpa**, **Flu-D-Bpa** und **Flu-L-Bpa-GABA** verglichen. Dadurch konnte gezeigt werden, ob die Photomarkierung affinitätsbasiert war. Mit unterschiedlichen Denaturierungsmethoden und Inhibitoren wurde darüber hinaus die Spezifität der Photomarkierung analysiert.

7.4.2.1. Effizienzen und Ausbeuten der Photomarkierung

Um die relativen Photomarkierungseffizienzen der drei PAL-Sonden miteinander vergleichen zu können, wurden diese für die Bestrahlungsreaktion bei sechs unterschiedlichen Konzentrationen zu der jeweiligen Sialyltransferase titriert. Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten aus zwei Doppelbestimmungen wurden gegen den Logarithmus der Enzymkonzentration aufgetragen und die sigmoidal verlaufenden Messwerte mit einer 3-Parameter logistischen nicht-linearen Regression genähert (der Parameter für das Minimum der Regression wurde auf 0 AU gesetzt) (Abbildung 7.12).

Der EC50 der Photomarkierung ($EC_{50_{PAL}}$) ist als der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve definiert und hängt maßgeblich von der Affinität der PAL-Sonden zum Rezeptor ab. Die PAL-Sonden zeigten bei ihren $EC_{50_{PAL}}$ -Werten keine großen Unterschiede, wie

es aufgrund ihrer ähnlichen Affinitäten, die in den FP-Assays bestimmt wurden, zu erwarten war. Nur bei der hST6Gal I zeigte **D-PAL** eine deutlich geringere Effizienz als **L-PAL** und **L-GABA-PAL**.

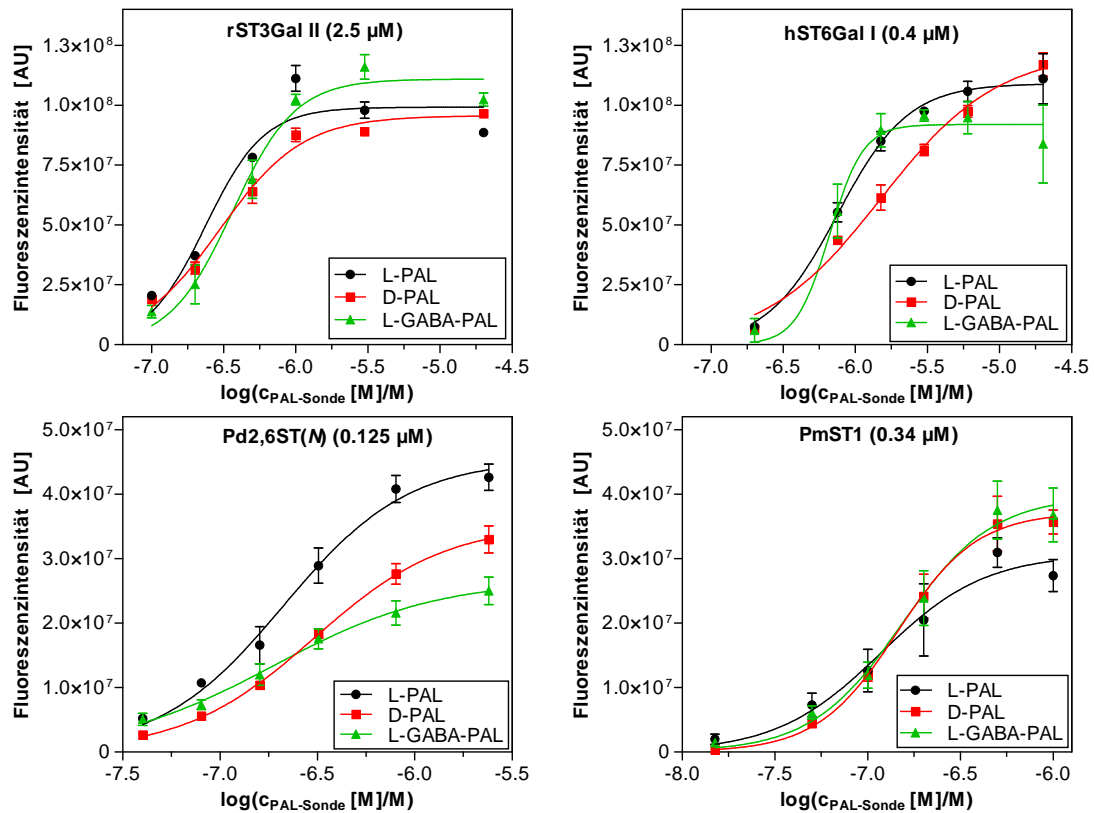
Die Ausbeute wird von der Reaktionsgeschwindigkeit der photoinduzierten Bindungsinsertion durch das Biradikal von Benzophenon beeinflusst. Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt von der räumlichen Anordnung der Benzophenongruppe der PAL-Sonden im Komplex mit dem Rezeptor ab und ist umso schneller, je höher die Wahrscheinlichkeit einer Bindungsinsertion ist. Daher können die Derivate der PAL-Sonde trotz ähnlicher Affinitäten unterschiedliche Photomarkierungsausbeuten aufweisen. Bei der rST3Gal II und der PmST1 waren die Photomarkierungsausbeuten der drei PAL-Sonden jeweils ähnlich. Als Maß für die Ausbeute wurden die Werte der Maximum-Asymptote der nicht-linearen Regressionen herangezogen und miteinander verglichen. Gegenüber der hST6Gal I erreichte auch **D-PAL** die Photomarkierungsausbeuten der beiden anderen PAL-Sonden, aber aufgrund der geringeren Photomarkierungseffizienz erst bei einer höheren Konzentration. Bei der Pd2,6ST(N) waren die Photomarkierungsausbeuten der PAL-Sonden sehr unterschiedlich. Die hohe Flexibilität des Bpa-Rests von **L-GABA-PAL** schien sich negativ auf die Geschwindigkeit der Photoinsertion auszuwirken. Im Vergleich zeigte **L-PAL** eine 1.7mal so hohe Photomarkierungsausbeute und die Steigung der sigmoidalen Kurve war größer. **D-PAL** lag mit seinen Parametern zwischen den beiden PAL-Sonden (Tabelle 7.2). Für die rST3Gal II mit **L-PAL** und **L-GABA-PAL** sowie für die hST6Gal I mit **L-GABA-PAL** zeigte die Quantifizierung als auch die qualitative Betrachtung der Fluoreszenzbilder, dass die Intensität der Fluoreszenzbanden bei den höchsten Konzentrationen wieder etwas abnimmt. Die optimalen Konzentrationen, um eine maximale Markierung zu erreichen, lagen für die

Tab. 7.2.: Photomarkierungseffizienzen und -ausbeuten der PAL-Sonden.

	L-PAL		D-PAL		L-GABA-PAL	
	EC50 [μM] ^a	Ausbeute ^{a,b}	EC50 [μM] ^a	Ausbeute ^{a,b}	EC50 [μM] ^a	Ausbeute ^{a,b}
rST3	0.24 ± 0.00	9.9 ± 0.5	0.30 ± 0.03	9.6 ± 0.3	0.37 ± 0.05	11.1 ± 0.5
hST6	0.79 ± 0.16	10.9 ± 0.3	1.56 ± 0.41	12.2 ± 0.6	0.63 ± 0.20	9.2 ± 0.5
PdST	0.21 ± 0.02	4.5 ± 0.3	0.30 ± 0.01	3.5 ± 0.2	0.19 ± 0.01	2.7 ± 0.2
PmST1	0.19 ± 0.05	3.1 ± 0.4	0.23 ± 0.02	3.7 ± 0.2	0.24 ± 0.02	4.0 ± 0.4

^a ± Wertebereich, ^b AU × 10⁷ (Maximum-Asymptote der nicht-linearen Regression).

(A)



(B)

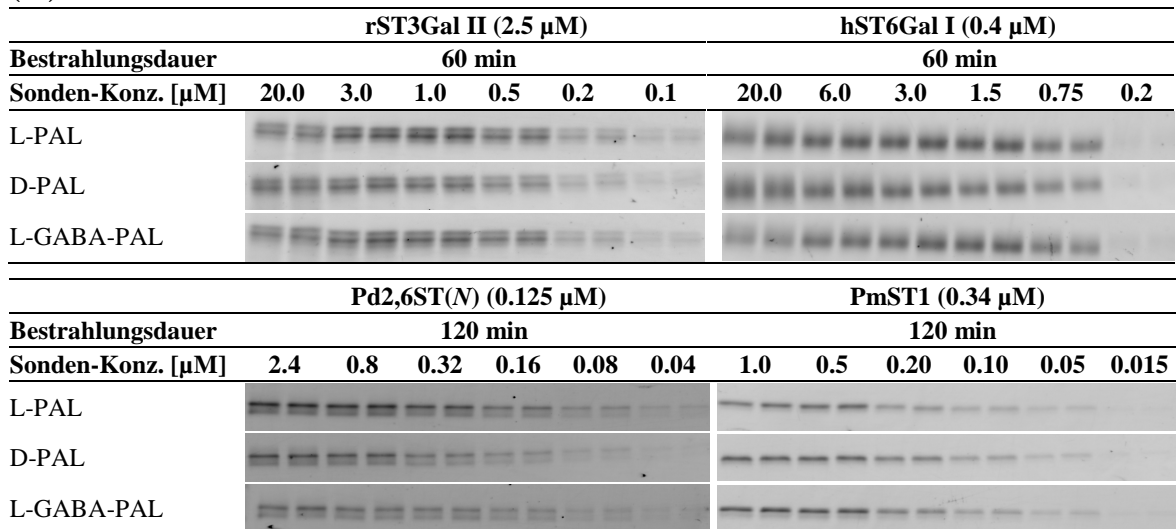


Abb. 7.12.: Photomarkierungseffizienzen und -ausbeuten der PAL-Sonden: (A) Auftragung der Fluoreszenzintensitäten gegen die PAL-Sondenkonzentration (jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus zwei Doppelbestimmungen; die Fehlerbalken indizieren den Wertebereich); (B) Fluoreszenzbilder der SDS-Gele.

PAL-Sonden im Bereich um 1-3 μM .

Die Sialyltransferasen waren bei allen PAL-Sondenkonzentrationen stabil und zeigten bei der Coomassiefärbung keine Abbauprodukte.

7.4.2.2. Affinitätsbasierte Photomarkierung

Die Kontrollverbindungen **Flu-L-Bpa**, **Flu-D-Bpa** und **Flu-L-Bpa-GABA** sind Addukte aus Fluorescein, Bpa und γ -Buttersäure und entsprechen in ihrem Aufbau den PAL-Sonden, allerdings fehlt ihnen der Inhibitorteil. Mit ihnen wurde überprüft, ob die Photomarkierung affinitätsbasiert ist und von dem reversibel bindenden Inhibitorteil abhängt. Die Bestrahlungsreaktionen wurden mit den PAL-Sonden und den Kontrollverbindungen parallel unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Deren Konzentrationen wurden für jede Sialyltransferase so gewählt, dass die Photomarkierungsausbeute gerade gesättigt war und lag zwischen 1–3 μM .

Bei den Kontrollverbindungen wurde im Vergleich zu den PAL-Sonden keine signifikante Markierung der Sialyltransferasen beobachtet. Die qualitative Betrachtung der Gelbilder zeigte bei stark erhöhtem Bildkontrast nur bei der rST3Gal II und der hST6Gal I eine äußerst schwache Fluoreszenzbande² (Abbildung 7.13 B) und die Quantifizierung ergab relative Photomarkierungsausbeuten von 1.9–4.7% bezüglich der PAL-Sonden (Abbildung 7.13 A). Bei den bakteriellen Sialyltransferasen trat gar keine unspezifische Markierung auf. Daraus kann geschlossen werden, dass der reversibel bindende Inhibitorteil essentiell für die Photomarkierung und diese somit affinitätsbasiert war.

Um zu zeigen, dass die Photomarkierung von Benzophenon abhängt, wurden die rST3Gal II und hST6Gal I gemeinsam mit der hochaffinen FP-Sonde **mG6** bestrahlt und mit **L-PAL** verglichen. Ohne die photoreaktive Gruppe war **mG6** nicht in der Lage, bei Bestrahlung einen kovalenten Komplex mit den Sialyltransferasen zu bilden, so dass nach der Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen keine Fluoreszenz im Bereich der Proteinbande detektiert wurde (Abbildung 7.13 C; vollständige Gelbilder siehe Seite 284).

7.4.2.3. Inhibition der Photomarkierung

Die Inhibition der Photomarkierung durch Zugabe von Inhibitoren oder Denaturierung der Sialyltransferasen gab Aufschluss darüber, ob die PAL-Sonden selektiv an die intakte Bindungsstelle der Sialyltransferasen binden. Die Experimente wurden mit **L-PAL**

²Der Kontrastumfang des Papierdrucks ist nicht in der Lage, diese schwachen Banden darzustellen.

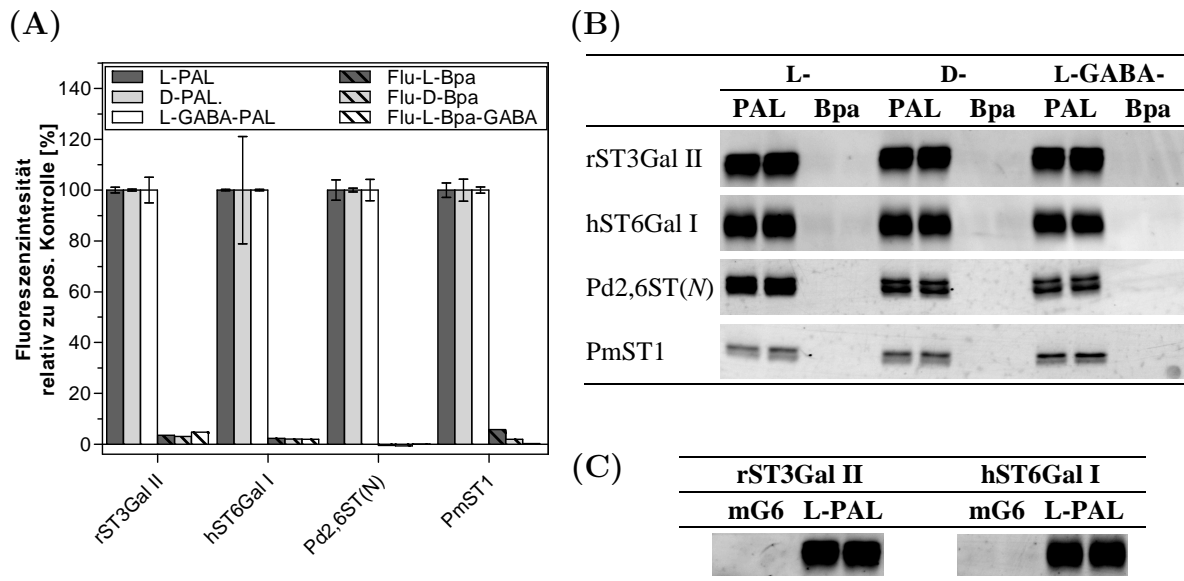


Abb. 7.13.: Affinitätsbasierte Photomarkierung: (A) Fluoreszenzintensitäten der Fluorescein-Bpa-Addukte relativ zu den PAL-Sonden (Mittelwert zweier Doppelbestimmungen, die Fehlerbalken indizieren den Wertebereich); (B) Fluoreszenzbilder der SDS-Gele (stark erhöhter Kontrast); (C) BP-abhängige Photoreaktion (stark erhöhter Kontrast).

Assaybedingungen: rST3Gal II: $c = 2.5 \mu\text{M}$, $c_{\text{PAL/Bpa}} = 1 \mu\text{M}$, 60 min; hST6Gal I: $c = 0.4 \mu\text{M}$, $c_{\text{PAL/Bpa}} = 3 \mu\text{M}$, 60 min; Pd2,6ST(N): $c = 0.85 \mu\text{M}$, $c_{\text{PAL/Bpa}} = 2.4 \mu\text{M}$, 120 min; PmST1: $c = 0.26 \mu\text{M}$, $c_{\text{PAL/Bpa}} = 1 \mu\text{M}$, 120 min).

durchgeführt, die im Mittel die höchsten Photomarkierungsausbeuten und -effizienzen gegenüber den Sialyltransferasen aufwies.

Die Denaturierung der rST3Gal II, hST6Gal I und Pd2,6ST(N) mit 6 M Harnstoff vor der Bestrahlung unterdrückte die Photomarkierung durch L-PAL nahezu vollständig und es waren nur sehr schwache Fluoreszenzbanden auf den Fluoreszenzbildern erkennbar. Bei der PmST1 waren nur 3.9 M Harnstoff verwendet worden, die für eine vollständige Denaturierung nicht ausreichten, so dass die Photomarkierungsausbeute nur um 1/3 gegenüber der Positivkontrolle reduziert wurde. Die Behandlung der Sialyltransferasen mit 1 % SDS und Erhitzen für 5 min auf 95 °C verhinderte jegliche Photomarkierung. Die Hitzedenaturierung ohne weitere Denaturierungsreagenzien reduzierte bei den bakteriellen Sialyltransferasen die Photomarkierung auf 16–20 %, bei der rST3Gal II und hST6Gal I zeigte allerdings die Coomassiefärbung, dass sie vollständig aus der Lösung eliminiert wurden. Möglicherweise hafteten sie bei der Hitzebehandlung an der Gefäßwand. Aus den Denaturierungsexperimenten kann geschlossen werden, dass L-PAL keine unspezifischen Reaktionen mit den ungefalteten bakteriellen

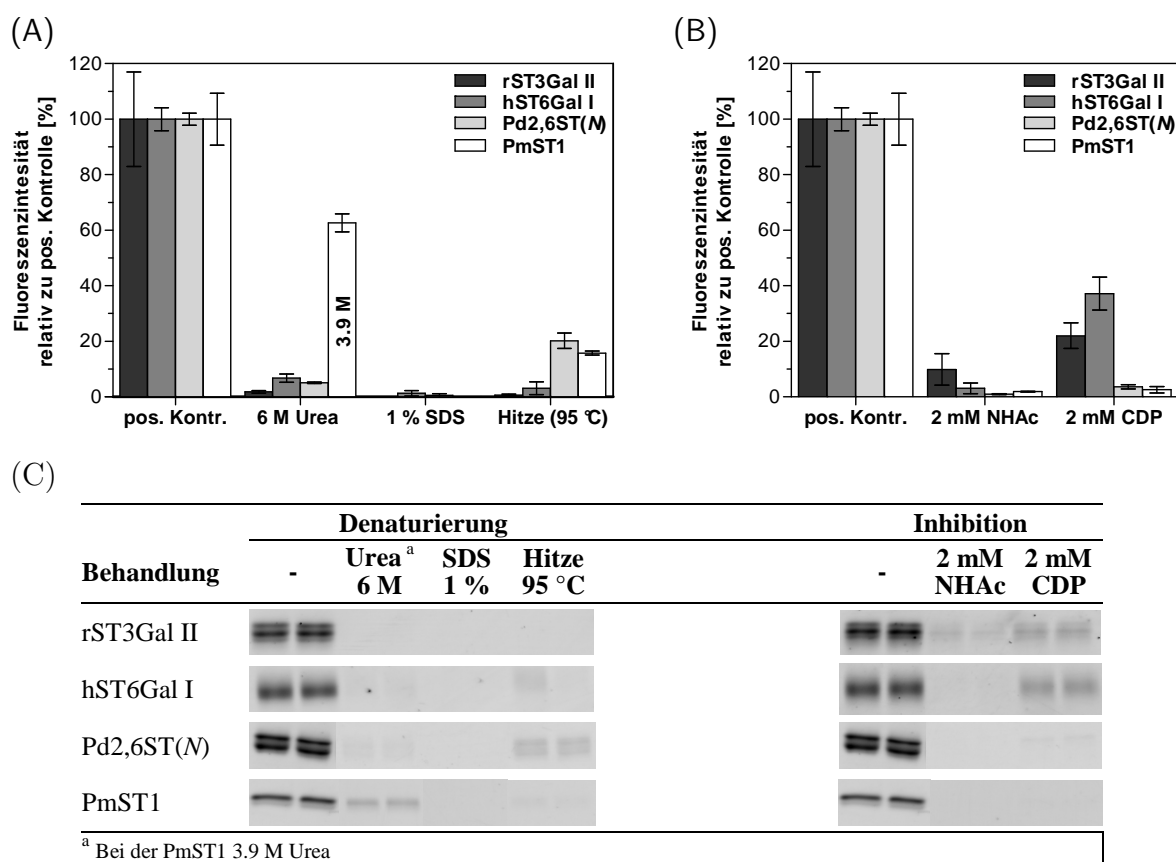


Abb. 7.14.: Photomarkierung mit **L-PAL** unter (A) denaturierenden Bedingungen und (B) in Gegenwart eines kompetitiven Verdrängers (Mittelwert zweier Doppelbestimmungen, die Fehlerbalken indizieren den Wertebereich); (C) Fluoreszenzbilder der SDS-Gele.

Sialyltransferasen einging und deren intakte Konformation essentiell war.

Die Inhibition der Photomarkierung mit kompetitiven Inhibitoren der Sialyltransferasen erfolgte mit **I-NHAc** und **I-CDP** im Überschuss, die durch Verdrängung von **L-PAL** die Photomarkierungsausbeute reduzierten. Dabei zeigte sich, dass **I-CDP** die Photomarkierung der bakteriellen Sialyltransferasen nahezu vollständig inhibierte, die der Säugetiersialyltransferasen dagegen nur auf 22–37 % reduzierte, während **I-NHAc** bei allen vier Sialyltransferasen die Photomarkierung effektiv hemmte. Diese unterschiedlichen Inhibitionen spiegeln die Affinitäten von **I-NHAc** und **I-CDP** wieder, die in den FP-Verdrängungsassays bestimmt wurden. Dass die Photomarkierung mit kompetitiven Inhibitoren unterbunden werden konnte, zeigte, dass die reversible Bindung von **L-PAL** an die Bindungsstelle der Sialyltransferasen für die lichtinduzierte Photomarkierung essentiell und somit spezifisch war.

7.4.2.4. Zeitabhängigkeit der Photomarkierung

Für die bislang beschriebenen Experimente war von Bedeutung, dass keine zeitliche Sättigung der Photomarkierung vorlag. Andernfalls könnten bei den gehemmten Photomarkierungsreaktionen scheinbar höhere Ausbeuten auftreten und sich eigentlich unterschiedliche Photomarkierungseffizienzen der PAL-Sonden nivellieren. Dies wurde nun durch Variation der Bestrahlungszeiten untersucht.

Die Zunahme der Fluoreszenzintensitäten der rST3Gal II und hST6Gal I, die gemeinsam mit L-PAL zwischen 0 und 180 min bestrahlt wurden, wichen bis zu einer Dauer von 60 min nur schwach vom linearen Zusammenhang ab. Selbes traf bis zu einer Bestrahlungszeit von 120 min auf die Pd2,6ST(N) und PmST1 zu, die für Zeiten zwischen 0 und 240 min bestrahlt wurden.

Eine übermäßige Verlängerung der Bestrahlungszeiten, um höhere Photomarkierungsausbeuten zu erreichen, war nur begrenzt sinnvoll und durch die zunehmende Sättigung bei den längsten Bestrahlungszeiten begrenzt. Nicht zeitgesättigte unspezifische Effekte würden dann begünstigt.

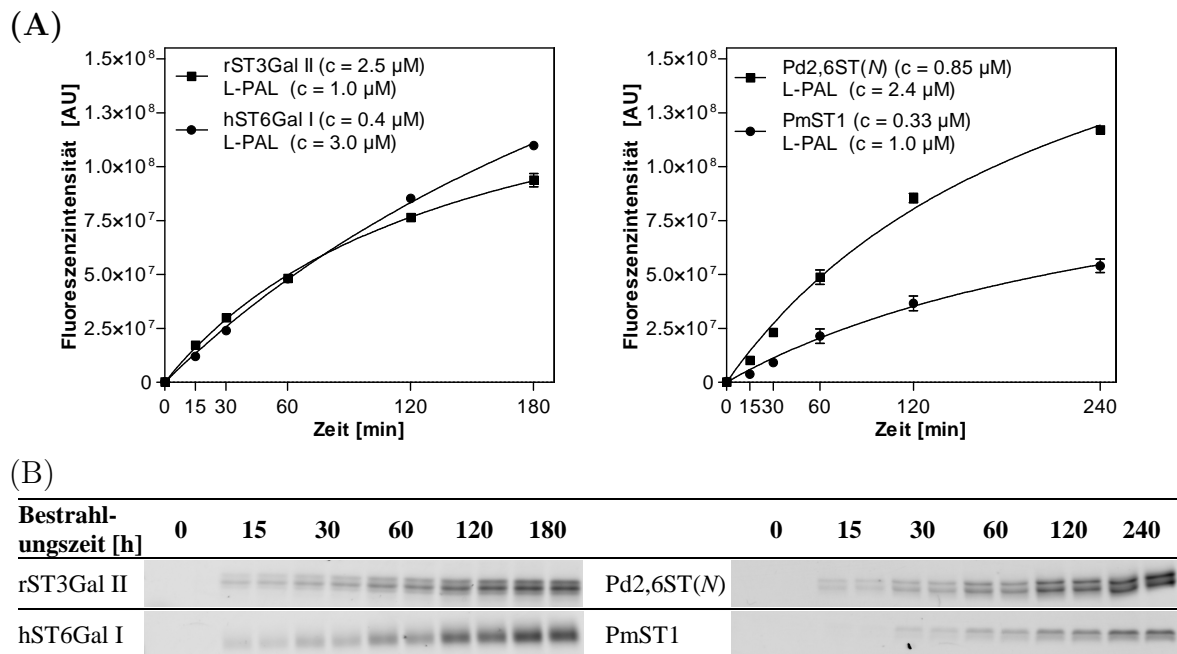


Abb. 7.15.: Zeitabhängige Photomarkierung mit L-PAL (A) Auftragung der Fluoreszenzintensitäten gegen die Bestrahlungszeit (jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus zwei Doppelbestimmungen, die Fehlerbalken indizieren den Wertebereich); (B) Fluoreszenzbilder der SDS-Gele.

7.4.2.5. Detektionsgrenzen der Photomarkierung

Die Proteinkonzentrationen wurde bei konstanten Konzentrationen von L-PAL variiert, um zu ermitteln, wie hoch die minimal detektierbaren Konzentrationen der Sialyltransferasen sind. Die Konzentration von L-PAL wurde für die jeweilige Sialyltransferase so gewählt, dass bei der Bestimmung der Photoeffizienz und -ausbeute die Sättigung der Photomarkierung gerade erreicht war. Visuell waren für die hST6Gal

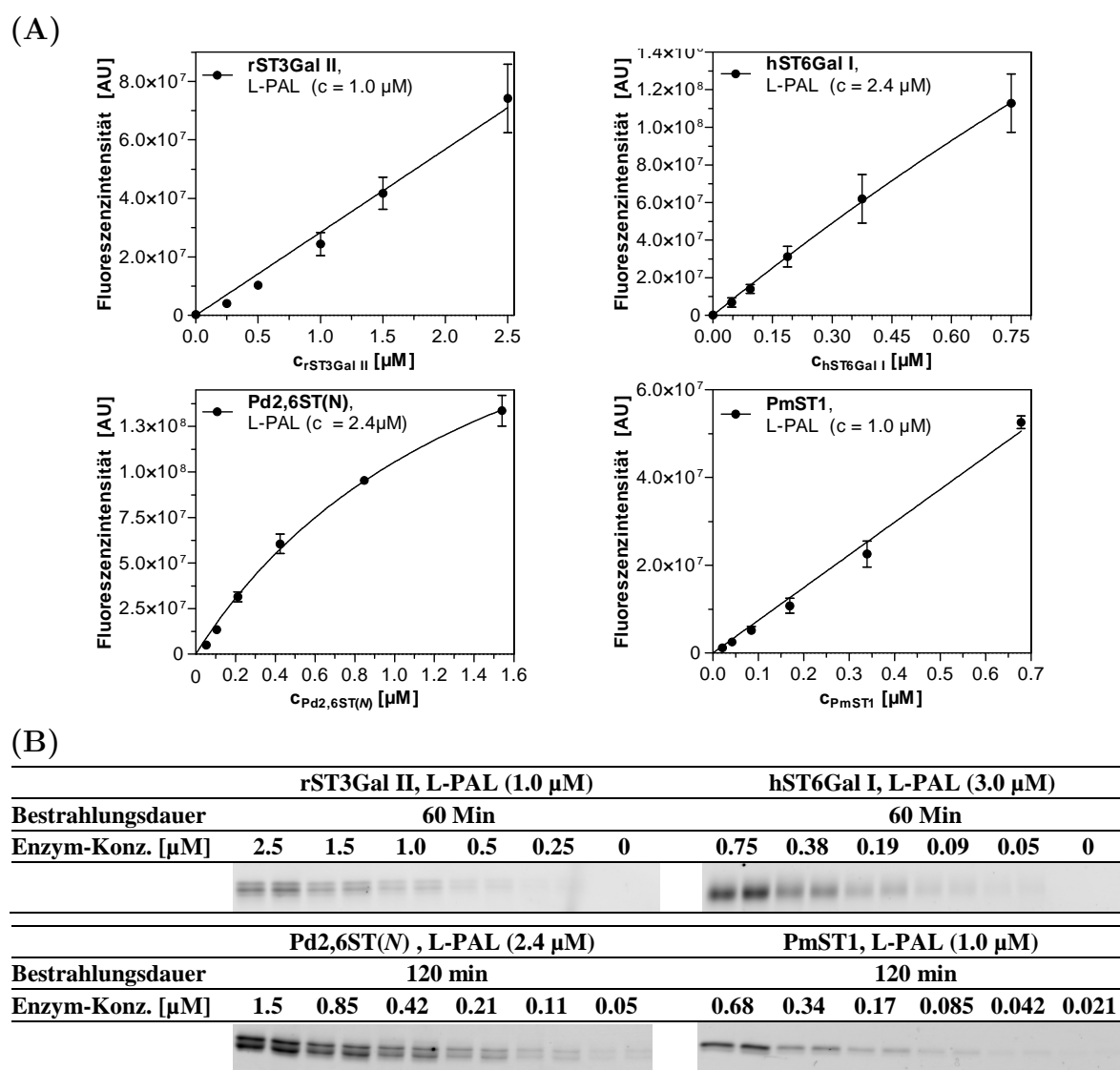


Abb. 7.16.: Variation der Enzymkonzentrationen: (A) Auftragung der Fluoreszenzintensitäten gegen die Enzymkonzentrationen (jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus zwei Doppelbestimmungen, die Fehlerbalken indizieren den Wertebereich); (B) Fluoreszenzbilder der SDS-Gele.

I, Pd2,6ST(N) und PmST1 auch ohne Erhöhung des Bildkontrastes Banden bis zu einer Proteinkonzentration von $\sim 0.05 \mu\text{M}$ (entspricht einer totalen Proteinmenge von je $\sim 35 \text{ ng}$) erkennbar. Die rST3Gal II wurde vergleichsweise schwach markiert und es bedurfte einer Proteinkonzentration von $0.25\text{--}0.50 \mu\text{M}$ (entspricht einer totalen Proteinmenge von $\sim 200 \text{ ng}$), um eine sichtbare Fluoreszenzbande hervorzubringen. Da mit längeren Bestrahlungszeiten die Markierungsausbeuten noch erhöht werden könnten, ließe sich die Detektionsgrenze entsprechend senken.

7.4.3. Photomarkierung von Sialyltransferasen in komplexen Proteomen - Vorläufige Ergebnisse

Für Experimente mit Sialyltransferasen in einem komplexem Proteom wurden über eine Kooperation mit PHILIPPE DELANNOY und ANNE HARDUIN-LEPERS der Université Lille1 die Sialyltransferasen hST8Sia II, hST8Sia III und hST8Sia VI (überexprimiert in Brustkrebszellen (MDA-MB-231), Tabelle 7.3) erhalten. Es handelte sich dabei um unbeschnittene Sialyltransferasen, die aufgrund ihrer Transmembrandomäne unlöslich waren und daher in Form einer mikrosomalen Präparation isoliert wurden.

Tab. 7.3.: Die verfügbaren hST8 Sialyltransferasen in mikrosomalen Fraktionen.

Transferase	Substrate	geformte Strukturen	AS	Masse
hST8Sia II	GP	(Neu5Acα2,8) _n Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-	375	42.4 kDa
hST8Sia III	GP	Neu5Acα2,8 Neu5Ac α 2,3Gal β 1- Neu5Acα2,8 Neu5Ac α 2,6GalNAc-	380	44.0 kDa
hST8Sia VI	O-GP	Neu5Acα2,8 Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc-	398	44.8 kDa

GP: Glycoprotein; O-GP: O-Glycosylprotein; AS: Aminosäuren

Mit einer seriellen Verdünnung der mikrosomalen Fraktionen wurde eine SDS-Page durchgeführt und mit der Coomassiefärbung die maximale Beladbarkeit der Gradientengele ermittelt. Für die hST8Sia II waren die Proteinbanden ab einer $\sim 1/32$ Verdünnung und für die hST8Sia III sowie hST8Sia VI ab einer $1/16$ Verdünnung gut aufgelöst (Abbildung 7.17).

Anhand der maximalen Beladbarkeit der SDS-Gele wurden von jeder Sialyltransferase eine Menge gewählt, bei der eine leichte Überladung des Gels vorlag, und eine niedrigere, bei der die Proteine gut separiert wurden. Die gut suspendierten mikrosomalen

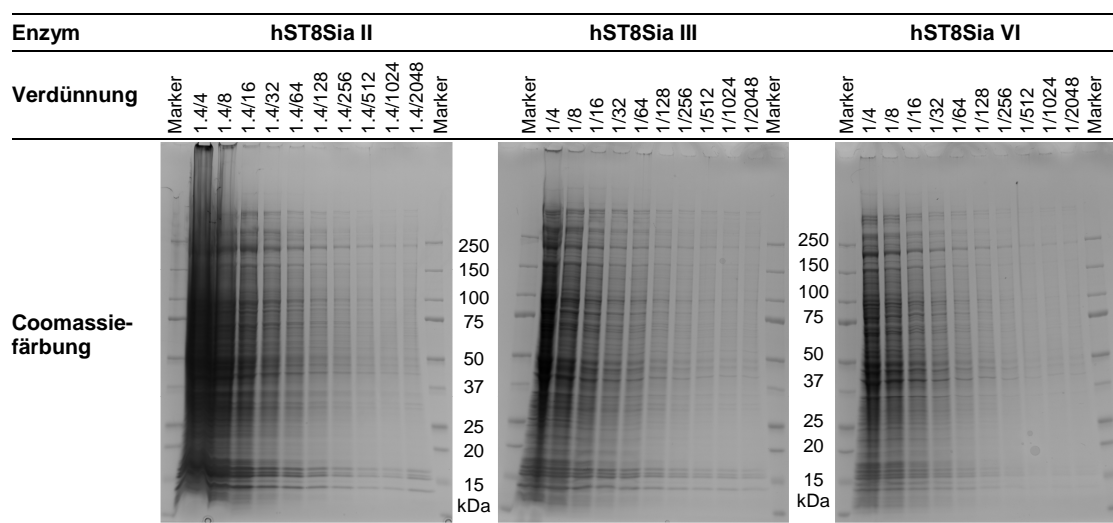


Abb. 7.17.: Ermittlung der Beladungskapazität der SDS-Gele.

Fractionen wurden mit 1 oder 10 μM **L-PAL** inkubiert, bevor die Proben für 120 min bei ~ 366 nm bestrahlt wurden. Bei allen Proben mit 10 μM **L-PAL** waren die gesamten Bahnen fluoreszent, insbesondere, wenn diese mit den mikrosomalen Fraktionen überladen wurden. Außerdem waren bei 10 μM mehrere Banden erkennbar, die stärker als der Hintergrund der jeweiligen Bahn fluoreszierten (zwischen ~ 25 bis ~ 60 kDa). Bei den Kombinationen aus geringerer **L-PAL** Konzentration (1 μM) und den geringeren Mengen der mikrosomalen Fraktionen reduzierten sich die fluoreszenten Banden auf eine einzelne bei ~ 60 kDa (Abbildung 7.18 A, roter Pfeil). Somit schien unter günstigen Verhältnissen von der Photomarkierermenge zu der Menge der mikrosomalen Fraktionen mit den Sialyltransferasen die selektive Markierung einer Proteinspezies möglich zu sein.

Durch Übereinanderlegen der Fluoreszenzbilder und der Bilder der coomassiegefärbten Gele wurde versucht, die Fluoreszenzbande einer sichtbaren Proteinbande zuzuordnen. Bei den drei unterschiedlichen mikrosomalen Fraktionen lagen im Bereich der Fluoreszenzbande drei Proteinbanden, von denen eine möglicherweise markiert wurde (Abbildung 7.18 B, rote Pfeile).

Um zu überprüfen, ob die Photomarkierung spezifisch erfolgte, wurde die Bestrahlung der hST8Sia II haltigen mikrosomalen Fraktion unter denaturierenden Bedingungen (1% SDS und Erhitzen auf 95°C als auch Behandlung mit 6 M Harnstoff) durchgeführt und zusätzlich **L-PAL** mit **Flu-L-Bpa** verglichen. Weder bei den denaturierten Proteinen noch bei der Kontrolle mit **Flu-L-Bpa** fand eine erkennbare Photomarkie-

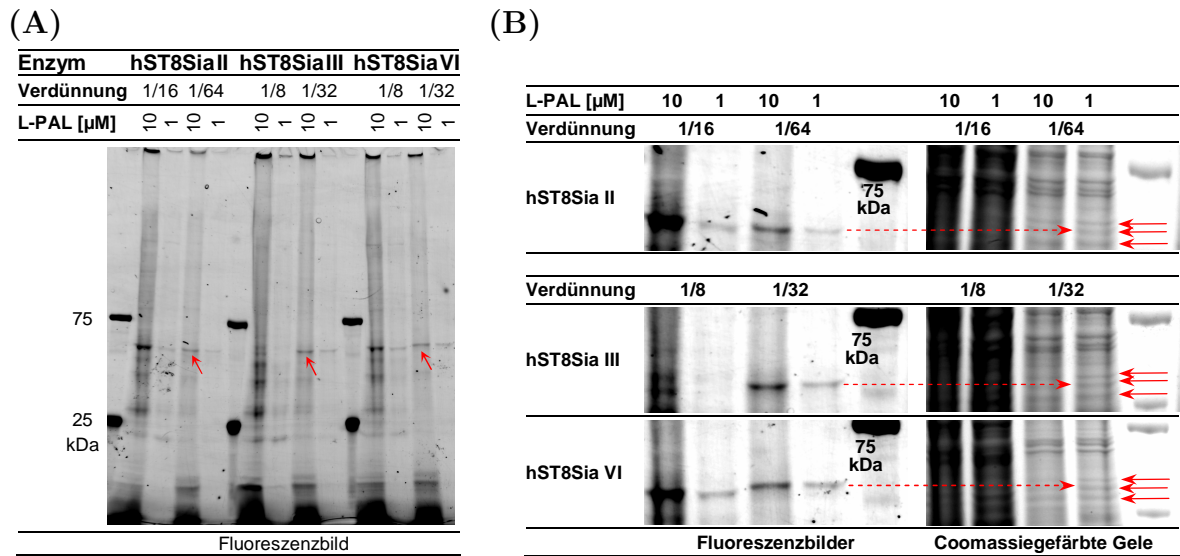


Abb. 7.18.: Photomarkierung der Sialyltransferasen in mikrosomalen Fraktionen: (A) vollständige Gelbilder und (B) Ausschnitt zur Lokalisation der Fluoreszenzbande (2 h Bestrahlungszeit, stark erhöhter Kontrast).

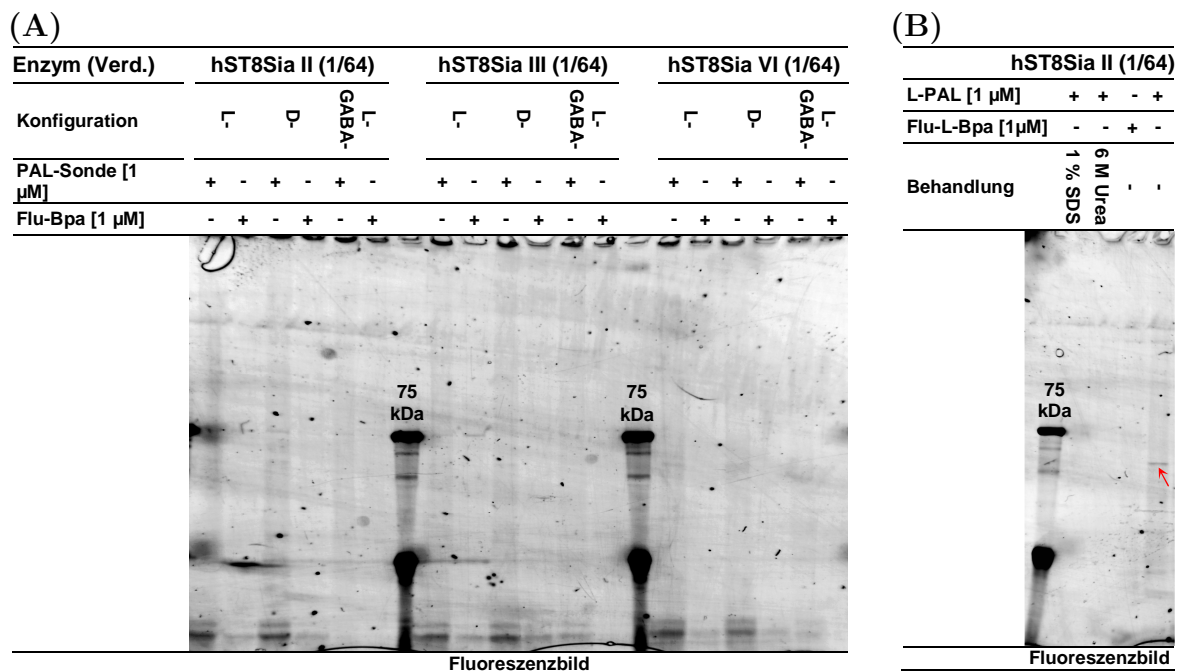


Abb. 7.19.: (A) Vergleich der Photomarkierung durch die PAL-Sonden und die Kontrollverbindungen (16 h Bestrahlungszeit, stark erhöhter Kontrast); (B) Spezifität der Photomarkierung bei hST8Sia II (2 h Bestrahlungszeit, stark erhöhter Kontrast).

rung statt, während 1 μM L-PAL wieder eine Proteinbande markierte (Abbildung 7.19 B, roter Pfeil).

In einem weiteren Experiment wurde die Photomarkierung der hST8Sia II, hST8Sia III und hST8Sia VI durch die drei PAL-Sonden miteinander und mit den drei Kontrollverbindungen verglichen. Mit dem Ziel, die Photomarkierungsausbeute zu erhöhen, wurde die Bestrahlungszeit von 2 h auf 16 h erhöht. Jedoch konnte die zuvor beobachtete Markierung einer Proteinbande durch die PAL-Sonden nicht reproduziert werden. Während die Bahnen bei Einsatz der PAL-Sonden leicht fluoreszent waren, war bei den Kontrollverbindungen keine Fluoreszenz sichtbar (Abbildung 7.19). Durch die lange Bestrahlungszeit könnte es zu der Zersetzung der potentiell markierten Sialyltransferasen gekommen sein.

7.5. Ergebnisse der Photomarkiererentwicklung

Die Modifikation der FP-Sonden mit einer photoreaktiven Gruppe – dem Benzophenon – zu einem Photomarkierer war erfolgreich. Die Benzophenongruppe hatte keinen Einfluss auf die Affinitäten, wie die FP-Bindungsassays ergaben. Bei den kommerziell erhältlichen und gereinigten Sialyltransferasen konnte gezeigt werden, dass sie in einer affinitätsbasierten und spezifischen Weise die rST3Gal II sowie hST6Gal I und die Pd2,6ST(N) sowie PmST1 markierten. Die Spezifität und Selektivität wurde mit unterschiedlichen Experimenten nachgewiesen:

- Erhöhung der PAL-Sondenkonzentration führt zur Sättigung der Markierung
- Inhibitorteil ist essentiell für die Photomarkierung
- Unterdrückung der Markierung durch Denaturierung der Sialyltransferasen
- Hemmung der Photomarkierung mit kompetitiven Sialyltransferaseinhibitoren

Die ersten Experimente mit mikrosomalen Fraktionen, die die Sialyltransferasen hST8Sia II, hST8Sia III und hST8Sia VI enthielten, waren einerseits vielversprechend, andererseits konnten die ersten Markierungen einer einzelnen Proteinbande nicht zweifelsfrei reproduziert werden. In diesem Bereich bedarf es weiterer Untersuchungen, z.B. könnten durch MS/MS-Fragmentierung die Proteine der markierten Banden identifiziert werden.

8. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit unterteilt sich in vier Teilprojekte. Sie umfasst die Entwicklung und Synthese von Fluoreszenzpolarisationssonden sowie die Etablierung eines Hochdurchsatz-fähigen FP-Assays für Sialyltransferasen, so dass ein Hochdurchsatz-Screen einer Sialyltransferase durchgeführt werden konnte. Durch Modifikation der FP-Sonden mit der photoreaktiven Gruppe Benzophenon wurden des Weiteren Photomarkierer für Sialyltransferasen entwickelt. Es standen zwei Säugetier- (rST3Gal II und hST6Gal I) sowie zwei prokaryotische Sialyltransferasen (Pd2,6ST(N) und PmST1) zur Verfügung, so dass die strukturell sehr unterschiedlichen Säugetier- und bakteriellen Enzyme untersucht werden konnten. Für die Photomarkierungsexperimente waren darüber hinaus drei Vollängen-Sialyltransferasen verfügbar.

8.1. FP-Sondenentwicklung

Auf der Basis eines Übergangszustandsanalogons der Sialyltransferasen wurden unterschiedliche Derivate fluoresceinmarkierter Inhibitoren entworfen, die sich in der 5/6-Isomerie von Carboxyfluorescein, in einem Glycinlinker, der *meta*- oder *para*-Substitution am Aromaten des Benzylphosphonats und der Stereokonfiguration des α -Phosphonatkohlenstoffs unterschieden (Abbildung 8.1).

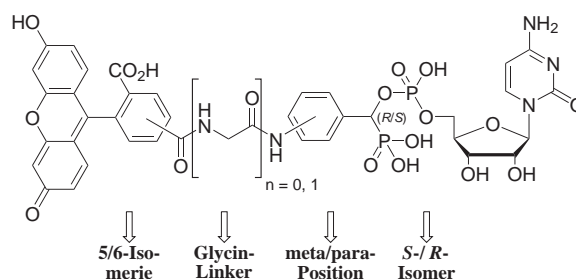


Abb. 8.1.: Derivate der FP-Sonden.

Die Darstellung erfolgte zunächst stereounselektiv und es wurden jeweils die Gemische

der zwei Diastereomere von **8-*m*-(5)**, **8-*m*-(6)**, **8-*m*-G-(5)** sowie **8-*m*-G-(6)** erhalten (Abbildung 8.1). Die *para*-substituierten Verbindungen waren bei der letzten Stufe, der Entschützung durch katalytische Hydrierung und basischer Behandlung mit NaOMe, instabil. Daher konnte die Verbindung **8-*p*-(6)** nur in schlechter Ausbeute und **8-*p*-(5)** gar nicht isoliert werden.

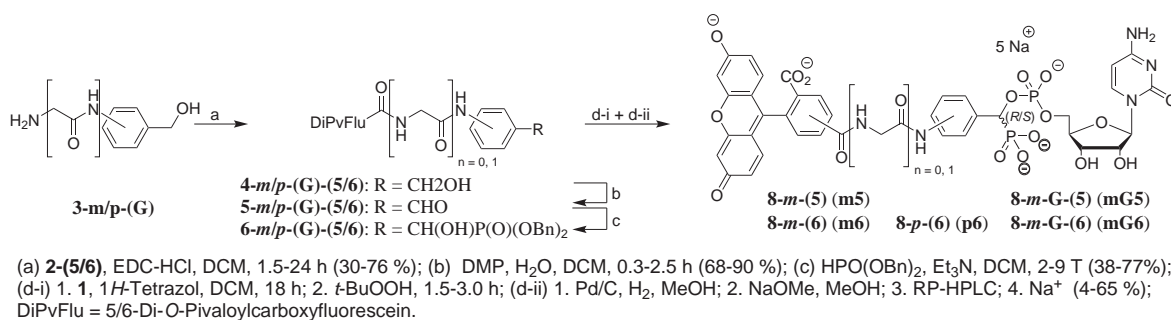


Abb. 8.2.: Darstellung der diastereomergemischten FP-Sonden.

Um die maximalen Affinitäten der FP-Sonden erreichen zu können, war die Trennung der Diastereomere der Verbindungen **8-*m*/*p*-(G)-(5)/(6)** vorgesehen, die jedoch aufgrund identischer Retentionszeiten der *R*- und *S*-Isomere per HPLC nicht möglich war. Daher wurden mit einer zweiten Syntheseroute durch die Oxidation von **13-*m*/*p*** mit (+)- oder (-)-(8,8-Dichlorcampherylsulfonyl)oxaziridin die α -Hydroxymethylphosphonate (***R***)/(***S***)-**14-*m*/*p*** stereoselektiv (84-87 % *ee*) dargestellt (Tabelle 4.1). Die Nitrosubstitution des Aromaten der chiralen Alkohole (***R***)- und (***S***)-**14-*m*/*p*** ermöglichte nach der Reduktion zu den Anilinen (***R***)- und (***S***)-**15-*m*/*p*** die Kupplung mit Carboxyfluorescein. Die nun verwendete Allylschutzgruppe für das Phosponat konnte in einer Eintopfreaktion gemeinsam mit allen anderen Schutzgruppen entfernt werden

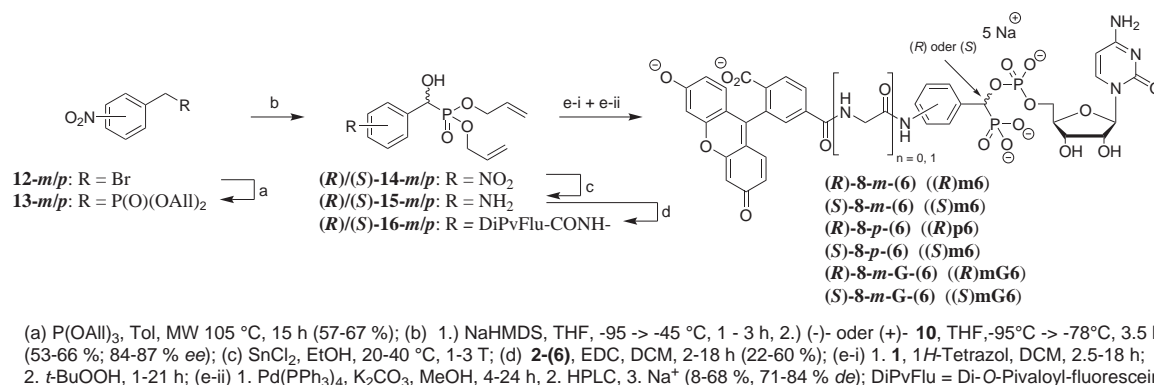


Abb. 8.3.: Stereoselektive Synthese zur Darstellung der diastereomerreinen FP-Sonden.

und auch die *para*-substituierten FP-Sonden waren unter diesen Reaktionsbedingungen stabil (Abbildung 8.3). Die (*R*)- und (*S*)-Isomere der FP-Sonden **8-m-(6)**, **8-m-G-(6)** und **8-p-(6)** wurden mit Diastereomerenüberschüssen zwischen 71 und 84% *de* erhalten (Tabelle 4.3.6).

8.2. Entwicklung des Hochdurchsatz FP-Assays

Die FP-Sonden wurden mit zwei Säugetier- und zwei bakteriellen Sialyltransferasen getestet. Durch die Titration der Sialyltransferasen zu den FP-Sonden wurden die Affinitäten bestimmt, die überwiegend im niedrigen nanomolaren Bereich lagen (Tabelle 8.1). Die Sialyltransferasen rST3Gal II, PmST1 und Pd2,6ST(N) banden die *R*-konfigurierten FP-Sonden besser als die *S*-konfigurierten, während die hST6Gal I eine leichte Präferenz für die *S*-Isomere aufwies. Die Carboxyfluoresceinisomerie dagegen hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Affinitäten der FP-Sonden.

Große Unterschiede wurden bei den Signal-Dynamikbereichen der FP-Sonden beobachtet ($\Delta A = 75\text{--}215\text{ mA}$). Auch zwischen den Sialyltransferasen zeigten die einzelnen FP-Sonden sehr unterschiedliche Dynamikbereiche. Die beobachteten Abhängigkeiten der Fluoreszenzquantenausbeuten der meisten FP-Sonden von der Bindung an die Sialyltransferasen war von Sialyltransferase zu Sialyltransferase unterschiedlich. Dabei zeigten die FP-Sonden häufig ein Quenchen der Fluoreszenz. Die Struktur der FP-Sonden

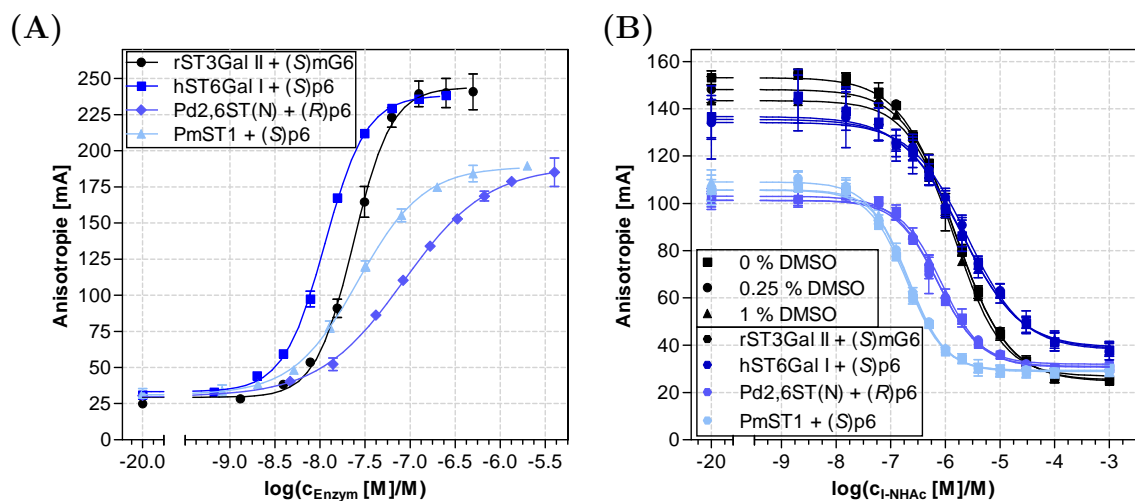


Abb. 8.4.: Die FP-Assayentwicklung: (A) Direkter FP-Bindungsassay, (B) FP-Verdrängungsassay und Einfluss von DMSO.

(*meta/para*-Substitution, *S/R*- oder Carboxyfluoresceinisomerie) gab keine Hinweise darauf, welche strukturellen Kriterien für die beobachteten Effekte verantwortlich waren.

Mit den FP-Sonden, die eine konstante Fluoreszenzquantenausbeute bei möglichst großem Dynamikbereich und guter Affinität aufwiesen (Abbildung 8.4 A; Tabelle 8.1, Werte fett hervorgehoben), wurde ein Hochdurchsatz-fähiger FP-Assay für Sialyltransferasen etabliert. In FP-Verdrängungsassays mit kompetitiven Inhibitoren wurde gezeigt, dass die FP-Sonden reversibel binden. Die ermittelten Inhibitionskonstanten für **I-NHAc** und **I-CDP** stimmten gut mit den literaturbekannten Werten überein (Tabelle 5.7). Gegenüber einer screeningtypischen DMSO-Konzentration von 1 % war der HT-FP-Assay robust und ergab exzellente Z' -Werte ($Z' = 0.51$ – 0.91 ; Abbildung 8.4 B).

Darüber hinaus machte der Assay sowohl Akzeptor- als auch Donorsubstrat überflüssig.

Tab. 8.1.: Übersicht über die Affinitäten und Anisotropieeigenschaften der FP-Sonden.

FP-Sonde	rST3Gal II			hST6Gal I			Pd2,6ST(N)			PmST1		
	EC50 _{FSB} [nM]	ΔA [mA]	(Q)	EC50 _{FSB} [nM]	ΔA [mA]	(Q)	EC50 _{FSB} [nM]	ΔA [mA]	(Q)	EC50 _{FSB} [nM]	ΔA [mA]	(Q)
m5	34.0	174	(<1)	21.6	184	(1)	390.8	202	(1)	97.3	179	(<1)
m6	46.3	155	(<1)	17.2	207	(<1)	>1000	165	(1)	116.9	146	(<1)
(<i>R</i>)m6	41.0	182	(<1)	22.2	213	(<1)	924.6	193	(<1)	33.6	161	(≪1)
(<i>S</i>)m6	44.8	144	(1)	9.0	185	(<1)	>1000	180	(1)	183.8	140	(<1)
p6	40.8	133	(<1)	15.3	185	(1)	232.0	148	(1)	19.8	124	(<1)
(<i>R</i>)p6	24.5	132	(<1)	21.5	152	(1)	83.9	159	(1)	11.5	134	(≪1)
(<i>S</i>)p6	78.9	180	(<1)	11.3	205	(1)	590.7	163	(>1)	26.5	158	(1)
mG5	21.6	197	(<1)	15.5	178	(<1)	562.6	158	(1)	60.1	154	(<1)
mG6	24.7	215	(<1)	18.4	207	(<1)	557.9	162	(<1)	51.2	132	(<1)
(<i>R</i>)mG6	23.9	194	(<1)	17.9	205	(1)	53.2	75	(≪1)	12.7	139	(≪1)
(<i>S</i>)mG6	23.5	215	(1)	12.8	209	(<1)	>1000	182	(1)	184.6	104	(<1)

Die Daten der jeweiligen Kombination aus Sialyltransferase und FP-Sonde, die für die FP-Verdrängungsassays eingesetzt wurden, sind fett gedruckt.

8.3. HT-Screening einer Sialyltransferase

Mit dem entwickelten HT-FP-Assay wurde erstmalig ein Hochdurchsatz-Screen einer Sialyltransferase mit einer umfangreichen Substanzbibliothek durchgeführt. In der Screening-Unit des FMP-Berlin wurden die rST3Gal II mit der FP-Sonde (**S**)mG6 gegen 28.864 Substanzen getestet (Abbildung 8.5). Der FP-Verdrängungsassay erwies sich auch unter HTS-Bedingungen bei hohem Automatisierungsgrad mit Z_r' -Werten zwischen 0.93 und 0.98 als äußerst robust und erlaubte einen maximalen Durchsatz von zwölf 384-well Platten/h. Dies entspricht mit über 100.000 Substanzen/24 h bereits uHTS-Niveau.

Bei der Auswertung des Screens wurden 556 Substanzen (1.9 % aller gescreenten Testverbindungen) gegenselektiert, deren Autofluoreszenz mit dem Assaysignal interferierten. Die Selektion der Primärhits erfolgte sowohl über die Scoringmethode (z_r -score < -3) als auch durch Festlegung einer Mindestaktivität von 10 %. Dies ergab 149 Testverbindungen, die anschließend validiert wurden.

Der Hit-Validierungsprozess bestand aus der Bestimmung der IC₅₀-Werte für alle Primärhits, einer LC/MS-Analyse, um die Integritäten der Substanzen zu überprüfen, sowie der Betrachtung der chemischen Strukturen um „frequent hitter“ und proteinreaktive Substanzklassen zu identifizieren (Abbildung 8.6 A).

Es zeigte sich, dass viele der aktiven Substanzen proteinreaktiv waren (z.B. Cephalosporine). Auch diverse Struktur motive, die als „frequent hitter“ bekannt sind, zeigten gegenüber der rST3Gal II Aktivitäten. Insgesamt wurden 71 Testverbindungen als

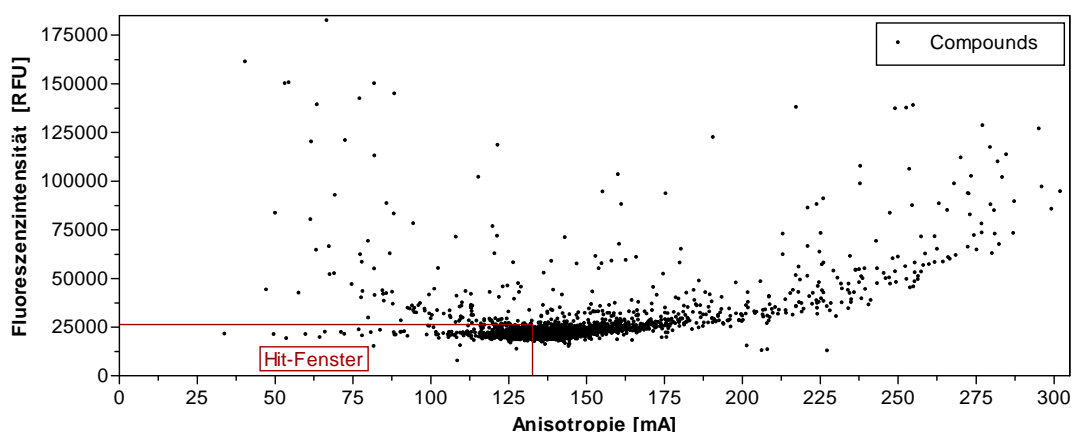
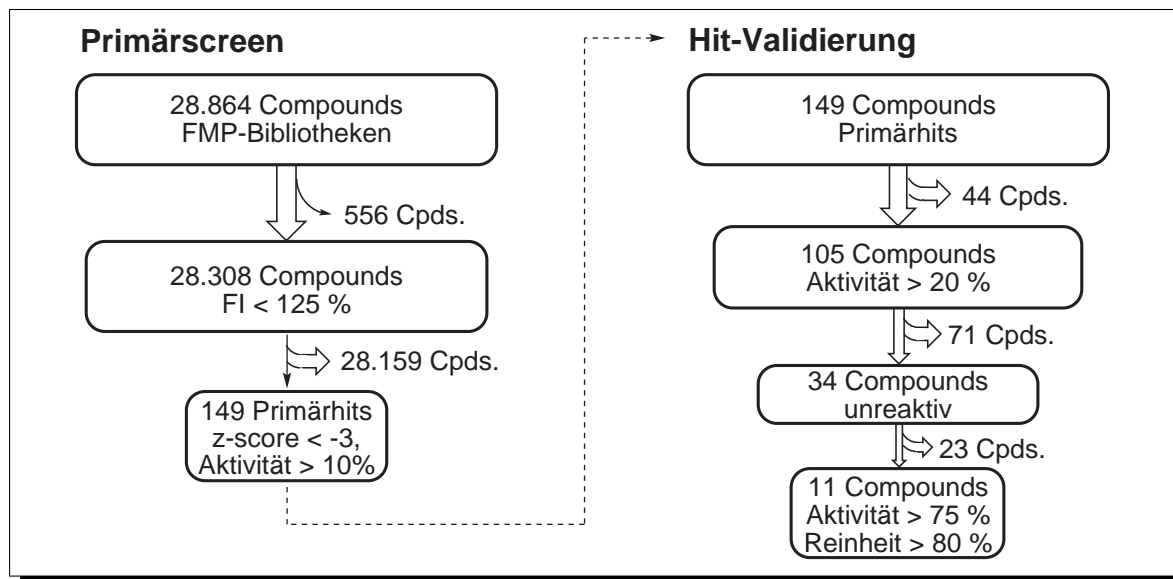


Abb. 8.5.: Scatterplot der Fluoreszenzintensitäten der gescreenten Testverbindungen, aufgetragen gegen die Anisotropien.

(A)



(B)

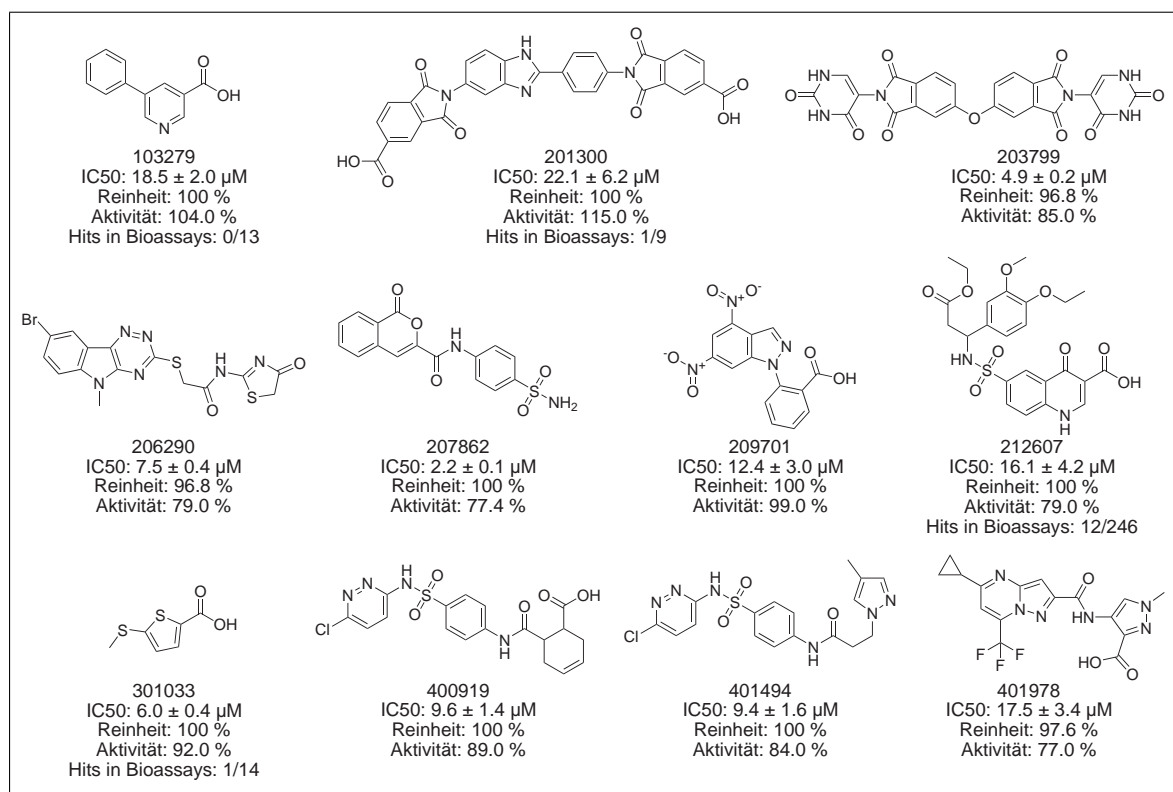


Abb. 8.6.: (A) Ergebnis des Screenings und (B) selektierte potentielle Leitstrukturen.

potentiell reaktiv und/oder „frequent hitter“ identifiziert, die von der Leitstrukturselektion ausgeschlossen wurden.

Für die verbliebenen 34 Verbindungen wurden Untergrenzen für die Aktivität ($> 75\%$) und Reinheit ($> 80\%$) definiert, was 11 Testverbindungen ergab, deren Inhibitionspotential höher war als das von Cytidindiphosphat. Sie stellen vielversprechende Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Sialyltransferaseinhibitoren dar. (Abbildung 8.6 B).

8.4. Entwicklung der Photomarkierer

Durch Einbau einer photoreaktiven Benzophenongruppe in eine FP-Sonde wurden Photoaffinitätsmarker (PAL-Sonden) entwickelt.

Die Synthese der PAL-Sonden erfolgte analog zu der Darstellung der diastereomeren FP-Sonden (*R*)- und (*S*)-8-m-G-(6). Auf die Stereokontrolle wurde allerdings verzichtet und das racemische α -Hydroxymethylphosphonat **15-m** verwendet. Es wurden drei Derivate dargestellt, die sich durch die L- oder D-Konfiguration von 4-Benzoylphenylalanin (Bpa) in ihrer räumlichen Struktur unterscheiden (L-PAL, D-PAL) oder einen γ -Aminobuttersäure-Linker besaßen (GABA-L-PAL) (Abbildung 8.7).

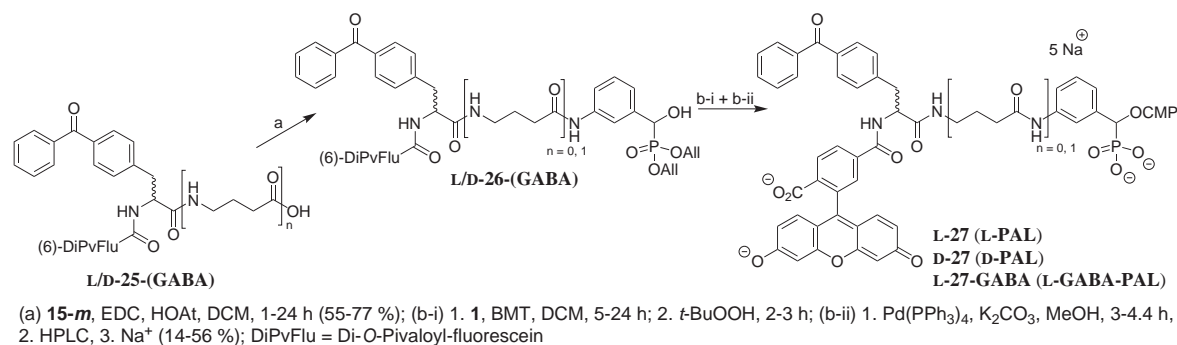


Abb. 8.7.: Darstellung der PAL-Sonden.

Die Reportergruppe Fluorescein wurde in FP-Bindungsassays ausgenutzt, um die Affinitäten der PAL-Sonden zu bestimmen (Tabelle 8.2). Die Bpa-Modifikation hatte keinen Einfluss auf die Affinitäten, die denen der FP-Sonde **mG6** entsprachen.

Die Bestrahlungsexperimente wurden durch Transillumination (366 nm) der PAL-Sonden mit den Sialyltransferasen rST3Gal II, hST6Gal I, Pd2,6ST(N) oder PmST1 auf

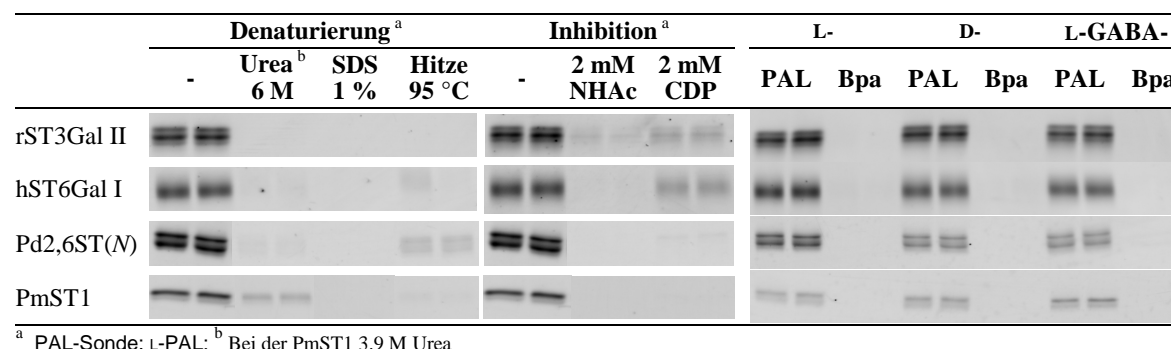
Tab. 8.2.: Eigenschaften der PAL-Sonden.

PAL-Sonde	FP-Bindungsassay		Photomarkierung		
	EC50 _{FP} [nM] ^a	ΔA [mA] ^a	EC50 _{PAL} [μ M] ^b	Ausbeute ^{a,c}	
rST3	L-PAL	24.0 \pm 3.0	169.7 \pm 4.4	0.24 \pm 0.00	9.9 \pm 0.5
	D-PAL	23.4 \pm 2.7	149.1 \pm 4.2	0.30 \pm 0.03	9.6 \pm 0.3
	L-GABA-PAL	25.1 \pm 1.9	163.1 \pm 4.4	0.37 \pm 0.05	11.1 \pm 0.5
hST6	L-PAL	9.4 \pm 0.6	147.4 \pm 3.5	0.79 \pm 0.16	10.9 \pm 0.3
	D-PAL	12.2 \pm 0.7	135.9 \pm 3.5	1.56 \pm 0.41	12.2 \pm 0.6
	L-GABA-PAL	14.9 \pm 0.4	151.2 \pm 2.1	0.63 \pm 0.20	9.2 \pm 0.5
PdST	L-PAL	321.9 \pm 86.4	159.4 \pm 9.5	0.21 \pm 0.02	4.5 \pm 0.3
	D-PAL	195.4 \pm 40.1	133.7 \pm 8.1	0.30 \pm 0.01	3.5 \pm 0.2
	L-GABA-PAL	203.3 \pm 22.4	122.4 \pm 5.6	0.19 \pm 0.01	2.7 \pm 0.2
PmST1	L-PAL	34.3 \pm 4.9	123.1 \pm 6.5	0.19 \pm 0.05	3.1 \pm 0.4
	D-PAL	49.3 \pm 12.9	121.3 \pm 8.3	0.23 \pm 0.02	3.7 \pm 0.2
	L-GABA-PAL	50.8 \pm 24.8	160.4 \pm 6.7	0.24 \pm 0.02	4.0 \pm 0.4

^a \pm Standardfehler. ^b \pm Wertebereich, ^cAU $\times 10^7$ (Maximum Asymptote der nicht-linearen Regression).

Mikrotiterplatten mit transparentem Boden durchgeführt, so dass Arbeitsvolumina von $\sim 13 \mu\text{L}$ und ein entsprechend geringer Proteinverbrauch ermöglicht wurden. Die Detektion der Markierungsprodukte in SDS-Gelen erfolgte durch Anregung des Fluoresceinrestes und Photographie. Dies ermöglichte eine Quantifizierung und den Vergleich der PAL-Sonden. Diese zeigten bei ihren Photomarkierungseffizienzen und -ausbeuten überwiegend geringe Unterschiede (Tabelle 8.2).

Spezifität und Selektivität wurde durch Hemmung der Photomarkierung mit kompetitiven Inhibitoren oder durch Denaturierung der Sialyltransferasen vor der Bestrahlungsreaktion mit Harnstoff oder SDS nachgewiesen. Der Vergleich der Photomarkierungen durch die Kontrollverbindungen **Flu-L-Bpa**, **Flu-D-Bpa** und **Flu-L-Bpa-GABA**

**Abb. 8.8.:** Fluoreszenzbilder der markierten Sialyltransferasen.

(Addukte aus Carboxyfluorescein und Bpa ohne Inhibitorbaustein) mit denen der PAL-Sonden ergab, dass die Photomarkierung affinitätsbasiert ist und vom Inhibitoranteil abhängt (Abbildung 8.8).

Mit vier menschlichen Vollängen-Sialyltransferasen (hST8Sia II, hST8Sia III und hST8Sia VI), die als mikrosomale Fraktionen präpariert waren, wurden erste Experimente unternommen, Sialyltransferasen in einem komplexen Proteom zu markieren. Die vorläufigen Ergebnisse zeigten die selektive Markierung einer Proteinbande, jedoch mit Schwierigkeiten, diese Markierung zu reproduzieren. Es bedarf weiterer Untersuchungen wie der Identifizierung der markierten Proteinbande durch MS/MS-Fragmentierung.

8.5. Ausblick

Die FP-Sonden haben sich mit ihren hervorragenden Affinitäten (kleine Bindungskonstanten) und sehr guten Polarisierungseigenschaften (große Dynamikbereiche) als ein äußerst nützliches Werkzeug erwiesen, mit dem in einfachster Weise Sialyltransferasen in HT-FP-Assays auf Inhibitoren getestet werden können. Somit ist erstmalig ein sialyltransferaseuniverseller Assay verfügbar, der zudem Akzeptor- als auch Donorsubstrat überflüssig macht. Er hat sich auch unter realen HTS-Bedingungen bewährt und ermöglicht in Zukunft das Screening von Sialyltransferasen gegen große Substanzbibliotheken.

Die Entwicklung der fluorophorgelabelten Photomarkierer war der erste Schritt auf dem Weg zu einem Werkzeug zur Analyse von Sialyltransferasen in komplexen Proteomen. Durch zusätzliche Modifikation der PAL-Sonden mit einem Biotinbaustein würde die Anwendbarkeit erweitert, so dass sich markierte Sialyltransferasen selektiv aus einem komplexen Proteom herausfischen ließen.

Dass die FP- und PAL-Sonden sowohl an die Säugetier- als auch an die bakteriellen Sialyltransferasen binden, legt den Schluss nahe, dass diese donoranalogen Verbindungen Fluoreszenzsonden für alle Sialyltransferasen sind.

Teil III.

Experimenteller Teil

9. Chemische Synthesen

9.1. Materialien und Methoden

Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, *Merck*, *Acros*, *Lancaster*, *ABCR*, *Alfa Aesar* und *Bachem* erworben und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. 1*H*-Tetrazol wurde von der Firma *Molekula Ltd.* und 5-Benzylmercaptotetrazol sowie 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit von *emp Biotech GmbH* bezogen. Molsiebpulver (3 Å und 4 Å) wurde durch Erhitzen auf 250 °C für vier Stunden aktiviert und unter Stickstoff in einem Schlenkrohr gelagert. Die Darstellung des Triethylammoniumbicarbonatpuffers (TEAB) erfolgte nach eine Vorschrift von IP *et al*^[176].

Trockene Lösungsmittel wurden von der Firma Fluka absolutiert, über Molsieb lagernd erworben und ohne weitere Trocknung eingesetzt.

Reaktionen wurden bei Raumtemperatur unter Rühren durchgeführt. Wasser- oder luftempfindliche Reaktionen wurden in ausgeheizten Glasapparaturen unter Schlenkbedingungen mit N₂ als Schutzgas durchgeführt.

Mikrowellenunterstützte Synthesen wurden auf einem *Biotage Initiator 60* in Mikrowellen-Fläschchen mit Volumina von 0.2–0.5, 0.5–2, 2–5 und 10–20 mL durchgeführt.

Festphasenunterstützte Synthese wurde bei Standardkupplungsreaktionen in PP Spritzen mit PE Fritten der *Firma Roland Vetter Laborbedarf OHG* durchgeführt. Die initiale Beladung der Chlortritylharze wurde in Schlenkrohren unter N₂-Schutzgas durchgeführt.

Bestimmung der Harzbeladung erfolgte durch Fmoc-Abspaltung von einer definierten Harzmenge (2-10 mg) mit 10 mL Piperidin/DMF (20:80 *v/v*) und der hintergrundkorrigierten Messung der Extinktionen der Fluorenylgruppe^[257] ($\epsilon_{267 \text{ nm}} = 17.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{289 \text{ nm}} = 5.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{301 \text{ nm}} = 7.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) mit einem *JASCO* V-550 UV/Vis Spektrophotometer und Analyse mit der *JASCO* Spectra Manager Software (1.54.03). Die Harzbelegung ergibt sich aus dem Mittel der drei erhaltenen Werte.

Analytische Dünnschichtchromatographie (DC) wurde auf Kieselgel-Fertigfolien 60 F₂₅₄ 0.04–0.063 μm (*Merck*) durchgeführt. Die Visualisierung UV-absorbierender Substanzen erfolgte durch Beobachtung bei UV-Bestrahlung bei den Wellenlängen 254 oder 366 nm mit einem Nu-15 KL (*Benda Laborgeräte*). Nicht absorbierende Stoffe wurden durch Eintauchen des entwickelten DCs in eine Lösung aus 1 % Kalumpermanganat und 1 % Natriumhydrogencarbonat in Wasser und Trocknen sowie Erhitzen mit Heißluft angefärbt.

Präparative Säulenchromatographie erfolgte unter Verwendung von Kieselgel 60 (0.040–0.063 mm, 230–400 mesh) der Firma *Merck* und wurde als Flash-Chromatographie (Überdruck 0.1 bis 0.3 bar) durchgeführt. Die Eluentenzusammensetzungen werden in *v/v* angegeben.

Präparative Mitteldruckchromatographie (MPLC) wurde auf einer Anlage der Firma *Büchi* (Fraction Collector C-660 mit UV-Monitor C-630) durchgeführt. Es wurden Kartuschen unterschiedlicher Größen, gefüllt mit Kieselgel 60 (0.015–0.040 oder 0.040–0.063 mm) der Firma *Merck*, oder Fertigkartuschen der Firma *Büchi* verwendet. Die Eluentenzusammensetzungen werden in *v/v* angegeben. Die Detektion erfolgte bei Wellenlängen zwischen 254 und 280 nm.

Präparative HPLC Aufreinigungen erfolgten auf einer *Agilent* Anlage der 1100er Serie. Die Detektion erfolgte mit einem MWD und als Eluenten fanden Mischungen aus Wasser oder 0.5 M TEAB (pH 7.4) mit Acetonitril oder Methanol Verwendung. Die Trennungen erfolgten auf drei RP-18 Säulen unterschiedlicher Abmessungen:

- Säule A: *Macherey-Nagel* VP Nucleodur C18 ec 7 μm , 21 x 250 mm
- Säule B: *Macherey-Nagel* VP Nucleodur C18 ec 7 μm , 32 x 125 mm
- Säule C: *Agilent* SB-Zorbax 5 μm , 9.6 x 250 mm

Gefriertrocknungen erfolgten aus Wasser, Dioxan oder *t*-Butanol an einem ALPHA 2-4 LD plus der Firma *Christ*.

Analytische LC/MS erfolgte auf einer 1100 Serie der Firma *Agilent Technologies*, ausgestattet mit einem UV- und einem DAD-Detektor und gekoppelt mit einem Single-Quadrupol-Massenspektrometer. Die Ionisation erfolgte durch Electron-Spray-Ionisation (ESI; Kapillarspannung: 3.5 kV, Fragmentorspannung: 120 V). Als Eluenten dienten Mischungen aus Wasser mit Methanol oder Acetonitril, die mit 0.1 % Ameisensäure angesäuert wurden. Die Proben wurden in H₂O/MeOH/ACN gelöst und vor der Injektion durch einen Spritzenfilter (PTFE, 0.45 µm Porengröße) gefiltert. Es wurden folgende Trennsäulen verwendet: 1.) *Agilent Zorbax SB-C18 Rapid resolution cartridge* (3.5 µm, 2.1 x 30 mm); 2.) *Macherey-Nagel Nucleodur Sphinx RP* (3 µm, 2.0 x 50 mm); 3.) *Macherey-Nagel Nucleodur C18 ec* (3.5 µm, 4.0 x 30 mm, 100 Å Porengröße); 4.) *Macherey-Nagel Nucleodur C18 ec* (5 µm, 4.0 x 250 mm, 100 Å Porengröße); 5.) *Macherey-Nagel Nucleodur C18 ec* (5 µm, 4.0 x 125 mm, 100 Å).

Hochauflösende Massenspektrometrie erfolgte auf den Geräten:

- **Agilent 6210, ESI-TOF (*Agilent Technologies*)**: Die Flussrate betrug 4 µL/min, die Sprayspannung 4 kV. Das Desolvatisierungsgas wurde auf 15 psi (1 bar) gesetzt. Alle anderen Parameter wurden für eine maximale Abundanz des jeweiligen [M+H]⁺ optimiert.
- **Ionspec QFT-7, ESI-FTICR-MS (*Varian*)**: Die Proben wurden mit einem Ionspec QFT-7, ausgestattet mit einem 7 T supraleitenden Magneten und einer Micromass Z-Spray ESI-Quelle (*Waters Co.*, Saint-Quentin, Frankreich), analysiert. Die Solvensflussrate betrug 4 µL/min. Die Sprayspannung wurde auf 3.8 kV gesetzt. Alle anderen Parameter wurden auf eine maximale Abundanz des jeweiligen [M+H]⁺ ([M+Cat]⁺ oder [M-H]⁻) optimiert.

Kernmagnetische Resonanzspektroskopie-Messungen erfolgten an einem *AV300* (¹H: 300 MHz, ¹³C: 76 MHz, ¹⁹F: 282 MHz, ³¹P: 122 MHz), einem *AV600* (¹H: 600 MHz) des Herstellers *Bruker* oder an einem JEOL ECP500 (¹H: 500 MHz) bei einer Temperatur von 300 K. Die chemischen Verschiebungen werden in ppm angegeben und beziehen sich auf die Resonanzsignale der unvollständig deuterierten Lösungsmittel (DMSO-

d_6 : $\delta = 2.49$ ppm, CD_3OD : $\delta = 3.31$ ppm, D_2O $\delta = 5.051 - 0.0111 \times T$ [$^\circ\text{C}$] ppm^[258]) oder auf das Signal von TMS ($\delta = 0.00$ ppm). Heteronukleare-Spektren wurden ^1H -breitbandentkoppelt aufgenommen. ^{13}C -Spektren wurden intern auf die Lösungsmittelsignale kalibriert (CDCl_3 : $\delta = 77.00$ ppm, $\text{DMSO}-d_6$: $\delta = 39.52$ ppm, CD_3OD : 49.00 ppm), bei D_2O wurde extern auf CDCl_3 kalibriert. Für ^{31}P -Spektren diente 85 %ige Phosphorsäure ($\delta = 0.00$ ppm) und für ^{19}F -Spektren Trifluoressigsäure ($\delta = -76.55$ ppm) als externer Standard. Die Signalzuordnung erfolgte auf der Basis der chemischen Verschiebungen, durch Analyse der Kopplungssysteme und unter Zuhilfenahme zweidimensionaler NMR-Experimente (HH-COSY, DQF-COSY, HMQC, HMBC). Kopplungskonstanten werden in Hz angegeben und folgende Kürzel für die Signalmultiplizitäten verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quadruplett, quint = quintet, sext = sextett, sept = septett m = Multiplett, dd = Dublett von einem Dublett, dt = Dublett von einem Triplett und dq = Dublett von einem Quartett, Präfix b = verbreitert.

Bei ^{13}C -Signalen wird nur eine vom Singulett abweichende Multiplizität angegeben. Die Prozessierung der Spektrendaten und die Auswertung erfolgte mit dem Programm TopSpin (*Bruker*).

Infrarotspektroskopie wurde auf einem Bruker Vector 22, ausgestattet mit einer SplitPea[®] ATR-Einheit der Firma Harrick, durch direktes Aufpressen der Proben auf einen ZnSe-Kristall getätigt.

Optische Drehwerte wurden am Perkin Elmer 241-Polarimeter in einer 2 mL Mikroküvette mit der Na_D -Linie gemessen (Temperatur 23 $^\circ\text{C}$).

9.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAVs)

AAV1 Phosphoramiditkupplung

Das entsprechende α -Hydroxymethylphosphonat und das geschützte Cytidinphosphoramidit **1** wurden in trockenem DCM gelöst und gemeinsam mit Molsiebpulver (4 Å) für 30–60 min getrocknet. Anschließend wurden 1*H*-Tetrazol oder 5-Benzylthio-1*H*-tetrazol zugegeben und nach vollständiger Kupplungsreaktion (DC- oder LC-Kontrolle) wurde *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M in Decan) zugetropft. Es wurde bei Raumtemperatur

bis zur vollständigen Oxidation gerührt (DC-Kontrolle), das Molsiebpulver über Celite abfiltriert und die Lösung mit NaHCO_3 und Brine gewaschen. Nach Trocknung über Na_2SO_4 oder MgSO_4 und anschließender Entfernung des Trocknungs- und Lösungsmittels wurde das Produkt per HPLC oder MPLC gereinigt und im Feinvakuum getrocknet.

AAV2 Hydrogenolyse und basische Entschützung mit NaOMe

Die benzyl-, acetyl-, pivaloyl- und cyanoethylgeschützten Verbindungen wurden in trockenem MeOH gelöst und Pd/C 10% zugegeben. In mehreren Zyklen wurde das Reaktionsgefäß evakuiert und mit H_2 belüftet und anschließend wurde die Suspension bei leichtem H_2 -Überdruck (Ballon) intensiv gerührt. Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und nach Waschen mit MeOH wurde zu der Lösung NaOMe (1 M in MeOH) zugegeben. Nach vollständiger Entschützung (LC/MS-Kontrolle) wurde die Lösung mit Amberlite H^+ Ionenaustauscherharz neutralisiert und mit IR 120 Na^+ -Ionenaustauscherharz behandelt. Das Produkt wurde per HPLC (RP-18, 0.05 M TEAB-Puffer, ACN) gereinigt und mehrfache Lyophilisation aus H_2O und anschließende Behandlung mit IR 120 Na^+ -Ionenaustauscherharz ergaben die Natriumsalze der entschützten Zielverbindungen.

AAV3 Oxaziridinoxidation

Zu einer auf -90°C gekühlten Lösung des entsprechenden Benzylphosphonats in trockenem THF wurde NaHMDS (1 Äq., 1 M in THF) langsam zugetropft und die sich stark färbende Lösung bei -40°C gerührt. Nach Herunterkühlen der Reaktionslösung auf -90°C wurde (+)- oder (-)-(8,8-Dichlorcampherylsulfonyl)oxaziridin (gelöst in THF, 2 Äq.) langsam zugetropft und bei -78°C gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von NH_4Cl (ges.) bei -78°C gequenchet und die Suspension auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurde H_2O hinzugegeben und die Lösung mehrmals mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden mit Brine gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und per Flashchromatographie gereinigt (Kieselgel 0.040–0.063, DCM:MeOH 96:4).

AAV4 Reduktion und Kupplung

Variante a: Das entsprechende α -Hydroxymethylphosphonat und $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4 Äq.) wurden unter Stickstoff in absolutem Ethanol gelöst und zunächst für 20 h bei Raumtemperatur und dann bei 30 – 40°C gerührt, bis die Reaktionskontrolle (LC/MS-Analyse oder DC) eine vollständige Umsetzung zeigte. Die Reaktionslösung wurde mit 40 mL

EE verdünnt und mit 40 mL NaHCO₃ (ges.) sowie 30 mL Brine gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und nach Entfernen des Trocknungsmittels i.V. bei Raumtemperatur bis kurz vor die Trockene eingengt. Das labile Reduktionsprodukt wurde ohne weitere Reinigungsschritte in DCM aufgenommen, 6-Carboxy-di-*O*-pivaloylfluorescein **2-(6)** (1 Äq.) und EDC-HCl (1.5 Äq.) zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde nach vollständiger Umsetzung des Anilins durch Kieselgel oder Celite gefiltert, eingengt und per MPLC gereinigt. Anschließende Lyophilisation aus Dioxan ergab das Produkt als farlose bis blass gelbliche Feststoffe oder Pulver.

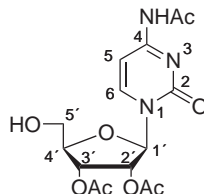
Variante b: Die Durchführung erfolgte analog zu der **Variante a**, wobei 9 Äq. SnCl₂·H₂O und 1.1 Äq. EDC-HCl eingesetzt wurden und die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Die Reaktionsäquivalente der Kupplungsreaktion bezogen sich auf die Rohausbaute des Reduktionsproduktes. Abweichend von **Variante a** wurde vor der MPCL-Reinigung wässrig aufgearbeitet (+20 mL DCM, 2 x 20 mL HCl (0.5 M), 20 mL NaHCO₃ (ges.), 20 mL Brine).

AAV5 Palladiumkatalysierte Desallylierung in MeOH mit K₂CO₃

Die allyl-, acetyl-, pivaloyl- und cyanoethylgeschützte Verbindung wurde unter N₂ in wenigen mL trockenem MeOH gelöst und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (Pd(PPh₃)₄) sowie K₂CO₃ (6 Äq.) zugegeben. Der Reaktionsfortschritt wurde per LC/MS-Analyse verfolgt und nach vollständiger Entschützung die Reaktionslösung im Stickstoffgasstrom auf 1–2 mL eingengt. Es wurde H₂O zugegeben und die wässrige Phase 2 x mit 2–3 mL Et₂O extrahiert und verbliebenes MeOH im Vakuum evaporiert. Die Lösung wurde durch einen 0.45 µm PP-Membran Spritzenfilter gefiltert, per HPLC gereinigt und lyophilisiert. Erfolgte die HPLC-Trennung in H₂O/ACN + 0.1% TFA wurde das Lyophilisat in TEAB-Puffer (0.5 M, pH 7.4) aufgenommen und mehrfach aus H₂O lyophilisiert. Das Triethylammoniumsalz der Produkte wurde mit IR-120 Na⁺-Ionenaustauscherharz in das Natriumsalz überführt und aus H₂O lyophilisiert.

9.3. Reagenzien und Edukte

*N*⁴-Acetyl-2',3'-di-*O*-acetylcytidin (**1a**)



Zu Cytidin (2.00 g, 8.22 mmol) in einem 20 mL Mikrowellengefäß wurden 12 mL trockenes MeOH und Essigsäureanhydrid (7.76 mL, 82.0 mmol, 10 Äq.) zugegeben. Das verschlossene Gefäß wurde in dem Mikrowellenreaktor für 8 min auf 80 °C erhitzt und der Inhalt nach Abkühlung auf eisgekühlten Et₂O gegeben. Der ausgefallene farblose Niederschlag wurde über einer gekühlten Fritte abgefiltert, mit kaltem Et₂O nachgewaschen und im Feinvakuum getrocknet (1.88 g, 6.59 mmol, 80 % Ausbeute bezüglich Cytidin). Das getrocknete *N*-acetylierte Cytidin wurde unter Stickstoff in 40 mL trockenem Pyridin suspendiert und Dimethoxytritylchlorid (3.35 g, 9.89 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben. Nach einer Stunde klärte sich die Lösung und es wurde langsam Essigsäureanhydrid (3.1 mL, 33.0 mmol, 3 Äq.) zugegeben. Nach Reaktion über Nacht (17 h) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 50 mL EE aufgenommen. Die organische Lösung wurde mit 2 x 50 mL NaHCO₃ (ges.), 1 x 50 mL H₂O sowie 1 x 50 mL Brine gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Trocknungs- und des Lösungsmittels sowie Trocknen im Feinvakuum wurde das Rohprodukt zwei Mal über MPLC gereinigt (Kieselgel 0.015–0.040, DCM/MeOH-Gradient: [B] = 3–10 %) und ergab *N*⁴-Acetyl-2',3'-di-*O*-acetyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-cytidin als fast farblosen Feststoff (3.81 g, 5.67 mmol, 69 % Ausbeute bezüglich Cytidin). Die DMTr-Gruppe wurde nach der Zugabe von 20 mL 80 %iger Essigsäure innerhalb 1 h abgespalten. Es wurden 30 mL H₂O zugegeben und nach Einfrieren der Lösung die Solventien durch Gefrieretrocknung entfernt. Das Lyophilisat wurde in Dioxan/H₂O aufgenommen und gefrieretrocknet. Nach Reinigung über MPLC (Kieselgel 0.015–0.040, CHCl₃/MeOH-Gradient: [B] = 3–10 %) wurde das Produkt **1a** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.68 g, 4.55 mmol (55 %), C₁₅H₁₉N₃O₈, M = 369.33 g/mol

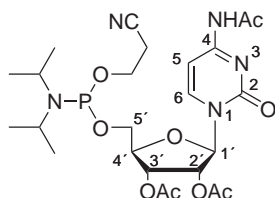
*R*_f = 0.10 (CHCl₃/MeOH 95:5)

ESI-LC/MS: *m/z* = 370.1 [M+H]⁺

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.92 (s, 1H, NH), 8.31 (d, 1H, ³*J* = 7.5 Hz, Ar-H), 7.21 (d, 1H, ³*J* = 7.5 Hz, Ar-H), 6.10 (d, 1H, ³*J* = 5.0 Hz, H-1'), 5.39 (dd, 1H, ³*J* = 5.3 Hz, ³*J* = 5.3 Hz, H-2'), 5.31 (dd, 1H, ³*J* = 5.0 Hz, ³*J* = 5.0 Hz, H-3'), 4.17 (m, 1H, H-4'), 3.72 (dd, 1H, ³*J*_{5b',4'} = 2.7 Hz, ²*J*_{5b',5a'} = 12.2 Hz, H-5b'), 3.61 (dd, 1H, ³*J*_{5a',4'} = 2.7 Hz, ²*J*_{5a',5b'} = 12.2 Hz, H-5a'), 2.10 (s, 3H, Acetyl), 2.07 (s, 3H, Acetyl), 2.03 (s, 3H, Acetyl) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 173.33 (*N*-Acetyl), 171.78 (3'-*O*-Acetyl), 171.52 (2'-*O*-Acetyl), 164.83 (C-4), 158.26 (C-2), 146.75 (C-6), 98.75 (C-5), 90.46 (C-1'), 85.24 (C-4'), 75.92 (C-2'), 72.34 (C-3'), 62.09 (C-5'), 24.86 (*N*-Acetyl), 22.77 (3'-*O*-Acetyl), 20.62 (2'-*O*-Acetyl) ppm.

(*N*⁴-Acetyl-2',3'-di-*O*-acetylcytidin-5'-yl)-2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit (1)



1a (0.40 g, 1.1 mmol) und Tetrazol-Diisopropylamin¹ (92.7 mg, 0.54 mmol, 0.5 Äq.) wurden gemeinsam in einem Schlenkrohr im Feinvakuum für eine Stunde getrocknet, anschließend in trockenem DCM (6 mL) aufgenommen und aktiviertes Molsiebpulver (4 Å) hinzugegeben. Nach weiteren 30 min wurde 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit (0.49 μ l, 0.46 mg, 1.5 mmol) zugegeben und für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Molsiebpulver wurde abfiltriert und die Reaktionslösung direkt auf eine MPLC-Kieselgelsäule injiziert (Kieselgel 0.040–0.063, EE + 1 % Et₃N). Das Produkt wurde nach Entfernen des Lösungsmittels und Lyophilisation aus Dioxan als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.54 g, 0.95 mmol (86 %), C₂₄H₃₆N₅O₉P, M = 569.54 g/mol

R_f = 0.18 (EE + 1 % Et₃N)

HRMS (ESI-FTICR): *m/z*[M+H]⁺ ber.: 570.2316, gef.: 570.2316; Δ = 1.23 ppm

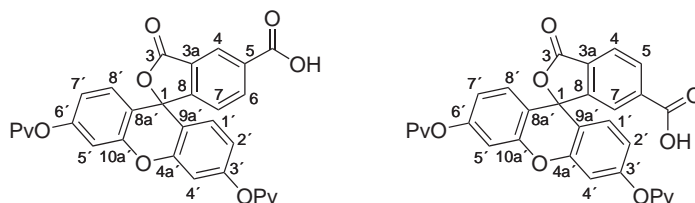
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.95 (s, 1H, NH), 7.50 + 7.53 (2 d, 1H, 2 x ³*J* = 7.5 Hz, H-6), 7.22 (d, 1H, ³*J* = 7.5 Hz, H-5), 6.01 + 5.96 (2 d, 1H, ³*J* = 4.3 Hz, ³*J*

¹Tetrazol-Diisopropylamin wurde durch die Reaktion von 1*H*-Tetrazol mit Diisopropylamin in ACN dargestellt.

= 4.2 Hz, H-1'), 5.28-5.45 (2 m, 2H, H-2', H-3'), 4.35-4.27 (m, 1H, H-4'), 3.97-3.67 (m, 4H, H-5a', H-5b', OCH₂CH₂CN, 3.66-3.50 (m, 2H, NCH(CH₃)₂), 2.76 (q, 2H, ³J = 6.0 Hz, OCH₂CH₂CN), 2.13-2.00 (m, 9H, Acetyl), 1.21-1.06 (m, 12H, NCH(CH₃)₂) ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 151.31 + 150.06 (2 s) ppm.

5- und 6-Carboxy-di-O-pivaloylfluorescein (2-(5) und 2-(6))



5/6-Carboxyfluorescein (8.60 g, 22.85 mmol) wurde in 75 mL trockenem DMF gelöst und Cs₂CO₃ (7.45 g, 22.85 mmol, 1 Äq.) zugegeben. Nachdem sich dieses teilweise gelöst hat, wurde langsam Pivaloylanhydrid (13.9 mL, 12.77 g, 68.56 mmol, 3 Äq.) zugetropft und über Nacht (18 h) gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer evaporiert, der Rückstand in 80 mL EE aufgenommen, mit 1 x 150 und 2 x 50 mL NaHCO₃, 100 mL Phosphatpuffer (0.35 M NaHCO₃/KHCO₃, pH 7.0), 100 mL HCl (0.1 M) und 100 mL Brine gewaschen und anschließend die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. 5/6-Die Isomerenmischung des geschützten Carboxyfluoresceins **2-(5/6)** wurde als gelber Feststoff erhalten (11.44 g, 21.0 mmol, 92 %). Der Feststoff wurde in absolutiertem Ethanol gelöst und das 6-Isomer durch Zugabe von Diisopropylamin und Kühlung der Lösung auf -20 °C als das Diisopropylammoniumsalz gefällt. Der Niederschlag wurde abgetrennt, mit kaltem Ethanol gewaschen, in EE suspendiert, mit 3 x 100 mL HCl (0.1 M) und 100 mL Brine gewaschen und die org. Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Das Produkt **2-(6)** wurde blass gelber Feststoff gewonnen (4.25 g, 7.8 mmol, 34 %). Das Filtrat mit dem Diisopropylammoniumsalz von **2-(5)** wurde eingengt und der erhaltene Feststoff analog zu der Aufarbeitung des Diisopropylammoniumsalzes von **2-(6)** behandelt. **2-(5)** wurde als ebenfalls leicht gelber Feststoff isoliert (6.04 g, 11.1 mmol, 49 %).

Gesamtausbeute: 10.29 g, 18.91 mmol (83 %), C₃₁H₂₈O₉, M = 544.55 g/mol

R_f = 0.58 (DCM/MeOH 90:10 + 3 % HCOOH)

HRMS (ESI-FTICR): *m/z*[M+H]⁺ ber.: 545.1806, gef.: 545.1794; Δ = 2.20 ppm

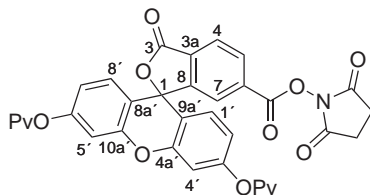
5-Isomer: *R_f* = 0.58 (DCM/MeOH 90:10 + 3 % HCOOH)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.45 (bs, 1H, H-4), 8.32 (dd, 1H, $^3J_{6,7}$ = 8.1 Hz, $^4J_{6,4}$ = 1.4 Hz, H-6), 7.51 (d, 1H, $^3J_{7,6}$ = 8.0 Hz, H-7), 7.26 (d, 2H, $^4J_{4'/5',2'/7'}$ = 2.1 Hz, H-4'/H-5'), 6.97 (d, 2H, $^3J_{1'/8',2'/7'}$ = 7.0 Hz, H-1'/H-8'), 6.91 (d, 2H, $^3J_{2'/7',4'/5'}$ = 7.0 Hz, $^4J_{2'/7',1'/8'}$ = 2.1 Hz, H-2'/H-7'), 1.30 (s, 18H, Pv) ppm.

6-Isomer: R_f = 0.58 (DCM/MeOH 90:10 + 3% HCOOH)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.27 (dd, 1H, $^3J_{5,4}$ = 7.9 Hz, $^4J_{5,7}$ = 1.2 Hz, H-5), 8.17 (d, 1H, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, H-4), 7.81 (s, 1H, H-7), 7.27 (d, 2H, $^4J_{4'/5',2'/7'}$ = 2.0 Hz, H-4'/H-5'), 6.93 (m, 4H, H-1'/H-8', H-2'/H-7'), 1.31 (s, 18H, Pv) ppm.

6-Carboxy-di-*O*-pivaloylfluorescein-*N*-succimidylester (**2-(6)-OSu**)



6-Carboxy-di-*O*-pivaloylfluorescein (**2-(6)**) (0.62 g, 1.14 mmol) und *N*-Hydroxysuccinimid (0.40 g, 2.1 mmol, 1.8 Äq.) wurden unter Stickstoff in 16 mL DCM gelöst und EDC-HCl (0.24 g, 2.1 mmol, 1.8 Äq.) zugegeben. Nach Rühren für 30 min wurde die Reaktionslösung eingengt, in DCM/EE aufgenommen, mit 3 x 40 mL H₂O und 20 mL Brine gewaschen und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Reinigung per MPLC (Kieselgel 0.040–0.063, Hex/EE-Gradient: [B] = 10–90%) ergab **2-(6)-OSu** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 0.64 g, 1.00 mmol (88%), C₃₅H₃₁O₁₁, M = 641.62 g/mol

R_f = 0.43 (EE/Hex 50:50)

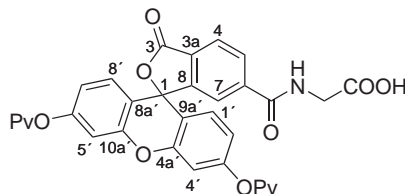
HRMS (ESI-FTICR): m/z [M+H]⁺ ber.: 642.1970, gef.: 642.1978; Δ = 1.25 ppm

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.44 (dd, 1H, $^3J_{5,4}$ = 8.0 Hz, $^4J_{5,7}$ = 1.4 Hz, H-5), 8.29 (d, 1H, $^3J_{4,5}$ = 8.0 Hz, H-4), 7.04 (s, 1H, H-7), 7.18 (d, 2H, $^4J_{4'/5',2'/7'}$ = 2.2 Hz, H-4'/H-5'), 6.96 (d, 2H, $^3J_{1'/8',2'/7'}$ = 8.7 Hz, H-1'/H-8'), 6.98 (d, 2H, $^3J_{2'/7',4'/5'}$ = 8.7 Hz, $^4J_{2'/7',1'/8'}$ = 2.2 Hz, H-2'/H-7'), 2.87 (s, 4H, OSu-CH₂), 1.33 (s, 18H, Pv) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (76 MHz, DMSO- d_6): δ = 175.5 (Pv-Carbonyl), 169.3 (OSu-Carbonyl), 166.7 (C-3), 160.4 (COOSu), 152.4 (C-3'/C-6'), 152.3 (C-8), 150.9 (C-4a'/C-10a'), 131.8 (C-5), 131.1 (C-6), 130.8 (C-3a), 128.9 (C-1'/C-8'), 126.2 (C-4), 125.4 (C-7), 118.0 (C-2'/C-7'), 115.0 (C-8a'/C-9a'), 110.1 (C-4'/C-5'), 81.5 (C-1), 38.5 (Pv-

$\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$, 26.5 (Pv-C($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃), 25.3 (OSu-CH₂) ppm.

***N*-(6-(Di-*O*-pivaloylfluoresceinyl)carbonyl)-glycin (2-(6)-G)**



Glycin (62.4 mg, 0.831 mmol) wurde in 3 mL DCM suspendiert und Trimethylsilylchlorid (0.22 mL, 1.74 mmol, 2 Äq.) sowie Diisopropylethylamin (0.43 mL, 2.48 mmol, 3 Äq.) zugegeben. Nach Rühren über Nacht klärte sich die Lösung, es wurde 6-Carboxy-di-*O*-pivaloylfluorescein-*N*-succimidylester (**2-(6)-OSu**) (502.7 mg, 0.784 mmol, 0.95 Äq.) hinzugefügt und für weitere 8.5 h gerührt. Die flüchtigen Bestandteile der Reaktionslösung wurden evaporiert und eine MPLC-Reinigung (Kieselgel 0.040–0.063, DCM/MeOH-Gradient (+1 % CH₃COOH): [B] = 5–25 %) ergab **2-(6)-G** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 446.2 mg, 0.742 mmol (89 %), C₃₃H₃₁NO₁₀, M = 601.60 g/mol

R_f = 0.24 (EE/MeOH 95:5)

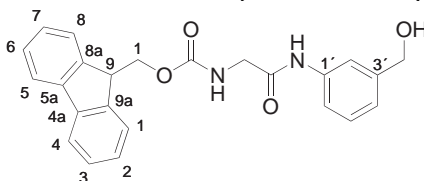
HRMS (ESI-FTICR): m/z [M+H]⁺ ber.: 602.2021, gef.: 602.2052; Δ = 5.15 ppm

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 8.02 (m, 2H, H-4, H-5), 7.58 (bs, 1H, H-7), 7.37 (bt, 1H, ³J_{NH,CH₂} = 5.4 Hz, NH), 6.98 (d, 2H, ⁴J_{4'/5',2'/7'} = 1.7 Hz, H-4'/H-5'), 6.80–6.72 (m, 4H, H-1'/H-8', H-2'/H-7'), 3.97 (d, 2H, ³J_{CH₂,NH} = 5.3 Hz, CH₂), 1.33 (s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 176.9 (Pv-Carbonyl), 172.2 (COOH), 168.2 (C-3'), 166.2 (CONH), 153.2 (C-8), 152.6 (C-3'/C-6'), 151.4 (C-4a'/C-10a'), 139.9 (C-6), 129.6 (C-5), 128.9 (C-1'/C-8'), 128.5 (C-3a), 125.6 (C-4), 122.7 (C-7), 117.9 (C-2'/C-7'), 115.5 (C-8a'/C-9a'), 110.4 (C-4'/C-5'), 81.9 (C-1), 67.0 (CH₂), 39.2 (Pv-C($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃), 27.0 (Pv-C($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃) ppm.

9.4. Synthese der diastereomergemischten FP-Sonden

2-Fmoc-amino-*N*-(3-hydroxymethylphenyl)-acetamid (**9**)



Zu einer Lösung von 3-Aminobenzylalkohol (400.0 mg, 3.25 mmol) und Fmoc-Glycin (968.0 mg, 3.25 mmol, 1 Äq.) in 80 mL trockenem DCM wurde EDC-HCl (685.0 mg, 3.57 mmol, 1.1 Äq) zugegeben. Das Produkt **9** fiel als farbloser Feststoff aus der Lösung aus wurde abfiltriert und mit DCM gewaschen.

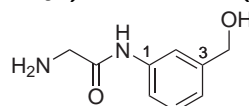
Ausbeute: 1.21 g, 3.01 mmol (93 %), C₂₄H₂₂N₂O₄, 402.44 g/mol

$R_f = 0.47$ (EE/MeOH 95:5)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆/CHCl₃-*d*₁ 92:8): $\delta = 9.94$ (s, 1H, Aryl-NH), 7.86 (d, 2H, $^3J_{4/5,3/6} = 7.4$ Hz, H-4/H-5), 7.73 (d, 2H, $^3J_{1/8,2/7} = 7.3$ Hz, H-1/H-8), 7.60 (m, 2H, H-2', Carbamat-NH), 7.51 (d, 1H $^3J_{6',5'} = 8.0$ Hz, H-6'), 7.41 (dd, 2H, $^3J_{3/6,4/5} = 7.4$ Hz, $^3J_{3/6,2/7} = 7.4$ Hz, H- 3/H-6), 7.33 (dd, 2H, $^3J_{2/7,1/8} = 7.3$ Hz, $^3J_{2/7,3/6} = 7.3$ Hz, H-2/H-7), 7.24 (dd, 1H, $^3J_{5',4'} = 7.8$ Hz, $^3J_{5',6'} = 7.8$ Hz, H-5'), 7.00 (d, 1H, $^3J_{4',5'} = 7.5$ Hz, H-4'), 5.18 (t, 1H, $^3J_{\text{OH},\text{CH}_2\text{OH}} = 5.4$ Hz, OH), 4.49 (d, 2H, $^3J_{\text{CH}_2\text{OH},\text{OH}} = 5.0$ Hz, CH₂OH), 4.33 (d, 2H, $^3J_{1,9'} = 6.8$ Hz, Fmoc-CH₂), 4.24 (t, 1H, $^3J_{9,\text{Fmoc-CH}_2} = 6.9$ Hz, H-9), 3.84 (d, 2H, $^3J_{\text{G-CH}_2,\text{C-NH}} = 6.0$ Hz, Glycin-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, DMSO-*d*₆/CHCl₃-*d*₁ 92:8): $\delta = 167.8$ (Carbamat-Carbonyl), 156.5 (Amid-Carbonyl), 143.8 (C-8a, C-9a), 143.1 (C-3'), 140.7 (C-4a, C-5a), 138.7 (C-1'), 128.2 (C-5'), 127.5 (C-3, C-6), 127.0 (C-2, C-7), 125.1 (C-1, C-8), 121.2 (C-4'), 119.9 (C-4, C-5), 117.4 (C-6'), 117.2 (C-2'), 65.7 (Fmoc-CH₂), 62.9 (C-Benzyl), 46.6 (C-9), 44.0 (Glycin-CH₂) ppm.

2-Amino-*N*-(3-hydroxymethylphenyl)-acetamid (**3-m-G**)



10 (0.99 g, 2.36 mmol) wurde in 10 mL trockenem DCM suspendiert und Piperidin zugegeben (7.0 mL, 70.6 mmol, 30 Äq.). Nach 4 h zeigte eine DC-Kontrolle eine voll-

ständige Umsetzung und die Lösung wurde eingeeengt. Dabei fiel ein farbloser Feststoff aus, der bei Zugabe von Hexan ein Öl bildete. Das Öl wurde mehrmals mit Hexan extrahiert und anschließend auf Kieselgel absorbiert. Das Rohprodukt wurde per MPLC gereinigt (Kieselgel 0.040–0.063, EE/MeOH-Gradient: [B] = 0–99 %) und anschließend mit EE aus MeOH als farbloser Feststoff ausgefällt. **3-m-G** wurde als farblose Kristalle erhalten, die im Feinvakuum getrocknet wurden.

Ausbeute: 218.5 mg, 1.21 mmol (51 %), C₉H₁₂N₂O₄, 180.20 g/mol

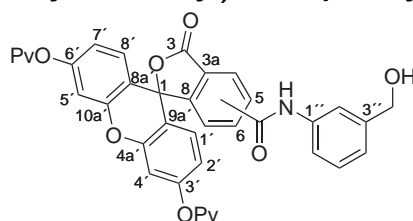
R_f = 0.13 (EE/MeOH 80:20)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 181.0972, gef.: 181.0966; Δ = 3.31 ppm.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.70 (s, 1H, NH₂), 8.29 (bs 3H, NH₂), 7.56 (s, 1H, H-2), 7.51 (d, 1H, ³J_{6,5} = 8.0 Hz, H-6), 7.27 (dd, 1H, ³J_{5,4} = 7.8 Hz, ³J_{5,6} 7.8 Hz, H-5), 7.02 (d, 1H, ³J_{4,5} = 7.6 Hz, H-4), 5.25 (t, 1H, ³J_{OH,CH₂OH} = 5.6 Hz, OH), 4.46 (d, 2H, ³J_{CH₂OH,OH} = 5.2 Hz, CH₂OH), 3.84 (s, 2H, Glycin-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 164.7 (Carbonyl), 143.5 (C-3), 138.2 (C-1), 128.6 (C-5), 121.8 (C-4), 117.5 (C-6), 117.1 (C-2), 62.7 (C-Benzyl), 41.0 (Glycin-CH₂), ppm.

5/6-(3-(Hydroxymethyl)phenylcarbamoyl)-di-*O*-pivaloylfluorescein (4-*m*-(5/6))



Zu 3-Aminobenzylalkohol (50.0 mg, 0.406 mmol) und **2-(5/6)** (221.7 mg, 0.407 mmol, 1 Äq.) in 4 mL DCM wurde EDC-HCl (73.6 mg, 0.384 mmol, 0.95 Äq.) zugegeben. Nach vollständiger Umsetzung (DC-Kontrolle) wurde DCM zugegeben, mit 30 mL HCl (0.5 M) und 30 mL NaHCO₃ (ges.) gewaschen und die org. Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Die 5- und 6-Isomere **4-*m*-(5)** und **4-*m*-(6)** wurden per MPLC (Kieselgel 0.015–0.040, Hex/EE 50:50) getrennt und als farblose Feststoffe isoliert. Nach der NMR-Charakterisierung wurden die Isomere vereinigt.

Ausbeute: 190.4 mg, 0.293 mmol (76 %), C₃₈H₃₅NO₉, 649.69 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 650.2385, gef.: 650.2391; Δ = 0.92 ppm.

5-Isomer: **R_f** = 0.17 (EE/Hex 50:50)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHCl_3-d_1 / $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$): δ = 10.17 (s, 1, NH), 8.63 (brs, 1H, H-4), 8.35 (dd, 1H, $^3J_{6,7} = 8.0$ Hz, $^4J_{6,4} = 1.4$ Hz, H-6), 7.68 (brs, 1H, H-2''), 7.66 (d, 1H, $^3J_{6'',5''} = 7.6$ Hz, H-6''), 7.37 (dd, 1H, $^3J_{5'',4''} = 7.8$ Hz, $^3J_{5'',6''} = 7.8$ Hz, H-5''), 7.34 (d, 1H, $^3J_{7,6} = 8.1$ Hz, H-7), 7.18 (d, 1H, $^3J_{4'',5''} = 7.6$ Hz, H-4''), 7.11 (d, 2H, $^4J_{4'/5',2'/7'} = 1.7$ Hz, H-4'/H-5'), 6.85 (m, 4H, H-1'/H-8', H-2'/H-7'), 4.67 (s, 2H, CH_2OH), 1.38 (s, 18H, Pv) ppm.

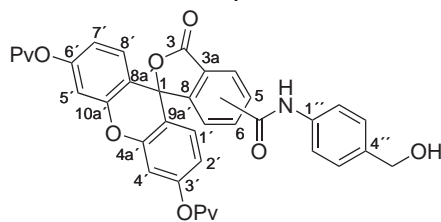
$^{13}\text{C-NMR}$ (76 MHz, CHCl_3-d_1 / $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$; referenziert auf CH_3OH): δ = 177.4 (Pv-Carbonyl), 169.4 (C-3), 165.5 (Amid-Carbonyl), 155.8 (C-8), 153.3 (C-3'/C-6'), 152.1 (C-4a'/C-10a'), 142.6 (C-3''), 138.5 (C-1''), 138.0 (C-5), 135.7 (C-6), 129.3 (C-5''), 129.2 (C-1'/C-8'), 126.8 (C-3a), 124.9 (C-7), 124.8 (C-4), 123.8 (C-4''), 120.6 (C-6''), 120.1 (C-2''), 118.4 (C-2'/C-7'), 116.0 (C-8a'/C-9a'), 110.9 (C-4'/C-5'), 82.8 (C-1), 64.6 (Benzyl-C), 39.6 (Pv-C(CH_3)₃), 27.2 (Pv-C(CH_3)₃) ppm.

6-Isomer: $R_f = 0.27$ (EE/Hex 50:50)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHCl_3-d_1): δ = 8.92 (s, 1H, NH), 8.08 (dd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.1$ Hz, $^4J_{5,7} = 0.9$ Hz, H-5), 7.95 (d, 1H, $^3J_{4,5} = 8.1$ Hz, H-4), 7.62 (s, 1H, H-7), 7.42 (bs, 1H, H-2''), 7.31 (bd, 1H, $^3J_{6'',5''} = 8.0$ Hz, H-6''), 7.10 (dd, 1H, $^3J_{5'',4''} = 7.8$ Hz, $^3J_{5'',6''} = 7.8$ Hz, H-5''), 6.93 (d, 1H, $^3J_{4'',5''} = 7.7$ Hz, H-4''), 6.92 (d, 2H, $^4J_{4'/5',2'/7'} = 2.1$ Hz, H-4'/H-5'), 6.75 (d, 2H, $^3J_{1'/8',2'/7'} = 8.7$ Hz, H-1'/H-8'), 6.68 (dd, 2H, $^3J_{2'/7',1'/8'} = 8.7$ Hz, $^4J_{2'/7',4'/5'} = 2.1$ Hz, H-2'/H-7'), 4.37 (s, 2H, CH_2OH), 2.87 (bs, 1H, OH), 1.34 (Pv-C(CH_3)₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (76 MHz, CHCl_3-d_1): δ = 176.8 (Pv-Carbonyl), 168.0 (C-3), 163.7 (Amid-Carbonyl), 152.9 (C-8), 152.5 (C-3'/C-6'), 151.2 (C-4a'/C-10a'), 141.7 (C-3''), 141.1 (C-6), 137.5 (C-1''), 130.0 (C-5), 128.7 (C-1'/C-8'), 128.7 (C-5''), 128.2 (C-3a), 125.5 (C-4), 123.2 (C-4''), 122.3 (C-7), 119.7 (C-6''), 119.2 (C-2''), 117.8 (C-2'/C-7'), 115.5 (C-8a'/C-9a'), 110.4 (C-4'/C-5'), 81.7 (C-1), 64.4 (Benzyl-C), 39.1 (Pv-C(CH_3)₃), 26.9 (Pv-C(CH_3)₃) ppm.

5/6-(4-(Hydroxymethyl)phenylcarbamoyl)-di-O-pivaloylfluorescein (4-p-(5/6))



Zu 4-Aminobenzylalkohol (77.3 mg, 0.628 mmol) und **2-(5/6)** (323.9 mg, 0.595 mmol,

1 Äq.) in DCM wurde EDC-HCl (110.1 mg, 0.575 mmol, 0.95 Äq.) zugegeben. Nach vollständiger Umsetzung (DC-Kontrolle) wurde DCM zugegeben, mit 30 mL HCl (0.5 M) und 30 mL NaHCO₃ (ges.) gewaschen und die org. Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Die 5- und 6-Isomere **4-p-(5)** und **4-p-(6)** wurden per MPLC (Kieselgel 0.015–0.040, Hex/EE 50:50) getrennt und als farblose Feststoffe isoliert. Nach der NMR-Charakterisierung wurden die Isomere vereinigt.

Ausbeute: 269.0 mg, 0.414 mmol (72 %), C₃₈H₃₅NO₉, 649.69 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 650.2385, gef.: 650.2390; Δ = 0.77 ppm

5-Isomer: R_f = 0.53 (EE/Hex 80:20)

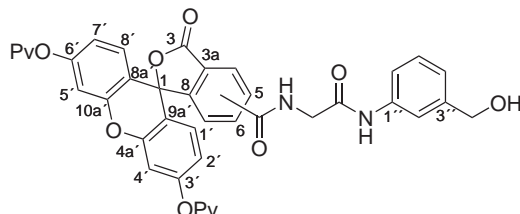
¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 9.04 (s, 1H, NH), 8.60 (s, 1H, H-4), 8.25 (dd, 1H, ³J_{6,7} = 8.1 Hz, ⁴J_{6,4} = 1.0 Hz, H-6), 7.55 (d, 2H, ³J_{2''/6'',3''/5''} = 8.4 Hz, H-2''/H-6''), 7.19 (d, 2H, ³J_{3''/5'',2''/6''} = 8.4 Hz, H-3''/H-5''), 7.18 (d, 1H, ³J_{7,6} = 8.0 Hz, H-7), 7.04 (bs, 2H, H-4'/H-5'), 6.77 (bs, 4H, H-1'/H-8', H-2'/H-7'), 4.55 (s, 2H, CH₂OH), 2.93 (bs, 1H, OH), 1.35 (s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 176.7 (Pv-Carbonyl), 168.7 (C-3), 164.0 (Amid-Carbonyl), 155.2 (C-8), 152.7 (C-3'/C-6'), 151.4 (C-4a'/C-10a'), 137.6 (C-1''), 137.1 (C-5), 136.9 (C-4''), 135.4 (C-6), 128.7 (C-1'/C-8'), 127.5 (C-3''/C-5''), 126.2 (C-3a), 124.4 (C-7), 123.8 (C-4), 120.7 (C-2''/C-6''), 117.9 (C-2'/C-7'), 115.4 (C-8a'/C-9a'), 110.4 (C-4'/C-5'), 82.3 (C-1), 64.4 (Benzyl-C), 39.1 (Pv-C(CH₃)₃), 26.9 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

6-Isomer: R_f = 0.57 (EE/Hex 80:20)

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 8.93 (s, 1H, NH), 8.10 (dd, 1H, ³J_{5,4} = 8.0 Hz, ⁴J_{5,7} = 1.0 Hz, H-5), 7.98 (d, 1H, ³J_{4,5} = 8.0 Hz, H-4), 7.60 (s, 1H, H-7), 7.37 (d, 2H, ³J_{2''/6'',3''/5''} = 8.4 Hz, H-2''/H-6''), 7.11 (d, 2H, ³J_{3''/5'',2''/6''} = 8.5 Hz, H-3''/H-5''), 6.92 (d, 2H, ⁴J_{4'/5',2'/7'} = 2.1 Hz, H-4'/H-5'), 6.70 (d, 2H, ³J_{1'/8',2'/7'} = 8.7 Hz, H-1'/H-8'), 6.64 (dd, 2H, ³J_{2'/7',1'/8'} = 8.7 Hz, ⁴J_{2'/7',4'/5'} = 2.1 Hz, H-2'/H-7'), 4.49 (s, 2H, CH₂OH), 2.56 (bs, 1H, OH), 1.35 (s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 176.9 (Pv-Carbonyl), 168.0 (C-3), 163.6 (Amid-Carbonyl), 152.9 (C-8), 152.5 (C-3'/C-6'), 151.2 (C-4a'/C-10a'), 141.1 (C-6), 137.5 (C-1''), 136.7 (C-4''), 129.9 (C-5), 128.6 (C-1'/C-8'), 128.2 (C-3a), 127.4 (C-3''/C-5''), 125.4 (C-4), 122.3 (C-7), 120.5 (C-2''/C-6''), 117.7 (C-2'/C-7'), 115.5 (C-8a'/C-9a'), 110.4 (C-4'/C-5'), 81.7 (C-1), 64.4 (Benzyl-C), 39.1 (Pv-C(CH₃)₃), 26.9 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

5/6-(2-(3-(Hydroxymethyl)phenyl)-2-oxoethylcarbamoyl)-di-O-pivaloylfluorescein (4-m-G-(5/6))


Das Amin **3-m-G** (112.3 mg, 0.623 mmol) und **2-(5/6)** (340.6 mg, 0.62 mmol, 1 Äq.) wurden in einer Mischung aus DCM (6.2 mL) und DMF (2.0 mL) gelöst und EDC-HCl (125.2 mg, 0.65 mmol, 1.05 Äq) zugegeben. Nach Reaktion über Nacht (24 h) wurden **4-m-G-(5)** und **4-m-G-(5/6)** per MPLC-Reinigung (Kieselgel 0.015–0.040, Hex/EE-Gradient + 1 % Et₃N: [B] = 40–100 %) als farblose Feststoffe isoliert. Nach der NMR-Charakterisierung wurden die Isomere vereinigt.

Ausbeute: 131.9 mg, 0.187 mmol (30 %), C₄₀H₃₈N₂O₁₀, 706.74 g/mol

5-Isomer: $R_f = 0.33$ (EE/Hex 80:20)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+Na]⁺ ber.: 729.2419, gef.: 729.2358; $\Delta = 8.36$ ppm

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 9.24$ (bs, 1H, Aryl-NH), 8.53 (bs, 1H, H-4), 8.32 (t, 1H, ³J_{G-NH,G-CH₂} = 5.0 Hz, Glycin-NH), 8.15 (bd, 1H, ³J_{6,7} = 8.0 Hz, H-6), 7.47 (bs, 1H, H-2''), 7.38 (bd, 1H, ³J_{6'',5''} = 8.2 Hz, H-6''), 7.12 (d, 1H, ³J_{7,6} = 8.1 Hz, H-7), 7.08 (dd, 1H, ³J_{5'',4''} = 7.8 Hz, ³J_{5'',6''} = 7.8 Hz, H-5''), 7.03 (m, 2H, H-4'/H-5'), 6.91 (bd, 1H, ³J_{4'',5''} = 7.6 Hz, H-4''), 6.75 (m, 4H, H-1'/H-8', H-2'/H-7'), 4.50 (s, 2H, CH₂OH), 4.28 (bd, 2H, ³J_{G-CH₂,G-NH} = 4.0 Hz, Glycin-CH₂), 3.56 (bs, 1H, OH), 1.34 (s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 176.5$ (Pv-Carbonyl), 168.6 (-CH₂C(=O)-), 167.6 (C-3), 166.5 (Amid-Carbonyl), 155.4 (C-8), 152.7 (C-3'/C-6'), 151.5 (C-4a'/C-10a'), 142.0 (C-3''), 137.7 (C-1''), 135.5 (C-5), 134.8 (C-6), 128.9 (C-5''), 128.8 (C-1'/C-8'), 126.4 (C-3a), 124.3 (C-7), 124.2 (C-4), 122.9 (C-4''), 119.0 (C-6''), 118.4 (C-2''), 117.9 (C-2'/C-7'), 115.4 (C-8a'/C-9a'), 110.3 (C-4'/C-5'), 82.3 (C-1), 64.4 (Benzyl-C), 44.4 (Glycin-CH₂), 39.1 (Pv-C(CH₃)₃), 27.0 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

6-Isomer: $R_f = 0.27$ (EE/Hex 80:20)

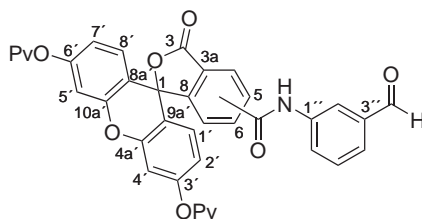
HRMS (ESI-TOF): m/z [M+Na]⁺ ber.: 729.2419, gef.: 729.2418; $\Delta = 0.14$ ppm

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 8.63$ (s, 1H, Aryl-NH), 8.54 (bt, 1H, ³J_{G-NH,G-CH₂} = 5.1 Hz, Glycin-NH), 7.97 (d, 1H, ³J_{4,5} = 8.0 Hz, H-4), 7.89 (dd, 1H,

$^3J_{5,4} = 8.0$ Hz, $^4J_{5,7} = 1.0$ Hz, H-5), 7.67 (s, 1H, H-7), 7.29 (bs, 1H, H-2''), 7.08 (m, 2H, H-5'', H-6''), 6.94 (m, 1H, H-4''), 6.84 (d, 2H, $^4J_{4'/5',2'/7'} = 2.0$ Hz, H-4'/H-5'), 6.82 (dd, 2H, $^3J_{2'/7',1'/8'} = 10.6$ Hz, $^4J_{2'/7',4'/5'} = 2.0$ Hz, H-2'/H-7'), 6.77 (d, 2H, $^3J_{1'/8',2'/7'} = 8.6$ Hz, H-1'/H-8'), 4.42 (s, 2H, CH₂OH), 3.98 (bd, 2H, $^3J_{G-CH_2,G-NH} = 5.1$ Hz, Glycin-CH₂), 2.88 (bs, 1H, OH), 1.36 (s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 177.4$ (Pv-Carbonyl), 168.1 (C-3), 167.5 (-CH₂C(=O)-), 165.9 (Amid-Carbonyl), 152.5 (C-3'/C-6'), 152.3 (C-8), 151.5 (C-4a'/C-10a'), 141.9 (C-3''), 140.0 (C-6), 137.4 (C-1''), 130.3 (C-5), 129.2 (C-1'/C-8'), 128.9 (C-3a), 128.8 (C-5''), 125.3 (C-4), 122.7 (C-7), 122.6 (C-4''), 118.5 (C-6''), 118.0 (C-2', 7'), 117.8 (C-2''), 115.7 (C-8a'/C-9a'), 110.4 (C-4'/C-5'), 82.1 (C-1), 64.4 (Benzyl-C), 43.7 (Glycin-CH₂), 39.2 (Pv-C(CH₃)₃), 27.0 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

5/6-(3-(Formylmethyl)phenylcarbamoyl)-di-O-pivaloylfluorescein (5-m-(5/6))



Zum Alkohol **4-m-(5/6)** (0.165 g, 0.254 mmol) in 10 mL DCM wurden H₂O (4.3 μ L, 0.254 mmol, 1 Äq) und Dess-Martin-Periodinan (0.137 g, 0.323 mmol, 1.3 Äq) zugegeben und für 20 min gerührt. Anschließend wurde etwas Hexan hinzugegeben und die Reaktionslösung direkt auf eine MPLC-Säule injiziert (Büchi 75 x 40 mm Kartusche, Kieselgel 0.040–0.063, Hex/EE-Gradient: [B] = 15–80 %). Die Isomere **5-m-(5)** und **5-m-(6)** wurden als farblose Feststoffe erhalten.

Ausbeuten: **5-m-(5)**: 55.4 mg, 0.086 mmol (34 %); **5-m-(6)**: 92.3 mg, 0.143 mmol (56 %), C₃₈H₃₃NO₉, 647.67 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 648.2228, gef.: 648.2235; $\Delta = 1.08$ ppm

5-Isomer: $R_f = 0.60$ (EE/Hex 50:50)

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 9.95$ (s, 1H, CHO), 9.36 (s, 1H, NH), 8.81 (bs, 1H, H-4), 8.40 (dd, 1H, $^3J_{6,7} = 8.1$ Hz, $^4J_{6,4} = 1.5$ Hz, H-6), 8.32 (bs, 1H, H-2''), 8.12 (bd, 1H, $^3J_{6'',5''} = 8.5$ Hz, H-6''), 7.65 (bd, 1H, $^3J_{4'',5''} = 7.7$ Hz, H-4''), 7.48 (dd, 1H, $^3J_{5'',4''} = 7.8$ Hz, $^3J_{5'',6''} = 7.8$ Hz, H-5''), 7.32 (d, 1H, $^3J_{7,6} = 8.1$ Hz, H-7), 7.06 (m, 2H, H-4'/H-5'), 6.78 (bs, 4H, H-1'/H-8', H-2'/H-7'), 1.37 (s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 192.4$ (s, CHO), 176.6 (Pv-Carbonyl), 168.9

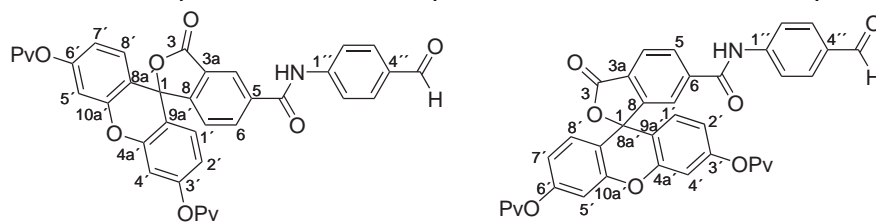
(C-3), 163.9 (Amid-Carbonyl), 155.5 (C-8), 152.8 (C-3'/C-6'), 151.5 (C-4a'/C-10a'), 138.9 (C-1''), 136.9 (C-3''), 136.7 (C-5), 135.7 (C-6), 129.7 (C-5''), 128.6 (C-1'/C-8'), 126.4 (C-3a), 126.3 (C-6''), 126.0 (C-4''), 124.7 (C-7), 123.8 (C-4), 121.2 (C-2''), 117.9 (C-2'/C-7'), 115.2 (C-8a'/C-9a'), 110.5 (C-4'/C-5'), 82.7 (C-1), 39.2 (Pv-C(CH₃)₃), 27.0 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

6-Isomer: $R_f = 0.47$ (EE/Hex 50:50)

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 9.77$ (s, 1H, CHO), 9.25 (s, 1H, NH), 8.20 (dd, 1H, ³J_{5,4} = 8.1 Hz ⁴J_{5,7} = 1.1 Hz, H-5), 8.04 (d, 1H, ³J_{4,5} = 8.1 Hz, H-4), 7.98 (bs, 1H, H-2''), 7.85 (d, 1H, ³J_{6'',5''} = 8.0 Hz, H-6''), 7.70 (s, 1H, H-7), 7.57 (d, 1H, ³J_{4'',5''} = 7.6 Hz, H-4''), 7.39 (dd, 1H, ³J_{5'',4''} = 7.9 Hz, ³J_{5'',6''} = 7.8 Hz, H-5''), 6.91 (d, 2H, ⁴J_{4'/5',2'/7'} = 2.1 Hz, H-4'/H-5'), 6.73 (d, 2H, ³J_{1'/8',2'/7'} = 8.7 Hz, H-1'/H-8'), 6.67 (dd, 2H, ³J_{2'/7',1'/8'} = 8.7 Hz, ⁴J_{2'/7',4'/5'} = 2.2 Hz, H-2'/H-7'), 1.36 (s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 191.8$ (CHO), 176.8 (Pv-Carbonyl), 167.8 (C-3), 163.8 (Amid-Carbonyl), 152.9 (C-8), 152.5 (C-3'/C-6'), 151.2 (C-4a'/C-10a'), 140.6 (C-6), 138.4 (C-1''), 136.7 (C-3''), 130.1 (C-5), 129.5 (C-5''), 128.7 (C-1'/C-8'), 128.5 (C-3a), 126.2 (C-4''), 126.2 (C-6''), 125.6 (C-4), 122.2 (C-7), 120.8 (C-2''), 117.8 (C-2'/C-7'), 115.4 (C-8a'/C-9a'), 110.4 (C-4'/C-5'), 81.7 (C-1), 39.1 (Pv-C(CH₃)₃), 26.9 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

5/6-(4-(Formylmethyl)phenylcarbamoyl)-di-O-pivaloylfluorescein (5-p-(5/6))



Zu einer Lösung des Alkohols **4-p-(5/6)** (217.8 mg, 0.335 mmol) in 10 mL DCM wurden H₂O (6.6 μ L, 0.369 mmol, 1.1 Äq) und Dess-Martin-Periodinan (171.0 mg, 0.402 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben und für 60 min gerührt. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und der Rückstand in EE aufgenommen, woraufhin ein Niederschlag ausfiel, der abgetrennt wurde. Die Lösung wurde erneut eingengt, in DCM aufgenommen und direkt auf eine MPLC-Säule injiziert (Büchi 150 x 12 mm Kartusche, Kieselgel 0.040–0.063, Hex/EE-Gradient: [B] = 0–75 %). **5-p-(5)** und **5-p-(6)** wurden als farblose Feststoffe erhalten. Ausbeute: 193.3 mg, 0.298 mmol (89 %), C₃₈H₃₃NO₉, 647.67 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 648.2228, gef.: 648.2227; Δ = 0.15 ppm

5-Isomer: R_f = 0.47 (EE/Hex 40:60)

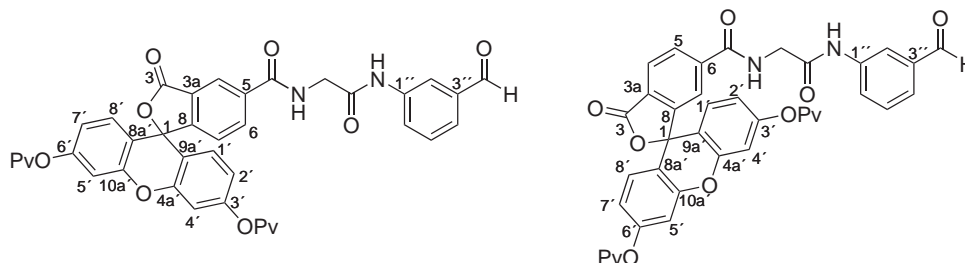
¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 9.91 (s, 1H, CHO), 9.40 (bs, 1H, NH), 8.83 (s, 1H, H-4), 8.25 (dd, 1H, ³ $J_{6,7}$ = 8.1 Hz, ⁴ $J_{6,4}$ = 1.4 Hz, H-6), 7.55 (d, 2H, ³ $J_{2''/6'',3''/5''}$ = 8.6 Hz, H-2''/H-6''), 7.19 (d, 2H, ³ $J_{3''/5'',2''/6''}$ = 8.6 Hz, H-3''/H-5''), 7.18 (d, 1H, ³ $J_{7,6}$ = 8.0 Hz, H-7), 7.08 (bs, 2H, H-4'/H-5'), 6.79–6.77 (m, 4H, H-1'/H-8', H-2'/H-7'), 1.36 (s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 191.2 (CHO), 176.6 (Pv-Carbonyl), 169.0 (C-3), 163.9 (Amid-Carbonyl), 155.5 (C-8), 152.8 (C-3'/C-6'), 151.5 (C-4a'/C-10a'), 143.6 (C-1''), 136.7 (C-5), 135.9 (C-6), 132.4 (C-4''), 131.0 (C-3''/C-5''), 128.5 (C-1'/C-8'), 126.4 (C-3a), 124.7 (C-7), 123.8 (C-4), 120.1 (C-2''/C-6''), 117.9 (C-2'/C-7'), 115.1 (C-8a'/C-9a'), 110.6 (C-4'/C-5'), 82.9 (C-1), 39.1 (Pv-C(CH₃)₃), 27.0 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

6-Isomer: R_f = 0.37 (EE/Hex 40:60)

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 9.85 (s, 1H, CHO), 9.22 (s, 1H, NH), 8.10 (d, 1H, ³ $J_{5,4}$ = 8.0 Hz, H-5), 7.98 (d, 1H, ³ $J_{4,5}$ = 8.0 Hz, H-4), 7.74 (d, 2H, ³ $J_{3''/5'',2''/6''}$ = 8.7 Hz, H-3''/H-5''), 7.69 (d, 2H, ³ $J_{2''/6'',3''/5''}$ = 8.7 Hz, H-2''/H-6''), 7.63 (s, 1H, H-7), 6.88 (d, 2H, ⁴ $J_{4'/5',2'/7'}$ = 2.0 Hz, H-4'/H-5'), 6.65 (d, 2H, ³ $J_{1'/8',2'/7'}$ = 8.6 Hz, H-1'/H-8'), 6.60 (dd, 2H, ³ $J_{2'/7',1'/8'}$ = 8.7 Hz, ⁴ $J_{2'/7',4'/5'}$ = 2.0 Hz, H-2'/H-7'), 1.37 (s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 191.0 (CHO), 176.9 (Pv-Carbonyl), 167.6 (C-3), 163.8 (Amid-Carbonyl), 153.0 (C-8), 152.6 (C-3'/C-6'), 151.2 (C-4a'/C-10a'), 143.0 (C-1''), 140.4 (C-6), 132.6 (C-4''), 130.8 (C-3''/C-5''), 130.1 (C-5), 128.7 (C-3a), 128.5 (C-1'/C-8'), 125.7 (C-4), 122.3 (C-7), 119.8 (C-2''/C-6''), 117.8 (C-2'/C-7'), 115.3 (C-8a'/C-9a'), 110.6 (C-4'/C-5'), 81.6 (C-1), 39.2 (Pv-C(CH₃)₃), 27.0 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

5/6-(2-(3-(Formylmethyl)phenyl)-2-oxoethylcarbamoyl)-di-*O*-pivaloylfluorescein (5-*m*-G-(5/6))


Zu einer Lösung des Alkohols **4-*m*-G-(5/6)** (81.0 mg, 0.115 mmol) in 3 mL DCM wurden H₂O (2.3 μ L, 0.126 mmol, 1.1 Äq) und Dess-Martin-Periodinan (73.0 mg, 0.172 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben und für 2.5 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3.0 mL Et₂O und 2.5 mL NaHCO₃ (80 % + 80 mg Na₂S₂O₃) gequencht. Die organische Phase wurde mit 5 mL NaHCO₃ (ges.) und 2 x 5 mL Brine gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Chromatographie (Kieselgel 0.040–0.063, Hex:EE 30:70) ergab **5-*m*-G-(5)** und **5-*m*-G-(6)** als farblose Feststoffe.

Ausbeute: 55.0 mg, 0.0780 mmol (68 %), C₄₀H₃₆N₂O₁₀, 704.72 g/mol

5-Isomer: $R_f = 0.43$ (EE/Hex 80:20)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 705.2443, gef.: 705.2434; $\Delta = 1.28$ ppm

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-*d*₁): $\delta = 9.91$ (s, 1H, CHO), 9.26 (s, 1H, Aryl-NH), 8.60 (s, 1H, H-4), 8.28 (d, 1H, ³*J*_{6,7} = 8.1 Hz, H-6), 8.12 (bs, 1H, Glycin-NH), 8.03 (s, 1H, H-2''), 7.85 (bd, 1H, ³*J*_{4'',5''} = 7.8 Hz, H-4''), 7.58 (bd, 1H, ³*J*_{6'',5''} = 7.8 Hz, H-6''), 7.42 (dd, 1H, ³*J*_{5'',4''} = 7.8 Hz, ³*J*_{5'',6''} = 7.8 Hz, H-5''), 7.26 (d, 1H, ³*J*_{7,6} = 6.6 Hz, H-7), 7.06 (s, 2H, H-4'/H-5'), 6.83–6.76 (m, 4H, H-1'/H-8', H-2'/H-7'), 4.41 (d, 2H, ³*J*_{G-CH₂,G-NH} = 5.4 Hz, Glycin-CH₂), 1.35 (s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-*d*₁): $\delta = 192.0$ (CHO), 176.5 Pv-Carbonyl), 168.4 (C-3), 167.4 (-CH₂C(=O)-), 166.5 (Amid-Carbonyl), 155.7 (C-8), 152.8 (C-3'/C-6'), 151.5 (C-4a'/C-10a'), 138.6 (C-3''), 137.0 (C-1''), 135.6 (C-5), 134.9 (C-6), 129.7 (C-5''), 128.8 (C-1'/C-8'), 126.7 (C-3a), 125.9 (C-4''), 125.6 (C-6''), 124.6 (C-7), 124.1 (C-4), 120.2 (C-2''), 117.9 (C-2'/C-7'), 115.3 (C-8a'/C-9a'), 110.4 (C-4'/C-5'), 82.3 (C-1), 44.9 (Glycin-CH₂), 39.2 (Pv-C(CH₃)₃), 27.0 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

6-Isomer: $R_f = 0.37$ (EE/Hex 80:20)

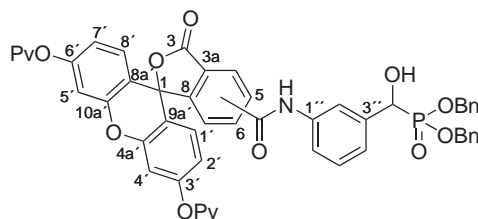
HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 705.2443, gef.: 705.2437; $\Delta = 0.85$ ppm

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-*d*₁): $\delta = 9.82$ (s, 1H, CHO), 8.90 (s, 1H, Aryl-NH),

8.69 (bt, 1H, ${}^3J_{\text{G-NH,G-CH}_2} = 5.3$ Hz, Glycin-NH), 8.06 (d, 1H, ${}^3J_{4,5} = 8.0$ Hz, H-4), 7.89 (dd, 1H, ${}^3J_{5,4} = 8.0$ Hz, ${}^4J_{5,7} = 1.1$ Hz, H-5), 7.70 (s, 1H, H-7), 7.68 (bs, 1H, H-2''), 7.58 (bd, 1H, ${}^3J_{4'',5''} = 7.8$ Hz, H-4''), 7.55 (bd, 1H, ${}^3J_{6'',5''} = 7.8$ Hz, H-6''), 7.34 (dd, 1H, ${}^3J_{5'',4''} = 7.8$ Hz, ${}^3J_{5'',6''} = 7.8$ Hz, H-5''), 6.88 (dd, 2H, ${}^3J_{2'/7',1'/8'} = 8.7$ Hz, ${}^4J_{2'/7',4'/5'} = 2.3$ Hz, H-2'/H-7'), 6.80 (d, 2H, ${}^3J_{1'/8';2'/7'} = 8.6$ Hz, H-1'/H-8'), 6.71 (d, 2H, ${}^4J_{4'/5';2'/7'} = 2.2$ Hz, H-4'/H-5'), 4.10 (bd, 2H, ${}^3J_{\text{G-CH}_2,\text{G-NH}} = 5.4$ Hz, Gly-CH₂), 1.41 (s, 18H, Pv) ppm.

${}^{13}\text{C-NMR}$ (76 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = 191.6$ (CHO), 177.8 (Pv-Carbonyl), 168.2 (-CH₂C(=O)-), 167.9 (C-3), 165.6 (Amid-Carbonyl), 152.5 (C-3'/C-6'), 151.8 (C-8), 151.5 (C-4a'/C-10a'), 139.9 (C-6), 138.3 (C-3''), 136.9 (C-1''), 131.0 (C-5), 129.7 (C-5''), 129.5 (C-1'/C-8'), 129.4 (C-3a), 125.9 (C-4''), 125.3 (C-4), 124.8 (C-6''), 122.6 (C-7), 119.2 (C-2''), 118.2 (C-2', 7'), 115.8 (C-8a'/C-9a'), 110.4 (C-4'/C-5'), 82.1 (C-1), 43.4 (Glycin-CH₂), 39.2 (Pv-C(CH₃)₃), 39.3 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

(*R/S*)-Dibenzyl-(3-(di-*O*-pivaloylfluoresceinyl-5-carboxamido)phenyl)(hydroxy)-methylphosphonat (6-*m*-(5)) und (*R/S*)-Dibenzyl(3(di-*O*-pivaloylfluoresceinyl-6-carboxamido)phenyl)(hydroxy)methylphosphonat (6-*m*-(6))



Zu einer Lösung des Aldehyds **5-*m*-(5/6)** (150.6 mg, 0.233 mmol) und Dibenzylphosphonat (0.12 mL, 142.7 mg, 0.544 mmol, 2.3 Äq.) in 3 mL trockenem DCM wurde Triethylamin (0.05 ml, 0.36 mg, 0.353 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben. Nach Reaktion über Nacht (20 h) wurden weitere 0.4 Äq. Dibenzylphosphonat und Triethylamin hinzugefügt und für weitere 22 h gerührt. Die Lösung wurde eingeeengt und HPLC-Reinigung (RP-18, Säule A, H₂O + 0.1 % TFA/ACN + 0.1 % TFA, [B] = 80 %, Fluss 20 mL/min, $t_R = 16.1$ (**6-*m*-(6)**) und 18.3 min (**6-*m*-(5)**)) sowie Lyophilisation aus H₂O/ACN ergab die Isomere **6-*m*-(5)** und **6-*m*-(6)** als farblose Pulver.

Ausbeute: 141.5 mg, 0.156 mmol (67 %), C₅₂H₄₈NO₁₂P, 909.91 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 910.2987, gef.: 910.2989; $\Delta = 0.22$ ppm

5-Isomer: $R_f = 0.47$ (DCM/MeOH 90:10)

${}^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = 9.09$ (s, 1H, NH), 8.59 (b, 1H, H-4), 8.24 (dd,

1H, ${}^3J_{6,7} = 8.1$ Hz, ${}^4J_{6,4} = 1.3$ Hz, H-6), 7.85 (bd, 1H, ${}^3J_{6'',5''} = 8.5$ Hz, H-6''), 7.77 (bs, 1H, H-2''), 7.27–7.09 (m, 13H, Bn, H-4'', H-5'', H-7), 7.04 (d, 2H, ${}^4J_{4'/5',2'/7'} = 1.6$ Hz, H-4'/H-5'), 6.70 (m, 4H, H-1'/H-8', H-2'/H-7'), 5.06 (d, 1H, ${}^2J_{\text{CHOH,P}} = 11.4$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{HOH}$), 4.78 (m, 4H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Bn}$), 1.35 (s, 18H, Pv) ppm.

${}^{13}\text{C}$ -NMR (76 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 176.5$ (Pv-Carbonyl), 168.5 (C-3), 164.1 (Amid-Carbonyl), 155.4 (C-8), 152.8 (C-3'/C-6'), 151.5 (C-4a'/C-10a'), 138.2 (d, ${}^4J_{1'',\text{P}} = 1.6$ Hz, C-1''), 136.9 (d, ${}^2J_{3'',\text{P}} = 1.6$ Hz, C-3''), 136.7 (C-5), 135.8 + 135.7 (2 d, 2 x ${}^3J_{\text{Bn-q,P}} = 5.8$ Hz, Bn-quartär), 135.1 (C-6), 128.7 (C-1'/C-8'), 128.5 (Bn), 128.4 (d, ${}^4J_{5'',\text{P}} = 1.9$ Hz, C-5''), 127.9 (Bn), 126.4 (C-3a), 124.4 (C-7), 124.1 (C-4), 123.7 (d, ${}^3J_{4'',\text{P}} = 6.5$ Hz, C-4''), 120.8 (d, ${}^5J_{6'',\text{P}} = 3.2$ Hz, C-6''), 119.4 (d, ${}^3J_{2'',\text{P}} = 5.6$ Hz, C-2''), 117.9 (C-2'/C-7'), 115.5 (C-8a'/C-9a'), 110.4 (C-4'/C-5'), 82.2 (C-1), 70.7 (d, ${}^1J_{\underline{\text{C}}\text{HOH,P}} = 161.6$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{HOH}$), 68.9 + 68.8 (2 d, 2 x ${}^2J_{\text{Bn,P}} = 2.4$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Bn}$), 39.2 (Pv- $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 27.0 (Pv- $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

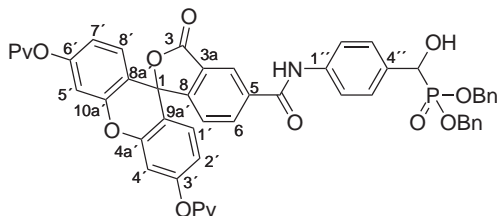
${}^{31}\text{P}$ -NMR (122 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 22.64$ (s) ppm.

6-Isomer: $R_f = 0.47$ (DCM/MeOH 90:10)

${}^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 8.71$ (s, 1H, NH), 8.12 (dd, 1H, ${}^3J_{5,4} = 8.1$ Hz, ${}^4J_{5,7} = 1.1$ Hz, H-5), 8.03 (d, 1H, ${}^3J_{4,5} = 8.1$ Hz, H-4), 7.69 (s, 1H, H-7), 7.60 (bs, 1H, H-2''), 7.51 (d, 1H, ${}^3J_{6'',5''} = 7.7$ Hz, H-6''), 7.30–7.15 (m, 10H, Bn), 7.14 (dd, 1H, ${}^3J_{5'',4''} = 7.9$ Hz, ${}^3J_{5'',6''} = 7.9$ Hz, H-5''), 7.07 (d, 1H, ${}^3J_{4'',5''} = 7.3$ Hz, H-4''), 6.99 + 6.98 (2 d, 2H, 2 x ${}^4J_{4'/5',2'/7'} = 1.9$ Hz, H-4'/H-5'), 6.81 + 6.80 (2 d, 2H, 2 x ${}^3J_{1'/8',2'/7'} = 8.6$ Hz, H-1'/H-8'), 6.74 (dd, 2H, ${}^3J_{2'/7',1'/8'} = 8.7$ Hz, ${}^4J_{2'/7',4'/5'} = 2.0$ Hz, H-2'/H-7'), 4.89 (d, 1H, ${}^2J_{\underline{\text{C}}\text{HOH,P}} = 11.5$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{HOH}$), 4.80 (m, 4H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Bn}$), 1.35 (s, 18H, Pv) ppm.

${}^{13}\text{C}$ -NMR (76 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 176.8 + 176.6$ (Pv-Carbonyl), 168.1 (C-3), 163.6 (Amid-Carbonyl), 152.8 (C-8), 152.6 (C-3'/C-6'), 151.4 (C-4a'/C-10a'), 141.1 (C-6), 137.7 (C-1''), 136.7 (C-3''), 135.8 + 135.7 (2 d, 2 x ${}^3J_{\text{Bn-q,P}} = 6.0$ Hz, Bn-quartär), 130.1 (C-5), 128.9 + 128.8 (C-1'/C-8'), 128.7 (d, ${}^4J_{5'',\text{P}} = 2.7$ Hz, C-5''), 128.6 (C-3a), 128.4 (d, $J_{\text{Bn,P}} = 0.7$ Hz, Bn), 128.3 (Bn), 127.8 (Bn), 125.5 (C-4), 123.4 (d, ${}^3J_{4'',\text{P}} = 5.5$ Hz, C-4''), 122.6 (C-7), 120.6 (d, ${}^5J_{6'',\text{P}} = 3.7$ Hz, C-6''), 119.5 (d, ${}^3J_{2'',\text{P}} = 5.7$ Hz, C-2''), 117.9 (C-2'/C-7'), 115.8 + 115.7 (C-8a'/C-9a'), 110.4 (C-4'/C-5'), 82.0 (C-1), 70.5 1 (d, ${}^1J_{\underline{\text{C}}\text{HOH,P}} = 160.7$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{HOH}$), 68.7 + 68.5 (2 d, 2 x ${}^2J_{\text{Bn,P}} = 7.3$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Bn}$), 39.2 (Pv- $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 27.0 (Pv- $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

${}^{31}\text{P}$ -NMR (122 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 22.30$ (s) ppm.

(*R/S*)-Dibenzyl-(4-(di-*O*-pivaloylfluoresceinyl-5-carboxamido)phenyl)(hydroxy)-methylphosphonat (6-*p*-(5)**)**

Zu einer Lösung des Aldehyds **5-*p*-(5)** (76.0 mg, 0.117 mmol) und Dibenzylphosphonat (51.8 μ l, 0.235 mmol, 2.0 Äq.) in 3 mL trockenem DCM wurde Triethylamin (32.7 μ l, 0.235 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben. Nach drei Tagen Rühren wurden weitere 1.0 Äq. Dibenzylphosphonat und Triethylamin zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von insgesamt 7 Tagen war das Aldehyd vollständig umgesetzt worden und die Reaktionslösung wurde durch Kieselgel gefiltert. Nach Evaporation der Lösungsmittel wurde das Produkt per MPLC (Büchi 150 x 40 mm Kartusche, Kieselgel 0.040–0.063, DCM/MeOH-Gradient: [B] = 1–15 %) gereinigt und **6-*p*-(5)** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 68.2 mg, 0.075 mmol (64 %), C₅₂H₄₈NO₁₂P, 909.91 g/mol

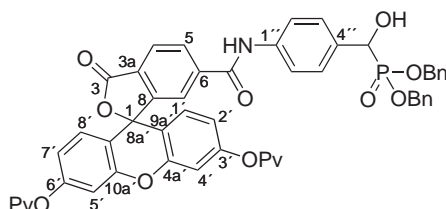
R_f = 0.32 (EE/Hex 80:20)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 910.2987, gef.: 910.2986; Δ = 0.11 ppm

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-*d*₁): δ = 9.60 (s, 1H, NH), 8.74 (s, 1H, H-4), 8.32 (dd, 1H, ³*J*_{6,7} = 8.1 Hz, ⁴*J*_{6,4} = 1.4 Hz, H-6), 7.64 (d, 2H, ³*J*_{2''/6''/3''/5''} = 8.4 Hz, H-2''/H-6''), 7.37 (dd, 2H, ³*J*_{3''/5''/2''/6''} = 8.7 Hz, ⁴*J*_{3''/5''/P} = 2.0 Hz, H-3''/H-5''), 7.24–7.20 (m, 10H, Bn), 7.13 (d, 1H, ³*J*_{7,6} = 8.0 Hz, H-7), 7.05 (d, 2H, ⁴*J*_{4'/5'/2'/7'} = 2.0 Hz, H-4'/H-5'), 6.73 + 6.72 (d, 2H, ³*J*_{1'/8'/2'/7'} = 8.7 Hz, H-1'/H-8'), 6.68 + 6.67 (dd, 2H, ³*J*_{2'/7'/1'/8'} = 8.7 Hz, ⁴*J*_{2'/7'/4'/5'} = 8.7 Hz, H-2'/H-7'), 5.07 (d, 2H, ²*J*_{CHOH,P} = 10.7 Hz, CHOH), 4.97–4.80 (m, 4H, CH₂Bn), 1.35 (s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-*d*₁): δ = 176.5 (Pv-Carbonyl), 168.7 (C-3), 164.3 (Amid-Carbonyl), 155.2 (C-8), 152.7 (C-3'/C-6'), 151.5 (C-4a'/C-10a'), 138.3 (d, ⁵*J*_{1''/P} = 3.4 Hz, C-1''), 137.3 (C-5), 135.9 + 135.8 (2 d, 2 x ³*J*_{Bn-q,P} = 5.7 Hz, Bn-quartär), 135.4 (C-6), 132.2 (d, ²*J*_{4''/P} = 1.8 Hz, C-4''), 128.7 (C-1'/C-8'), 128.5 (d, *J*_{Bn,P} = 1.5 Hz, Bn), 128.4 (Bn), 127.8 (d, *J*_{Bn,P} = 1.0 Hz, Bn), 127.8 (C-3''/C-5''), 126.3 (C-3a), 124.4 (C-4), 124.3 (C-7), 120.7 (C-2''/C-6''), 117.8 (C-2'/C-7'), 115.5 (C-8a'/C-9a'), 110.3 (C-4'/C-5'), 82.2 (C-1), 70.5 (d, ¹*J*_{CHOH,P} = 161.2 Hz, CHOH), 68.6 + 68.5 (2 d, 2 x ²*J*_{Bn,P} = 6.0 Hz, CH₂Bn), 39.1 (Pv-C(CH₃)₃), 27.0 (Pv-C(CH₃)₃)

ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 22.81 (s) ppm.**(*R/S*)-Dibenzyl-(4-(di-*O*-pivaloylfluoresceinyl-6-carboxamido)phenyl)(hydroxy)-methylphosphonat (**6-p-(6)**)**

Zu einer Lösung des Aldehyds **5-p-(6)** (49.8 mg, 0.077 mmol) und Dibenzylphosphonat (33.9 µl, 0.154 mmol, 2.0 Äq.) in 3 mL trockenem DCM wurde Triethylamin (21.4 µl, 0.154 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 9 Tagen war das Aldehyd vollständig umgesetzt und die Reaktionslösung wurde durch Kieselgel gefiltert. Nach Evaporation des Lösungsmittel wurde das Produkt per HPLC (RP-18, Säule A, H₂O + 0.1 % TFA/ACN + 0.1 % TFA, [B] = 75 %, Fluss 25 mL/min, *t*_R = 15.9 min) gereinigt und Lyophilisation ergab **6-p-(5)** als farbloses Pulver.

Ausbeute: 32.1 mg, 0.035 mmol (46 %), C₅₂H₄₈NO₁₂P, 909.91 g/mol*R*_f = 0.32 (EE/Hex 80:20)**HRMS (ESI-TOF):** *m/z*[M+H]⁺ ber.: 910.2987, gef.: 910.2985; Δ = 0.22 ppm

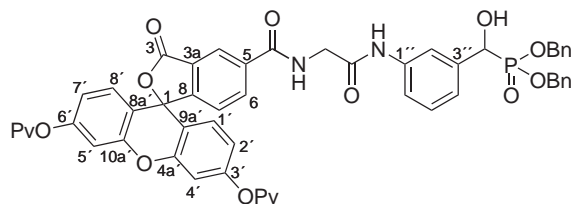
¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 8.68 (s, 1H, NH), 8.18 (d, 1H, ³*J*_{5,4} = 8.2 Hz, H-5), 8.05 (d, 1H, ³*J*_{4,5} = 8.1 Hz, H-4), 7.65 (bs, 1H, H-7), 7.46 (d, 2H, ³*J*_{2''/6'',3''/5''} = 7.5 Hz, H-2''/H-6''), 7.30–7.14 (m, 12H, H-3''/H-5'', Bn), 6.98 (bd, 2H, ⁴*J*_{4'/5',2'/7'} = 1.9 Hz, H-4'/H-5'), 6.76 + 6.75 (2 d, 2H, 2 x ³*J*_{1'/8',2'/7'} = 8.6 Hz, H-1'/H-8'), 6.71 + 6.70 (2 dd, 2H, 2 x ³*J*_{2'/7',1'/8'} = 8.7 Hz, 2 x ⁴*J*_{2'/7',4'/5'} = 2.1 Hz, H-2'/H-7'), 4.93 (d, 2H, ²*J*_{CHOH,P} = 10.7 Hz, CHOH), 4.90–4.76 (m, 4H, CH₂Bn), 1.35 (s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 176.8 + 176.8 (Pv-Carbonyl), 168.0 (C-3), 163.7 (Amid-Carbonyl), 153.2 (C-8), 152.7 (C-3'/C-6'), 151.4 + 151.3 (C-4a'/C-10a'), 141.3 (C-6), 137.6 (d, ⁵*J*_{1'',P} = 2.8 Hz, C-1''), 135.8 + 135.7 (2 d, 2 x ³*J*_{Bn-q,P} = 5.7 Hz, Bn-quartär), 132.4 (d, ²*J*_{4'',P} = 2.1 Hz, C-4''), 130.0 (C-5), 128.8 (C-1'/C-8'), 128.5 (d, *J*_{Bn,P} = 1.3 Hz, Bn), 128.5 (d, *J*_{Bn,P} = 2.1 Hz, Bn), 128.4 (C-3a), 127.8 (d, *J*_{Bn,P} = 3.2 Hz, Bn), 127.7 (d, ⁴*J*_{3''/5'',P} = 6.0 Hz, H-3''/H-5''), 125.7 (C-4), 122.4 (C-7), 120.4 (C-2''/C-6''), 117.9 (C-2'/C-7'), 115.6 + 115.5 (C-8a'/C-9a'), 110.5 (C-4'/C-

5'), 81.8 (C-1), 70.6 (d, $^1J_{\text{CHOH,P}} = 160.6$ Hz, $\underline{\text{CHOH}}$), 68.7 + 68.6 (2 d, $2 \times ^2J_{\text{Bn,P}} = 7.8$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{Bn}}$), 39.2 (Pv-C($\underline{\text{CH}_3}$)₃), 27.0 (Pv-C($\underline{\text{CH}_3}$)₃) ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 22.61$ (s) ppm.

(*R/S*)-Dibenzyl-(3-(2-(di-*O*-pivaloylfluoresceinyl-5-carboxamido)acetamido)phenyl)(hydroxy)methylphosphonat (6-*m-G*-(5))



Zu einer Lösung des Aldehyds **5-*m-G*-(5)** (25.9 mg, 0.0368 mmol) und Dibenzylphosphonat (14.3 μl , 0.0646 mmol, 1.8 Äq.) in 1 mL trockenem DCM wurde Triethylamin (10.0 μl , 0.0720 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 2 Tagen war das Aldehyd vollständig umgesetzt. Nach Evaporation des Lösungsmittel wurde das Produkt per HPLC (RP-18, Säule A, $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA/ACN + 0.1% TFA, [B] = 70%, Fluss 20 mL/min, $t_{\text{R}} = 30.3$ min) gereinigt und Lyophilisation ergab **6-*m-G*-(5)** als farbloses Pulver.

Ausbeute: 27.8 mg, 0.0283 mmol (77%), $\text{C}_{54}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}$, 966.96 g/mol

$R_{\text{f}} = 0.40$ (EE/Hex 80:20)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 967.3202, gef.: 967.3177; $\Delta = 2.58$ ppm

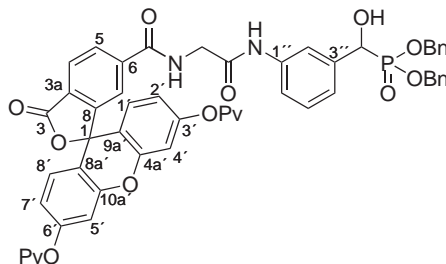
^1H -NMR (300 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 9.24$ (bs, 1H, Aryl-NH), 8.53 (s, 1H, H-4), 8.35 (bs, 1H, Glycin-NH), 8.14 (bd, 1H, $^3J_{6,7} = 7.9$ Hz, H-6), 7.80 (bs, 1H, H-2'), 7.40 (bd, 1H, $^3J_{6'',5''} = 7.4$ Hz, H-6''), 7.24–7.05 (m, 11H, Bn, H-5'), 7.04–6.98 (m, 4H, H-4'/H-5', H-4'', H-7), 6.74 (bs, 4H, H-1'/H-8', H-2'/H-7'), 5.07 (d, 2H, $^2J_{\text{CHOH,P}} = 12.2$ Hz, $\underline{\text{CHOH}}$), 4.99–4.75 (m, 4H, $\underline{\text{CH}_2\text{Bn}}$), 4.27 (bs, 2H, Glycin- CH_2), 1.35 (s, 18H, Pv) ppm.

^{13}C -NMR (76 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 176.5$ (Pv-Carbonyl), 168.5 (C-3), 167.9 ($-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$), 166.4 (Amid-Carbonyl), 155.3 (C-8), 152.7 (C-3'/C-6'), 151.5 (C-4a'/C-10a'), 137.9 (C-1'), 137.1 (C-3'), 135.7 (2 d, $2 \times ^3J_{\text{Bn-q,P}} = 5.7$ Hz, Bn-quartär), 135.6 (C-5), 134.7 (C-6), 128.9 (C-1'/C-8', 5'), 135.8 + 135.6 (d, $J_{\text{Bn,P}} = 1.5$ Hz, Bn), 128.4 (Bn), 127.8 (d, $J_{\text{Bn,P}} = 4.4$ Hz, Bn), 126.4 (C-3a), 124.4 (C-4), 124.3 (C-7), 123.4 (d, $J_{4'',\text{P}} = 5.0$ Hz, C-4''), 120.0 (C-6''), 118.7 (C-2''), 117.9 (C-2'/C-7'), 115.5 (C-8a'/C-9a'), 110.3 (C-4'/C-5'), 82.1 (C-1), 70.6 (d, $^1J_{\text{CHOH,P}} = 163.0$ Hz, $\underline{\text{CHOH}}$),

69.0 + 68.6 (2 d, $2 \times {}^2J_{\text{Bn,P}} = 7.3 \text{ Hz}$, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Bn}$), 44.4 (Glycin- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 39.2 ($\text{Pv-}\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 27.0 ($\text{Pv-}\underline{\text{C}}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$) ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 23.08$ (s) ppm.

(*R/S*)-Dibenzyl-(3-(2-(di-*O*-pivaloylfluoresceinyl-6-carboxamido)acetamido)phenyl)(hydroxy)methylphosphonat (6-*m*-G-(6)**)**



Zu einer Lösung des Aldehyds **5-*m*-G-(6)** (27.6 mg, 0.0392 mmol) und Dibenzylphosphonat (15.6 μl , 0.0705 mmol, 1.8 Äq.) in 1 mL trockenem DCM wurde Triethylamin (10.9 μl , 0.0783 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 2 Tagen war das Aldehyd vollständig umgesetzt. Nach Evaporation des Lösungsmittel wurde das Produkt per HPLC (RP-18, Säule A, $\text{H}_2\text{O} + 0.1\% \text{ TFA/ACN} + 0.1\% \text{ TFA}$, [B] = 80 %, Fluss 20 mL/min, $t_{\text{R}} = 11.4 \text{ min}$) gereinigt und Lyophilisation ergab **6-*m*-G-(6)** als farbloses Pulver.

Ausbeute: 14.6 mg, 0.0149 mmol (38 %), $\text{C}_{54}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}$, 966.96 g/mol

$R_f = 0.40$ (EE/Hex 80:20)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H] $^+$ ber.: 967.3202, gef.: 967.3219; $\Delta = 1.76 \text{ ppm}$

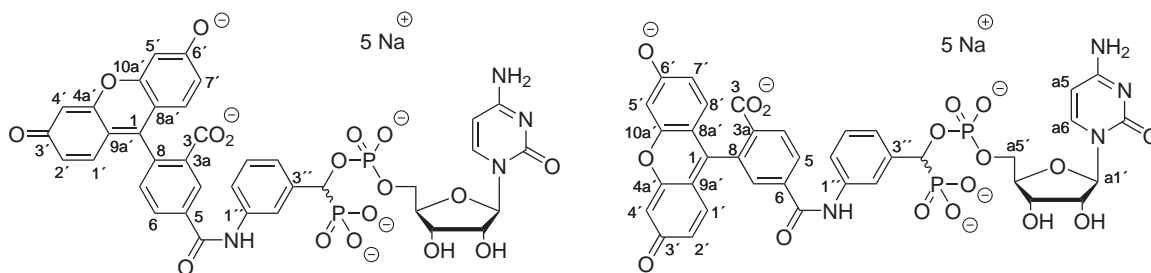
^1H -NMR (300 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 8.40$ (bs, 1H, Aryl-NH), 8.40 (bs, 1H, Glycin-NH), 7.98–7.91 (m, 2H, H-4, H-5), 7.70 (s, 1H, H-7), 7.50 (bs, 1H, H-2''), 7.26–7.02 (m, 13H, Bn, H-4'', H-5'', H-6''), 6.87 (bs, H-4', H-5'), 6.79 (m, 2H, H-1', H8', H-2', H-7'), 4.91–4.75 (m, 5H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Bn}$, $\underline{\text{C}}\text{H}\text{OH}$), 3.95 (bd, 2H, ${}^3J_{\text{G-CH}_2, \text{G-NH}} = 4.8 \text{ Hz}$, Glycin- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 1.35 (s, 18H, Pv) ppm.

^{13}C -NMR (76 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 177.3$ (Pv-Carbonyl), 168.1 (C-3), 167.6 ($-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$), 165.8 (Amid-Carbonyl), 152.5 (C-3'/C-6'), 152.4 (C-8), 151.5 (C-4a'/C-10a'), 140.1 (C-6), 137.7 (C-3''), 136.9 (C-1''), 135.9 + 135.7 (2 d, $2 \times {}^3J_{\text{Bn-q,P}} = 6.0 \text{ Hz}$, Bn-quartär), 130.2 (C-5), 129.2 (C-1'/C-8'), 128.9 (C-5''), 128.8 (C-3a), 128.5 (Bn), 128.4 (Bn), 127.8 (Bn), 125.3 (C-4), 123.0 (C-4''), 122.9 (C-7), 119.5 (C-6''), 118.2 (C-2''), 118.0 (C-2'/C-7'), 115.7 (C-8a'/C-9a'), 110.4 (C-4', C-5'), 82.1 (C-1), 70.5 (d, ${}^1J_{\underline{\text{C}}\text{H}\text{OH,P}} = 160.4 \text{ Hz}$, $\underline{\text{C}}\text{H}\text{OH}$), 68.8 + 68.4 (2 d, $2 \times {}^2J_{\text{Bn,P}} = 6.9 \text{ Hz}$, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Bn}$),

43.8 (Glycin-CH₂), 39.2 (Pv-C(CH₃)₃), 27.0 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 22.86 (s) ppm.

Pentatrium Cytidin-5'-yl-[(*R/S*)-(3-(fluoresceinyl-5-carboxamido)phenyl)-phosphonomethyl]-phosphat (8-*m*-(5)) und **Pentatrium Cytidin-5'-yl-[(*R/S*)-(3-(fluoresceinyl-6-carboxamido)phenyl)-phosphonomethyl]-phosphat (8-*m*-(6))**



Die Umsetzung des α -Hydroxymethylphosphonats **6-*m*-(5/6)** (100.0 mg, 0.110 mmol) und **1** (93.9 mg, 0.165 mmol, 1.5 Äq.) mit 1*H*-Tetrazol (15.4 mg, 0.220 mmol, 2.0 Äq.) über Nacht (18 h) und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 44.0 μ L, 0.242 mmol, 2.2 Äq.) für 1.5 h gemäß der AAV1 (RP-18, Säule A, H₂O + 0.1 % TFA/ACN + 0.1 % TFA, [B] = 70 %, Fluss 20 mL/min, t_R = 21.5 (**7-*m*-(6)**) und 26.7 min (**7-*m*-(5)**)) und Lyophilisation aus H₂O/ACN ergab die Isomere **7-*m*-(5)** (66.8 mg) und **7-*m*-(6)** (46.0 mg).

Von 66.8 mg **7-*m*-(5)** wurden 46.3 mg (0.0332 mmol) in 1.5 mL MeOH gemäß der AAV2 zuerst mit H₂ und Pd/C 10 % (4.0 mg, Reaktionszeit 45 min) und anschließend mit NaOMe in MeOH (1.0 M, 1.66 mL, 1.66 mmol, 50 Äq., Reaktionszeit 25 min) umgesetzt. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule A, 0.05 M TEAB-Puffer/ACN, [B] = 7.5–15 %, Fluss 20 mL/min, t_R = 21.0) ergab **8-*m*-(5)** als intensiv orange gefärbtes Lyophilisat (20.0 mg, 0.0214 mmol, 28 % Ausbeute).

Von 46.0 mg **7-*m*-(6)** wurden 10.8 mg (7.7 μ mol) in 1.0 mL MeOH gemäß der AAV2 zuerst mit H₂ und Pd/C 10 % (2.2 mg, Reaktionszeit 30 min) und anschließend mit NaOMe in MeOH (1.0 M, 0.39 mL, 0.39 mmol, 50 Äq., Reaktionszeit 30 min) umgesetzt. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule A, 0.05 M TEAB-Puffer/ACN, Gradient: [B] = 7.5–9.8 %, Fluss 20 mL/min, t_R = 22.4) ergab **8-*m*-(6)** als intensiv orange gefärbtes Lyophilisat (3.62 mg, 3.9 μ mol, 15 % Ausbeute).

Gesamtausbeute: 23.6 mg, 25.3 μ mol (43 %), C₃₇H₂₇N₄Na₅O₁₇P₂, 976.52 g/mol

8-*m*-(5):

HRMS (ESI-TOF): m/z [M-5Na+6H]⁺ ber.: 867.1316, gef.: 867.1317; Δ = 0.12 ppm

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{H}_2\text{O-d}_2$): $\delta = 8.28$ (bs, 1H, H-4), 7.98 (bd, 1H, $^3J_{5,4} = 7.9$ Hz, H-6), 7.71 (d, 0.5H, $^3J_{a6,a5} = 7.6$ Hz, H-a6), 7.59 + 7.55 (2 bs, 1H, H-2'), 7.54 (d, 0.5H, $^3J_{a6,a5} = 7.9$ Hz, H-a6), 7.53–7.49 (m, 1H, H-6''), 7.42 (m, 0.5H, H-5''), 7.40–7.30 (m, 2.5H, H-4'', H-5'', H-7), 7.20–7.10 (m, 2H, H-1'/H-8'), 6.67 (bd, 2H, $^3J_{2'/7',1'/8'} = 9.3$ Hz, H-2'/H-7'), 6.59 (bs, 2H, H-4'/H-5'), 5.99 + 5.92 (2 d, 1H, $^3J_{a5,a6} = 7.6$ Hz und 7.3 Hz, H-a5), 5.76 + 5.71 (2 d, 1H, $^3J_{a1',a2'} = 4.3$ Hz und 3.4 Hz, H-a1'), 5.22 (dd, 1H, $^2J_{\text{CHP},\text{PO}_3} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{CHP},\text{PO}_4} = 10.5$ Hz, CHP), 3.99 (m, 0.5H, H-a4') 3.79–3.79 (m, 3.5H, H-a3', H-a4', H-a5a', H-a5b'), 3.76 (dd, 0.5H, $^3J_{a2',a1'} = 4.2$ Hz, $^3J_{a2',a1'} = 4.2$ Hz, H-a2'), 3.63 (dd, 1H, $^3J_{a3',a2'} = 4.9$ Hz, $^3J_{a3',a4'} = 4.9$ Hz, H-a3') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (76 MHz, $\text{H}_2\text{O-d}_2$): $\delta = 174.8$ (C-3'/C-6'), 173.3 (C-3), 167.7 + 167.4 (Amid-Carbonyl), 165.2 + 165.0 (C-a4), 157.6 (C-4a'/C-10a'), 156.5 + 156.3 (C-a2), 156.3 (C-1), 141.3 + 141.2 (C-a6), 139.8 (C-5), 138.5 (d, $^2J_{3'',\text{PO}_3} = 6.1$ Hz, C-3''), 136.8 (C-1''), 135.3 (C-8), 135.1 (C-3a), 131.5 (C-1'/8'), 130.3 (C-7), 129.0 (C-5''), 128.5 (C-6), 127.7 (C-4), 125.1 (C-4''), 122.0 + 121.8 (C-6''), 121.2 (C-2'/C-7', C-2''), 114.5 (C-8a'/C-9a'), 103.3 (C-4'/C-5'), 96.2 + 96.0 (C-a5), 89.2 89.1 (C-a1'), 82.7 + 82.4 (d, $^3J_{a4',\text{PO}_4} = 9.4$ Hz, C-a4'), 75.9 (bd, $^1J_{\text{CHP},\text{PO}_3} = 158.2$ Hz, C-CHP), 74.3 (C-a2'), 69.1 + 68.6 (C-a3'), 64.3 + 63.4 (C-a5') ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, $\text{H}_2\text{O-d}_2$): $\delta = 14.68$ (d, $^3J_{\text{P},\text{P}} = 34.7$ Hz, PO_3), 1.96 + 1.54 (2 d, $^3J_{\text{P},\text{P}} = 34.7$ Hz und 34.4 Hz, PO_4) ppm.

8-m-(6):

HRMS (ESI-TOF): m/z [M-5Na+4H]⁻ ber.: 865.1165, gef.: 865.1159; $\Delta = 0.69$ ppm

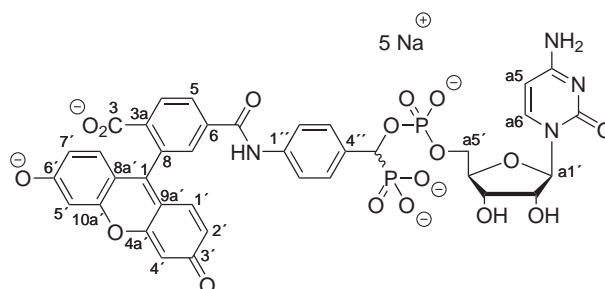
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{H}_2\text{O-d}_2$): $\delta = 8.03 + 8.02$ (2 bd, 1H, $2 \times ^3J_{5,4} = 8.1$ Hz, $2 \times ^4J_{5,7} = 2.7$, H-5), 7.94 + 7.93 (2 d, 1H, $2 \times ^3J_{4,5} = 8.5$ Hz, H-4), 7.67 + 7.73 (2 bs, 1H, H-7), 7.62 (d, 0.5H, $^3J_{a6,a5} = 7.6$ Hz, H-a6), 7.62 (bs, 1H, H-2'), 7.49 (d, 0.5H, $^3J_{a6,a5} = 7.5$ Hz, H-a6), 7.48 + 7.45 (2 d, 1H, $2 \times ^3J_{6'',5''} = 8.6$ Hz, H-6''), 7.39 + 7.34 (2 d, 1H, $2 \times ^3J_{5'',4''} = 7.9$ Hz, $2 \times ^3J_{5'',6''} = 7.9$ Hz, H-5''), 7.33 + 7.32 (2 d, 1H, $^3J_{4'',5''} = 7.8$ Hz und 8.4 Hz, H-4''), 7.20 + 7.19 + 7.17 + 7.15 (4 d, 2H, $4 \times ^3J_{1'/8',2'/7'} = 9.1$ Hz, H-1'/H-8'), 6.75–6.66 (m, 4H, H-4'/H-5', H-2'/H-7'), 5.93 + 5.83 (2 d, 1H, $2 \times ^3J_{a5,a6} = 7.5$ Hz, H-a5), 5.69 + 5.64 (2 d, 1H, $^3J_{a1',a2'} = 4.4$ Hz und 3.8 Hz H-a1'), 5.19 + 5.18 (2 dd, 1H, $^2J_{\text{CHP},\text{PO}_3} = 14.0$ Hz und 13.9 Hz, $^3J_{\text{CHP},\text{PO}_4} = 9.7$ Hz und 10.0 Hz, CHP), 3.89 (m, 1H, H-a4'), 3.86 (dd, 0.5H, $^3J_{a2',a1'} = 4.5$ Hz, $^3J_{a2',a1'} = 4.5$ Hz, H-a2'), 3.85 (m, 1H, H-a5a', H-a5b'), 3.80 (dd, 0.5H, $^3J_{a3',a2'} = 5.3$ Hz, $^3J_{a3',a4'} = 5.3$ Hz, H-a3'), 3.78 (m, 1H, H-a5a', H-a5b'), 3.74 (dd, 0.5H, $^3J_{a2',a1'} = 4.5$ Hz, $^3J_{a2',a1'} = 4.5$ Hz, H-a2'), 3.63 (dd, 0.5H, $^3J_{a3',a2'} = 5.3$ Hz, $^3J_{a3',a4'} = 5.3$ Hz, H-a3') ppm.

HMQC (^1H : 600 Mhz; ^{13}C : 151 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 131.6$ (C-1'/C-8'), 129.1 (C-5'), 129.0 (C-4), 128.9(C-7), 128.8(C-5), 125.1(C-4'), 121.8 (C-2'/C-7'), 121.5 (C-6'), 121.2 (C-2'), 120.9 (C-6'), 114.5 (C-a6), 103.4 (C-4'/C-5'), 96.2 + 95.9 (C-a5), 89.1 (C-a1'), 82.5 (C-a4'), 76.0 (d, $^1J_{\text{CHP},\text{PO}_3} = 157$ Hz, C-CHP), 74.2 (C-a2'), 69.2 + 68.7 (C-a3'), 64.3 + 63.4 (C-a5') ppm.

HMBC (^1H : 600 Mhz; ^{13}C : 151 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 176.5$ (C-3'/C-6'), 173.7 (C-3), 167.3 + 167.0 (Amid-Carbonyl), 165.4 (C-a4), 165.3 (C-a4), 158.2 (C-4a'/C-10a'), 157.5 (C-1), 156.7 (C-a2), 142.7 (C-3a), 138.7 (C-3'), 136.8 (C-1'), 134.7 (C-6 oder C-8), 131.6 (C-6 oder C-8), 114.5 (C-8a'/C-9a') ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 14.46$ (d, $^3J_{\text{P},\text{P}} = 32.9$ Hz, PO_3), 1.94 + 1.58 (2 d, $^3J_{\text{P},\text{P}} = 36.2$ Hz und 37.5 Hz, PO_4) ppm.

Pentatrium Cytidin-5'-yl-[(*R/S*)-(4-(fluoresceinyl-6-carboxamido)phenyl)-phosphonomethyl]-phosphat (8-p-(6)**)**



Die Umsetzung einer Mischung der α -Hydroxymethylphosphonate **6-p-(5)** und **6-p-(6)** (54.0 mg, 0.0595 mmol) und **1** (50.9 mg, 0.0893 mmol, 1.5 Äq.) mit 1*H*-Tetrazol (8.3 mg, 0.119 mmol, 2.0 Äq.) über Nacht (20 h) und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 23.8 μl , 0.131 mmol, 2.2 Äq.) für 1.5 h gemäß der AAV1 (RP-18, Säule A, H_2O + 0.1 % TFA/ACN + 0.1 % TFA, Gradient: [B] = 70–75 % in 25 min, Fluss 20 mL/min, $t_{\text{R}} = 17.4$ (**7-p-(6)**) und 19.5 (**7-p-(5)**)) und Lyophilisation aus H_2O /ACN ergab die Isomere **7-p-(5)** (34.2 mg) und **7-p-(6)** (19.2 mg).

Von 19.2 mg **7-p-(6)** wurden 13.1 mg (9.37 μmol) in 1.0 mL MeOH gemäß der AAV2 zuerst mit H_2 und Pd/C 10 % (2.7 mg, Reaktionszeit 35 min) und anschließend mit NaOMe in MeOH (1.0 M, 0.47 mL, 0.47 mmol, 50 Äq., Reaktionszeit 35 min) umgesetzt. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule A, 0.05 M TEAB-Puffer/ACN, Gradient: [B] = 8–12 % in 10 min, Fluss 20 mL/min, $t_{\text{R}} = 15.3$) ergab **8-p-(6)** als intensiv orange gefärbtes Lyophilisat (1.62 mg, 1.63 μmol , 4 % Ausbeute).

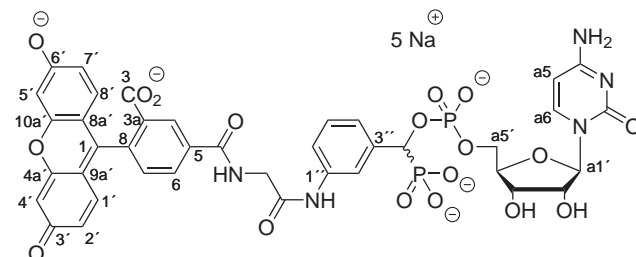
Bei der Reaktion von **7-p-(5)** gemäß der AAV2 konnte **8-p-(5)** nicht isoliert werden.

Gesamtausbeute: 4 %, $C_{37}H_{27}N_4Na_5O_{17}P_2$, 976.52 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z $[M-5Na+4H]^-$ ber.: 865.1165, gef.: 865.1153; $\Delta = 1.39$ ppm

1H -NMR (300 MHz, H_2O-d_2): $\delta = 8.11 + 8.08$ (2 bd, 1H, $^3J_{5,4} = 9.9$ Hz und 9.2 Hz, H-5), 7.96 (2 d, 1H, $^3J_{4,5} = 8.5$ Hz, H-4), 7.82 + 7.79 (2 bs, 1H, H-7), 7.61 (d, 0.5H, $^3J_{a6,a5} = 7.6$ Hz, H-a6), 7.57–7.41 (m, 4.5H, H-2''/H6'', H3''/H5'', H-a6), 7.21 (d, 2H, $^3J_{1',8',2',7'} = 9.7$ Hz, H-1'/H-8'), 6.69–6.60 (m, 4H, H-2'/H-7', H-4'/H-5'), 5.93 (2 d, 1H, $^3J_{a5,a6} = 7.4$ Hz und 7.5 Hz, H-a5), 5.81 + 5.74 (2 d, 1H, $^3J_{a1',a2'} = 4.6$ Hz und 3.6 Hz, H-a1'), 5.19 (dd, 1H, $^2J_{CHP,PO_3} = 10.7$ Hz, $^3J_{CHP,PO_4} = 10.7$ Hz, CHP), 3.98 (2 dd, 0.5H, $^3J_{a2',a1'} = 4.8$ Hz, $^3J_{a2',a1'} = 4.8$ Hz, H-a2'), 3.96–3.82 (m, 3H, H-a2', H-a4', H-a5a', H-a5b'), 3.71 (dd, 0.5H, $^3J_{a3',a2'} = 5.0$ Hz, $^3J_{a3',a4'} = 5.0$ Hz, H-a3'), 3.70–3.66 (m, 0.5H, H-a5a'), 3.59 (dd, 0.5H, $^3J_{a3',a2'} = 4.9$ Hz, $^3J_{a3',a4'} = 4.9$ Hz, H-a3'), 3.18 (q, 30H, $^3J_{CH_2,CH_3} = 7.3$ Hz, NEt₃), 1.26 (t, 45H, $^3J_{CH_2,CH_3} = 7.3$ Hz, NEt₃) ppm.

Pentatrium Cytidin-5'-yl-[(R/S)-(3-(2-(fluoresceinyl-5-carboxamido)acetamido)phenyl)-phosphonomethyl]-phosphat (8-m-G-(5))



Die Umsetzung des α -Hydroxymethylphosphonats **6-m-G-(5)** (26.8 mg, 0.0277 mmol) und **1** (24.0 mg, 0.0421 mmol, 1.5 Äq.) mit 1*H*-Tetrazol (4.1 mg, 0.058 mmol, 2.1 Äq.) über Nacht (19 h) und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 10.0 μ l, 0.055 mmol, 2.0 Äq.) für 3 h gemäß der AAV1 (RP-18, Säule A, $H_2O + 0.1\%$ TFA/ACN + 0.1 % TFA, [B] = 70 %, Fluss 20 mL/min, $t_R = 30.3$) und Lyophilisation aus H_2O/ACN ergab **7-m-G-(5)** als farblosen Feststoff (24.6 mg). Davon wurden 13.6 mg (9.3 μ mol) in 1.5 mL MeOH gemäß der AAV2 zuerst mit H_2 und Pd/C 10 % (3.4 mg, Reaktionszeit 30 min) und anschließend mit NaOMe in MeOH (1.0 M, 0.48 mL, 0.48 mmol, 50 Äq., Reaktionszeit 40 min) umgesetzt. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule A, 0.05 M TEAB-Puffer/ACN, Gradient: [B] = 8–15 % in 17 min, Fluss 20 mL/min, $t_R = 13.8$) ergab **8-m-G-(5)** als intensiv orange gefärbtes Lyophilisat.

Ausbeute: 7.01 mg, 7.1 μmol (43%), $\text{C}_{39}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{Na}_5\text{O}_{18}\text{P}$, 1033.57 g/mol

HRMS (ESI-FTICR): m/z $[\text{M}-5\text{Na}+4\text{H}]^-$ ber.: 922.1380, gef.: 922.1397; $\Delta = 1.84$ ppm

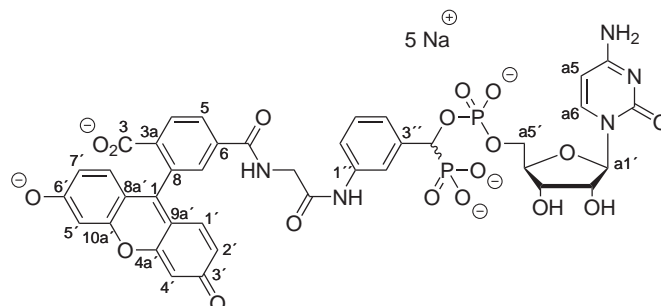
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 8.33 + 8.33$ (2 d, 1H, $2 \times {}^3J_{7,5} = 2.1$ Hz, H-4), 8.11 + 8.10 (2 dd, 1H, $2 \times {}^3J_{5,4} = 7.9$ Hz, $2 \times {}^4J_{5,7} = 1.8$ Hz, H-6), 7.74 + 7.61 (2 d, 1H, $2 \times {}^3J_{a6,a5} = 7.6$ Hz, H-a6), 7.53 (d, 0.5H, $2 \times {}^3J_{6'',5''} = 8.3$ Hz, H-6''), 7.51 + 7.49 (2 d, 1H, $2 \times {}^3J_{4,5} = 8.0$ Hz, H-7), 7.47 (d, 0.5H, ${}^3J_{6'',5''} = 8.3$ Hz, H-6''), 7.46 + 7.44 (2 bs, 1H, H-2''), 7.34 + 7.34 (2 d, 1H, ${}^3J_{5'',4''} = 7.9$ Hz und 7.5 Hz, ${}^3J_{5'',6''} = 7.9$ Hz und 7.5 Hz, H-5''), 7.36–7.29 (m, 1H, H-4''), 7.29–7.25 (m, 2H, H-1'/H-8'), 6.77–6.73 (m, 4H, H-2'/H-7', H-4'/H-5'), 6.06 + 6.01 (2 d, 1H, ${}^3J_{a5,a6} = 7.7$ Hz und 7.4 Hz, H-a5), 5.85 + 5.79 (2 d, 1H, ${}^3J_{a1',a2'} = 4.9$ Hz und 3.7 Hz, H-a1'), 5.20 (dd, 1H, ${}^2J_{\text{CHP},\text{PO}_3} = 13.2$ Hz, ${}^3J_{\text{CHP},\text{PO}_4} = 10.5$ Hz, CHP), 4.35–4.30 (m, 2H, Glycin- CH_2), 4.04–3.97 (m, 2H, H-a4', H-a5b'), 3.76 + 3.76 (2 dd, 1H, ${}^3J_{a2',a1'} = 4.9$ Hz und 5.0 Hz, ${}^3J_{a2',a1'} = 4.5$ Hz und 3.9 Hz, H-a2'), 3.84–3.79 (m, 1H, H-a5a'), 3.82 + 3.55 (2 dd, 1H, ${}^3J_{a3',a2'} = 5.3$ Hz und 4.9 Hz, ${}^3J_{a3',a4'} = 5.0$ Hz und 4.9 Hz, H-a3') ppm.

HMQC (^1H : 300 Mhz; ^{13}C : 76 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 140.9$ (C-a6), 131.4 (C-1'/C-8'), 130.3 (C-7), 128.7 (C-5''), 128.3 (C-6), 127.1 (C-4), 124.9 (C-4''), 121.5 (C-2'/C-7'), 121.2 (C-6''), 120.6 (C-2''), 103.1 (C-4'/C-5'), 96.1 (C-a5), 89.2 (C-a1'), 82.4 (C-a4'), 75.7 (d, ${}^1J_{\text{CHP},\text{PO}_3} = 172$ Hz, C-CHP), 74.1 (C-a2'), 68.2+68.1 (C-a3'), 63.8 (C-a5'), 43.5 (C-Glycin- CH_2) ppm.

HMBC (^1H : 300 Mhz; ^{13}C : 76 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 176.5$ (C-3'/C-6'), 173.6 (C-3), 169.9 ($\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})$), 169.9 (Amid-Carbonyl), 165.8 (C-a4), 158.2 (C-1), 158.1 (C-4a'/C-10a'), 157.3 (C-a2), 139.9 (C-5), 138.5 (C-3''), 136.3 (C-1''), 135.2 (C-8), 134.2 (C-3a), 114.0 (C-8a'/C-9a') ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 14.59$ (d, ${}^3J_{\text{P},\text{P}} = 33.7$ Hz, PO_3), 1.82 + 1.53 (2 d, ${}^3J_{\text{P},\text{P}} = 35.6$ Hz und 34.3 Hz, PO_4) ppm.

Pentatrium Cytidin-5'-yl-[(*R/S*)-(3-(2-(fluoresceinyl-6-carboxamido)acetamido)phenyl)-phosphonomethyl]-phosphat (8-*m*-G-(6)**)**



Die Umsetzung des α -Hydroxymethylphosphonats **6-*m*-G-(6)** (13.6 mg, 0.0141 mmol) und **1** (12.0 mg, 0.0211 mmol, 1.5 Äq.) mit 1*H*-Tetrazol (2.3 mg, 0.0323 mmol, 2.3 Äq.) über Nacht (20 h) und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 5.1 μ l, 0.028 mmol, 2.0 Äq.) für 3 h gemäß der AAV1 (RP-18, Säule A, H₂O + 0.1 % TFA/ACN + 0.1 % TFA, [B] = 70 %, Fluss 20 mL/min, t_R = 14.4) und Lyophilisation aus H₂O/ACN ergab **7-*m*-G-(6)** als farblosen Feststoff (15.4 mg). Davon wurden 5.9 mg (4.1 μ mol) in 0.8 mL MeOH gemäß der AAV2 zuerst mit H₂ und Pd/C 10 % (1.53 mg, Reaktionszeit 1.25 h) und anschließend mit NaOMe in MeOH (1.0 M, 0.21 mL, 0.21 mmol, 50 Äq., Reaktionszeit 35 min) umgesetzt. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule A, 0.05 M TEAB-Puffer/ACN, Gradient: [B] = 8–13 % in 13 min, Fluss 20 mL/min, t_R = 9.3) ergab **8-*m*-G-(6)** als intensiv orange gefärbtes Lyophilisat.

Ausbeute: 3.6 mg, 3.5 μ mol (65 %), C₃₉H₃₀N₅Na₅O₁₈P, 1033.57 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z [M-5Na+4H]⁻ ber.: 922.1380, gef.: 922.1410; Δ = 3.25 ppm

¹H-NMR (500 MHz, H₂O-*d*₂): δ = 8.13 + 8.11 (2 dd, 1H, 2 x ³ $J_{5,4}$ = 7.8 Hz, 2 x ⁴ $J_{5,7}$ = 1.6 Hz, H-5), 7.97 + 7.97 (2 d, 1H, ³ $J_{4,5}$ = 8.0 Hz und 7.9 Hz, H-4), 7.85 + 7.84 (2 d, 1H, 2 x ³ $J_{7,5}$ = 1.5 Hz, H-7), 7.64 + 7.53 (2 d, 1H, 2 x ³ $J_{a6,a5}$ = 7.6 Hz, H-a6), 7.50–7.27 (m, 4H, H-2'', H-4'', H-5'', H-6''), 7.29–7.22 (m, 2H, H-1'/H-8'), 6.77 (bs, 2H, H-4'/H-5'), 6.73 (bd, 2H, ³ $J_{2'/7',1'/8'}$ = 9.3 Hz, H-2'/H-7'), 5.98 + 5.94 (2 d, 1H, ³ $J_{a5,a6}$ = 7.7 Hz und 7.5 Hz, H-a5), 5.71 + 5.70 (2 d, 1H, ³ $J_{a1',a2'}$ = 4.4 Hz und 3.3 Hz, H-a1'), 5.14 (dd, 1H, ² J_{CHP,PO_3} = 13.7 Hz, ³ J_{CHP,PO_4} = 10.2 Hz, CHP), 4.30–4.20 (m, 2H, Glycin-CH₂), 3.99–3.87 (m, 2H, H-a4', H-a5b'),

3.86 + 3.85 (2 dd, 1H, 2 x ³ $J_{a2',a1'}$ = 4.5 Hz, 2 x ³ $J_{a2',a1'}$ = 4.5 Hz, H-a2'), 3.77 (dd, 0.5H, ³ $J_{a3',a2'}$ = 5.0 Hz, ³ $J_{a3',a4'}$ = 5.0 Hz, H-a3'), 3.76–3.70 (m, 1H, H-a5a'), 3.53 (dd, 0.5H, ³ $J_{a3',a2'}$ = 5.0 Hz, ³ $J_{a3',a4'}$ = 5.0 Hz, H-a3') ppm.

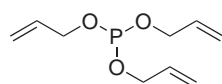
HMQC (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 76 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 141.4$ (C-a6), 131.7 (C-1'/C-8'), 128.8 (C-7), 128.8 (C-5), 128.7 (C-4), 125.0 (C-4''), 122.3 (C-2'/C-7'), 120.7 (C-6''), 120.6 (C-2''), 103.4 (C-4'/C-5'), 96.4 (C-a5), 89.4 (C-a1'), 82.4 (C-a4'), 43.5 (C-Glycin- CH_2) ppm. ²

HMBC (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 76 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 113.4$ (C-8a'/C-9a'), 133.5 (C-6 oder C-8), 142.7 (C-3a), 157.1 (C-a2) ppm. ²

^{31}P -NMR (122 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 14.42$ (d, $^3J_{\text{P,P}} = 33.6$ Hz, PO_3), 1.84 + 1.56 (2 d, $^3J_{\text{P,P}} = 34.2$ Hz und 33.7 Hz, PO_4) ppm.

9.5. Synthese der diastereomerreinen FP-Sonden

Triallylphosphit (11a)



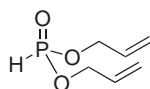
In einem ausgeheiztem Dreihalskolben wurde Phosphortrichlorid (12.7 mL, 0.146 mol) in 200 mL trockenem Toluol vorgelegt und unter Eiskühlung eine Lösung aus Allylalkohol (31.7 mL, 0.466 mol, 3.2 Äq.) sowie Triethylamin (65.0 mL, 0.466 mol, 3.2 Äq.) in 60 mL trockenem Toluol zugetropft. Die Reaktionslösung wurde über Nacht intensiv gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel i.V. entfernt. Das Triallylphosphit (**11**) wurde durch Niederdruckdestillation (0.6 mbar, 58–62 °C) als farblose Flüssigkeit isoliert.

Ausbeute: 22.36 g, 0.111 mol (76 %), $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_3\text{P}$, 202.19 g/mol

^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 5.93$ (ddt, 3H, $^3J_{2,3\text{trans}} = 17.1$ Hz, $^3J_{2,3\text{cis}} = 10.3$ Hz, $^3J_{2,1} = 5.1$ Hz, H-2), 5.28 (dtd, 3H, $^3J_{3\text{trans},2} = 17.1$ Hz, $^4J_{3\text{trans},1} = 1.6$ Hz, $^2J_{3\text{trans},3\text{cis}} = 1.6$ Hz, H-3trans), 5.17 (dtd, 3H, $^3J_{3\text{cis},2} = 10.4$ Hz, $^4J_{3\text{cis},1} = 1.4$ Hz, $^2J_{3\text{cis},3\text{trans}} = 1.4$ Hz, H-3cis), 4.34 (dddd, 6H, $^3J_{1,\text{P}} = 8.2$ Hz, $^3J_{1,2} = 5.3$ Hz, $^3J_{1,3\text{cis}} = 1.4$ Hz, $^3J_{1,3\text{trans}} = 1.4$ Hz, H-1) ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, ^1H -gekoppelt, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 139.38$ (sept, $^3J_{\text{P},1} = 8.2$ Hz) ppm.

²Das Signal/Rauschverhältnis ist für eine vollständige Zuordnung der Signale ungenügend. Daher werden lediglich die gefundenen Signale aufgelistet.

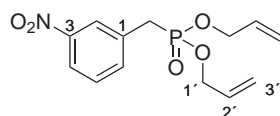
Diallylphosphonat (11b)

Zu einer intensiv rührenden Lösung aus Phosphortrichlorid (6.4 mL, 0.073 mol, 1 Äq.) in 200 mL trockenem Toluol wurde innerhalb von 70 min eine Lösung aus Allylalkohol (9.9 mL, 0.146 mol, 2 Äq.) und Pyridin (11.8 mL, 0.146 mol, 2 Äq.) in 40 mL trockenem Toluol zugegeben. Nach Reaktion über Nacht wurden 75 mL H₂O zugegeben und für weitere 5 min gerührt. Die organische Phase wurde abdekantiert und die wässrige mit Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum eingedunstet, in 200 mL DCM aufgenommen, mit 200 mL NaHCO₃ (ges.), 100 mL H₂O und 100 mL Brine gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Produkt **20** wurde durch Niederdruckdestillation (0.36 mbar, 60 °C) als farblose Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 5.10 g, 5.72 g, 0.035 mol (48 %), C₆H₁₁O₃P, 162.12 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.91 (d, 1H, ¹J_{H,P} = 702.7 Hz, P-H), 6.00 (m, 3H, H-2), 5.35 (bd, 2H, ³J_{3trans,2} = 17.0 Hz, H-3trans), 5.29 (bd, 2H, ³J_{3cis,2} = 10.4 Hz, H-3cis), 4.53 (bdd, 6H, ³J_{1,P} = 9.6 Hz, ³J_{1,2} = 5.2 Hz, H-1) ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, ¹H-gekoppelt, DMSO-*d*₆): δ = 10.04 (dq, ¹J_{P,H} = 702.7 Hz, ³J_{P,1} = 9.8 Hz) ppm.

Diallyl-3-nitrobenzylphosphonat (13-*m*)

3-Nitrobenzylbromid (5.25 g, 24.3 mmol) und Triallylphosphit **11a** (5.62 ml, 5.90 g, 29.2 mmol, 1.2 Äq.) wurden gemeinsam in 10 mL trockenem Toluol in einem Mikrowellenreaktor für 15 h auf 105 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde eingedunstet und Kugelrohrdestillation (3 × 10⁻³ mbar, 200 °C) ergab nach Abkühlung auf Raumtemperatur **13-*m*** als blass gelben Feststoff.

Ausbeute: 4.11 g, 13.8 mmol (57 %), C₁₃H₁₆NO₅P, 297.24 g/mol

*R*_f = 0.37 (EE/Hex 80:20)

HRMS (ESI-TOF): *m/z*[M+H]⁺ ber.: 298.0839, gef.: 298.0818; Δ = 0.21 ppm

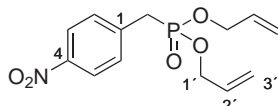
¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-*d*₁): δ = 8.17 (s, 1H, H-2), 8.17 (s, 1H, H-2), 8.13 (d,

1H, $^3J_{4,5} = 8.1$ Hz, H-4), 8.13 (d, 1H, $^3J_{4,5} = 8.1$ Hz, H-4), 8.13 (d, 1H, $^3J_{4,5} = 8.1$ Hz, H-4), 7.66 (d, 1H, $^3J_{6,5} = 7.6$ Hz, H-6), 7.48 (dd, 1H, $^3J_{5,6} = 7.5$ Hz, $^3J_{5,4} = 7.5$ Hz, H-5), 5.87 (m, 2H, H-2'), 5.30 (bd, 2H, $^3J_{3'trans,2'} = 17.1$ Hz, H-3'trans), 5.23 (bd, 2H, $^3J_{3'cis,2'} = 10.4$ Hz, H-3'cis), 4.50–4.41 (m, 4H, H-1'), 3.30 (d, 2H, $^2J_{CH_2P,P} = 22.5$ Hz, $\underline{CH_2P}$) ppm.

^{13}C -NMR (76 MHz, $CHCl_3-d_1$): $\delta = 147.9$ (d, $^4J_{3,P} = 3.4$ Hz, C-3), 135.7 (d, $^3J_{6,P} = 6.3$ Hz, C-6), 133.4 (d, $^2J_{1,P} = 9.2$ Hz, C-1), 132.2 (d, $^3J_{2',P} = 6.0$ Hz, C-2'), 129.1 (d, $^4J_{5,P} = 2.7$ Hz, C-5), 124.3 (d, $^3J_{2,P} = 6.8$ Hz, C-2), 121.6 (d, $^5J_{4,P} = 2.9$ Hz, C-4), 117.9 (C-3'), 66.4 (d, $^2J_{1',P} = 6.5$ Hz, C-1'), 33.2 (d, $^1J_{\underline{CH_2P},P} = 138.4$ Hz, $\underline{CH_2P}$) ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, $CHCl_3-d_1$): $\delta = 26.14$ (s) ppm.

Diallyl-(4-nitrobenzyl)phosphonat (**13-p**)



3-Nitrobenzylbromid (5.25 g, 24.3 mmol) und Triallylphosphit **11a** (5.62 ml, 5.90 g, 29.2 mmol, 1.2 Äq.) in 10 mL trockenem Toluol wurden in einem Mikrowellenreaktor für 15 h auf 95 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde eingengt und Kugelrohrdestillation (6×10^{-3} mbar, 200 °C) ergab nach Abkühlung auf Raumtemperatur **13-p** als blass gelben Feststoff.

Ausbeute: 4.87 g, 16.4 mmol (67%), $C_{13}H_{16}NO_5P$, 297.24 g/mol

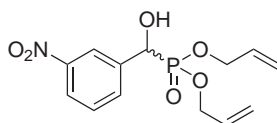
$R_f = 0.33$ (EE/Hex 80:20)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H] $^+$ ber.: 298.0839, gef.: 298.0853; $\Delta = 4.70$ ppm

1H -NMR (300 MHz, $CHCl_3-d_1$): $\delta = 8.18$ (d, 2H, $^3J_{3/5,2/6} = 8.5$ Hz, H-3/H-5), 7.48 (dd, 2H, $^3J_{2/6,3/5} = 8.7$ Hz, $^4J_{7/9,P} = 2.4$ Hz, H-2/H-6), 5.87 (m, 2H, H-2'), 5.30 (bd, 2H, $^3J_{3'trans,2'} = 17.1$ Hz, H-3'trans), 5.23 (bd, 2H, $^3J_{3'cis,2'} = 10.4$ Hz, H-3'cis), 4.52–4.45 (m, 4H, H-1'), 3.30 (d, 2H, $^2J_{CH_2P,P} = 22.5$ Hz, $\underline{CH_2P}$) ppm.

^{13}C -NMR (76 MHz, $CHCl_3-d_1$): $\delta = 146.9$ (d, $^5J_{5,P} = 4.4$ Hz, C-4), 139.2 (d, $^2J_{1,P} = 9.3$ Hz, C-1), 132.4 (d, $^3J_{2',P} = 6.1$ Hz, C-2'), 130.6 (d, $^3J_{2/6,P} = 6.5$ Hz, C-2/C-6), 123.6 (d, $^5J_{3/5,P} = 3.2$ Hz, C-3/C-5), 118.2 (s, C-3'), 66.7 (d, $^2J_{1',P} = 6.5$ Hz, C-1'), 33.9 (d, $^1J_{\underline{CH_2P},P} = 137.6$ Hz, $\underline{CH_2P}$) ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, $CHCl_3-d_1$): $\delta = 26.13$ (s) ppm.

(*R/S*)-Diallyl-((3-aminophenyl)hydroxymethyl)phosphonat (14-*m***)**

Zu 3-Nitrobenzaldehyd (1.88 g, 12.44 mmol) und Diallylphosphonat **11b** (2.61 mL, 18.0 mmol, 1.5 Äq.) in 7 mL trockenem DCM wurde Triethylamin (2.60 ml, 18.7 mmol, 1.5 Äq.) zugetropft. Eine DC-Kontrolle zeigte nach 2.2 h die vollständige Umsetzung des Aldehyds und die Reaktionslösung wurde durch Kieselgel gefiltert. Das Produkt **14-*m*** wurde mit Hex/EE 20:80 eluiert und nach Trocknen im Vakuum als blass gelber, wachsartiger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3.44 g, 10.9 mmol, 89 %, $C_{13}H_{16}NO_6P$, 313.2 g/mol

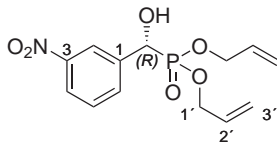
$R_f = 0.27$ (EE/Hex 80:20)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+Na]⁺ ber.: 336.0607, gef.: 336.0615; $\Delta = 2.38$ ppm

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-*d*₁): $\delta = 8.41$ (s, 1H, H-2), 8.16 (bd, 1H, ³ $J_{4,5} = 8.1$ Hz, H-4), 7.82 (d, 1H, ³ $J_{6,5} = 7.6$ Hz, H-6), 7.52 (dd, 1H, ³ $J_{5,4} = 8.0$ Hz, ³ $J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-5), 5.98–5.70 (m 3H, All-CH, OH), 5.56–5.16 (m, 5H, All=CH₂, CHP), 4.61–4.50 (m, 4H, All-CH₂-) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-*d*₁): $\delta = 148.1$ (d, ⁴ $J_{C,P} = 3.1$ Hz, C-3), 139.1 (d, ² $J_{C,P} = 1.6$ Hz, C-1), 133.0 (d, ³ $J_{C,P} = 5.4$ Hz, C-6), 132.3 + 132.2 (2 d, ³ $J_{C,P} = 4.3$ Hz, All-CH), 129.0 (d, ⁴ $J_{C,P} = 2.5$ Hz, C-5), 122.8 (d, ⁵ $J_{C,P} = 2.9$ Hz, C-4), 122.1 (d, ³ $J_{C,P} = 5.5$ Hz, C-2), 118.5 (d, ⁴ $J_{C,P} = 5.5$ Hz, All=CH₂), 69.8 (d, ¹ $J_{CHOH,P} = 160.5$ Hz, CHOH), 68.1 + 67.5 (2 d, 2 x ² $J_{1',P} = 7.4$ Hz, All-CH-) ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, CHCl₃-*d*₁): $\delta = 21.71$ (s) ppm.

(*R*)-Diallyl-(hydroxy-(3-nitrophenyl)methyl)phosphonat ((*R*)-14-*m***)**

Die Reaktion von **13-*m*** (1.4 g, 4.71 mmol) mit NaHMDS (7.1 mL, 7.07 mmol, 1.5 Äq., Reaktionszeit 2 h) und (–)-(8,8-Dichlorcampherylsulfonyl)oxaziridin (2.81 g, 9.42 mmol, 2 Äq., Reaktionszeit 4.5 h) in 12 mL THF gemäß der AAV3 ergab (***R***)-**14-*m*** als leicht bräunliche zähe Masse.

Ausbeute: 788.3 g, 2.52 mmol (53 %), $ee = 87$ %, $C_{13}H_{16}NO_6P$, 313.24 g/mol

$R_f = 0.27$ (EE/Hex 80:20)

$[\alpha]_D^{23.0} = 24.0^\circ$ ($c = 0.613$, CHCl_3)

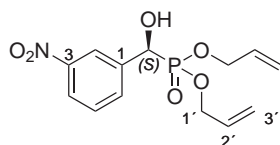
HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 314.0788, gef.: 314.0794; $\Delta = 1.91$ ppm

¹H-NMR (300 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 8.39$ (br, 1H, H-2), 8.18 (d, 1H, $^3J_{4,5} = 8.1$ Hz, H-4), 7.83 (d, 1H, $^3J_{6,5} = 7.8$ Hz, H-6), 7.54 (dd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.0$ Hz, $^3J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-5), 5.82 (m, 2H, H-2'), 5.35–5.26 (m, 2H, H-3' trans), 5.26–5.20 (m, 2H, H-3' cis), 5.19 (d, 1H, $^2J_{\text{CHOH,P}} = 10.9$ Hz, CHOH), 4.59–4.50 (m, 4H, H-1') ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 148.3$ (bs, C-3), 138.5 (bs, C-1), 133.0 (bs, C-6), 132.3 (bs, C-2'), 129.2 (bs, C-5), 123.1 (d, $^5J_{4,P} = 2.9$ Hz, C-4), 122 (d, $^3J_{2,P} = 5.5$ Hz, C-2), 118.8 (C-3'), 70.1 (d, $^1J_{\text{CHOH,P}} = 159.1$ Hz, CHOH), 68.0 + 67.7 (2 d, 2 x $^2J_{1',P} = 7.1$ Hz, C-1') ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 21.51$ (s) ppm.

(S)-Diallyl-(hydroxy-(3-nitrophenyl)methyl)phosphonat ((S)-14-m)



Die Reaktion von **13-m** (0.90 g, 3.03 mmol) mit NaHMDS (4.5 mL, 4.54 mmol, 1.5 Äq., Reaktionszeit 3 h) und (+)-(8,8-Dichlorcampherylsulfonyl)oxaziridin (1.81 g, 6.06 mmol, 2 Äq., Reaktionszeit 3.5 h) in 12 mL THF gemäß der AAV3 ergab **(S)-14-m** als leicht bräunliche zähe Masse.

Ausbeute: 623.1 g, 1.99 mmol (66%), $ee = 85\%$, $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_6\text{P}$, 313.24 g/mol

$R_f = 0.30$ (EE/Hex 80:20)

$[\alpha]_D^{23.0} = -20.0^\circ$ ($c = 0.697$, CHCl_3)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 314.0788, gef.: 314.0791; $\Delta = 0.96$ ppm

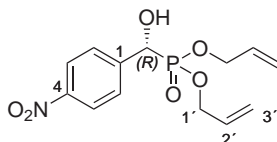
¹H-NMR (300 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 8.39$ (br, 1H, H-2), 8.18 (d, 1H, $^3J_{4,5} = 8.1$ Hz, H-4), 7.83 (d, 1H, $^3J_{6,5} = 8.0$ Hz, H-6), 7.55 (dd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.0$ Hz, $^3J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-5), 5.82 (m, 2H, H-2'), 5.36–5.27 (m, 2H, H-3' trans), 5.26–5.19 (m, 2H, H-3' cis), 5.20 (d, 1H, $^2J_{\text{CHOH,P}} = 10.9$ Hz, CHOH), 4.58–4.50 (m, 4H, H-1'), 3.95 (dd, 1H, $^3J_{\text{OH,CH}} = 7.9$ Hz, $^3J_{\text{OH,P}} = 5.0$ Hz OH) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 148.2$ (d, $^4J_{C,P} = 3.1$ Hz, C-3), 138.7 (d, $^2J_{C,P} = 2.1$ Hz, C-1), 133.0 (d, $^3J_{C,P} = 5.2$ Hz, C-6), 132.3 + 132.2 (2 d, $^3J_{C,P} = 5.8$ Hz, All-CH), 129.1 (d, $^4J_{C,P} = 2.7$ Hz, C-5), 123.0 (d, $^5J_{C,P} = 3.1$ Hz, C-4), 122.1 (d, $^3J_{C,P}$

= 5.6 Hz, C-2), 118.8 (d, $^4J_{C,P} = 1.8$ Hz, All=CH₂), 70.0 (d, $^1J_{\text{CHOH},P} = 159.1$ Hz, CHOH), 68.1 + 67.6 (2 d, $2 \times ^2J_{1',P} = 7.1$ Hz, All-CH-) ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 21.60$ (s) ppm.

(*R*)-Diallyl-(hydroxy-(4-nitrophenyl)methyl)phosphonat ((*R*)-14-*p*)



Die Reaktion von **13-p** (0.97 g, 3.26 mmol) mit NaHMDS (4.9 mL, 4.90 mmol, 1.5 Äq., Reaktionszeit 1 h) und (-)-(8,8-Dichlorcampherylsulfonyl)oxaziridin (1.95 g, 6.53 mmol, 2 Äq., Reaktionszeit 3 h) in 16 mL THF gemäß der AAV3 ergab (*R*)-14-*p* als leicht bräunlichen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 0.56 g, 1.79 mmol (55 %), *ee* = 83 %, C₁₃H₁₆NO₆P, 313.24 g/mol

R_f = 0.27 (EE/Hex 80:20)

$[\alpha]_D^{23.0} = 14.6^\circ$ (*c* = 0.636, CHCl₃)

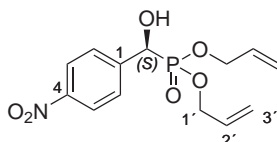
HRMS (ESI-TOF): *m/z*[M+H]⁺ ber.: 314.0788, gef.: 314.0789; $\Delta = 0.32$ ppm

^1H -NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 8.21$ (d, 2H, $^3J_{3/5,2/6} = 8.5$ Hz, H-3/H-5), 7.68 (dd, 2H, $^3J_{2/6,3/5} = 8.8$ Hz, $^4J_{7/9,P} = 2.2$ Hz, H-2/H-6), 5.87 (m, 2H, H-2'), 5.34–5.15 (m, 5H, H-3' trans, H-3' cis, CHP), 4.65 (dd, 1H, $^3J_{\text{OH},\text{CH}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{OH},P} = 5.3$ Hz OH), 4.60–4.46 (m, 4H, H-1')

^{13}C -NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 147.6$ (d, $^5J_{C,P} = 3.8$ Hz, C-4), 143.9 (d, $^2J_{C,P} = 2.4$ Hz, C-1), 132.3 + 132.2 (d, $^3J_{C,P} = 5.4$ Hz, C-2'), 127.8 (d, $^3J_{C,P} = 5.3$ Hz, C-2/C-6), 123.3 (d, $^5J_{C,P} = 2.8$ Hz, C-3/C-5), 118.7 (s, $^4J_{C,P} = 6.8$ Hz, C-3'), 70.2 (d, $^1J_{C,P} = 158.5$ Hz, CH₂P), 68.1 + 67.6 (d, $^2J_{C,P} = 6.5$ Hz, C-1')

^{31}P -NMR (122 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 21.44$ (s) ppm.

(*S*)-Diallyl-(hydroxy-(4-nitrophenyl)methyl)phosphonat ((*S*)-14-*p*)



Die Reaktion von **13-p** (1.04 g, 3.50 mmol) mit NaHMDS (5.25 mL, 5.25 mmol, 1.5 Äq., Reaktionszeit 2 h) und (+)-(8,8-Dichlorcampherylsulfonyl)oxaziridin (2.09 g, 7.00 mmol,

2 Äq., Reaktionszeit 3.8 h) in 17 mL THF gemäß der AAV3 ergab (**S**)-**14-p** als leicht bräunlichen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 0.65 g, 2.08 mmol (59 %), $ee = 83\%$, $C_{13}H_{16}NO_6P$, 313.24 g/mol

$R_f = 0.30$ (DCM/MeOH 95:5)

$[\alpha]_D^{23.0} = -13.2^\circ$ ($c = 0.490$, $CHCl_3$)

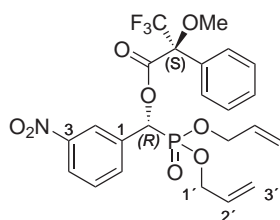
HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 314.0788, gef.: 314.0789; $\Delta = 0.00$ ppm

¹H-NMR (300 MHz, $CHCl_3-d_1$): $\delta = 7.95$ (d, 2H, $^3J_{3/5,2/6} = 8.2$ Hz, H-3/H-5), 7.68 (dd, 2H, $^3J_{2/6,3/5} = 8.8$ Hz, $^4J_{7/9,P} = 2.1$ Hz, H-2/H-6), 5.87 (m, 2H, H-2'), 5.35–5.18 (m, 5H, H-3' trans, H-3' cis, CHP), 4.65 (dd, 1H, $^3J_{OH,CH} = 6.6$ Hz, $^3J_{OH,P} = 5.3$ Hz OH), 4.60–4.46 (m, 4H, H-1') ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, $CHCl_3-d_1$): $\delta = 147.6$ (d, $^5J_{C,P} = 3.9$ Hz, C-4), 143.8 (d, $^2J_{C,P} = 2.5$ Hz, C-1), 132.3 + 132.2 (d, $^3J_{C,P} = 5.7$ Hz, C-2'), 127.8 (d, $^3J_{C,P} = 5.3$ Hz, C-2/C-6), 123.3 (d, $^5J_{C,P} = 2.8$ Hz, C-3/C-5), 118.7 (s, $^4J_{C,P} = 6.4$ Hz, C-3'), 70.2 (d, $^1J_{C,P} = 158.3$ Hz, $\underline{C}H_2P$), 68.1 + 67.6 (d, $^2J_{C,P} = 7.0$ Hz, C-1') ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, $CHCl_3-d_1$): $\delta = 21.39$ (s) ppm.

(R)-[[(Bis(allyloxyphosphoryl)](3-nitrophenyl)methyl (2S)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropanoat ((R,S)-17-m)



In einem ausgeheizten NMR-Röhrchen wurde das α -Hydroxymethylphosphonat (**R**)-**14-m** (14.1 mg, 0.045 mmol) in 400 μ L $CHCl_3-d_1$ und 200 μ L Pyridin gelöst und (**R**)-MTPA-Cl (10.1 μ L, 0.054 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben. Der Inhalt wurde durchmischt, für 3 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann ³¹P-NMR-Spektren aufgenommen. Das Lösungsmittel wurde i.V. entfernt, in 5 mL EE/Hex 3:1 aufgenommen und direkt per MPLC (Büchi 75 x 12 mm Kartusche, Kieselgel 0.040–0.063, Hex/EE-Gradient: [B] = 25–75 %) gereinigt. Der Mosher-Ester (**R,S**)-**17-m** wurde nach Trocknen im Feinvakuum als blaß gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 16.9 mg, 0.032 mmol (71 %), $C_{23}H_{23}F_3NO_8P$, 529.40 g/mol

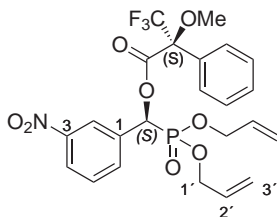
$R_f = 0.33$ (EE/Hex 50:50)

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 8.13 (d, 1H, $^3J_{4,5}$ = 8.2 Hz, H-4), 8.11 (m, 1H, H-2), 7.64 (d, 1H, $^3J_{6,5}$ = 7.9 Hz, H-6), 7.51 (dd, 1H, $^3J_{5,4}$ = 7.7 Hz, $^3J_{5,6}$ = 7.7 Hz, H-5), 7.50–7.32 (m, 5H, Ph), 6.38 (d, 1H, $^2J_{\text{CHOH,P}}$ = 13.7 Hz, CHO), 5.90–5.70 (m, 2H, H-2'), 5.30–5.20 (m, 4H, H-3' trans, H-3' cis), 4.64–4.37 (m, 4H, H-1'), 3.62 (bs, 3H, OMe) ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 16.37 (s) ppm.

¹⁹F-NMR (282 MHz, CHCl₃-d₁): δ = -74.65 (s) ppm.

(S)-[Bis(allyloxyphosphoryl)](3-nitrophenyl)methyl (2S)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropanoat ((S,S)-17-m)



In einem ausgeheizten NMR-Röhrchen wurde das α -Hydroxymethylphosphonat (**S**)-**14-m** (14.0 mg, 0.045 mmol) in 400 μ L CHCl₃-d₁ und 200 μ L Pyridin gelöst und (*R*)-MTPA-Cl (10.1 μ L, 0.054 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben. Der Inhalt wurde durchmischt, für 3 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann ³¹P-NMR-Spektren aufgenommen. Das Lösungsmittel wurde i.V. entfernt, in 5 mL EE/Hex 3:1 aufgenommen und direkt per MPLC (Büchi 75 x 12 mm Kartusche, Kieselgel 0.040–0.063, Hex/EE-Gradient: [B] = 25–75 %) gereinigt. Der Mosher-Ester (**S,S**)-**17-m** wurde nach Trocknen im Feinvakuum als blaß gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 17.1 mg, 0.032 mmol (72 %), C₂₃H₂₃F₃NO₈P, 529.40 g/mol

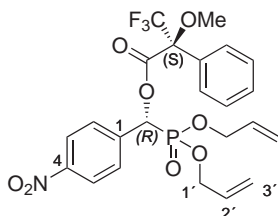
R_f = 0.33 (EE/Hex 50:50)

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 8.30 (m, 1H, H-2), 8.23 (d, 1H, $^3J_{4,5}$ = 8.1 Hz, H-4), 7.80 (d, 1H, $^3J_{6,5}$ = 7.9 Hz, H-6), 7.58 (dd, 1H, $^3J_{5,4}$ = 8.0 Hz, $^3J_{5,6}$ = 0.0 Hz, H-5), 7.54–7.36 (m, 5H, Ph), 6.38 (d, 1H, $^2J_{\text{CHOH,P}}$ = 13.6 Hz, CHO), 5.89–5.66 (m, 2H, H-2'), 5.26–5.22 (m, 2H, H-3' trans), 5.22–5.15 (m, 2H, H-3' cis), 4.52–4.22 (m, 2H, H-1'), 3.50 (q, 3H, $^5J_{\text{Me,F}}$ = 1.3 Hz, OMe) ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 16.06 (s) ppm.

^{19}F -NMR (282 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = -74.43$ (s) ppm.

(*R*)-[(Bis(allyloxyphosphoryl)](4-nitrophenyl)methyl (*2S*)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropanoat ((*R,S*)-17-*p*)



In einem ausgeheizten NMR-Röhrchen wurde das α -Hydroxymethylphosphonat (***R***)-**14-*p*** (19.3 mg, 0.062 mmol) in 450 μL CHCl_3-d_1 und 270 μL Pyridin gelöst und (*R*)-MTPA-Cl (17.3 μL , 0.092 mmol, 1.5 \AA q.) zugegeben. Der Inhalt wurde durchmischt, für 50 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann ^{31}P -NMR-Spektren aufgenommen. Es wurde DCM zugegeben, die Lösung mit 2 x 15 mL HCl (0.5 M) und 20 mL Brine gewaschen und nach Trocknen über Na_2SO_4 wurde der Mosher-Ester (***R,S***)-**17-*p*** per MPLC (Kieselgel 0.040–0.063, Hex/EE 50:50) gereinigt und nach Trocknen im Feinvakuum als blaß gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 11.9 mg, 0.062 mmol (36 %), $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{NO}_8\text{P}$, 529.40 g/mol

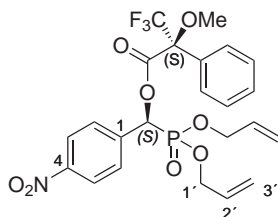
$R_f = 0.37$ (EE/Hex 50:50)

^1H -NMR (300 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = 8.16$ (d, 2H, $^3J_{3/5,2/6} = 8.7$ Hz, H-3/H-5), 7.55–7.33 (m, 7H, H-2/H-6, Ph), 6.39 (d, 1H, $^2J_{\text{CHOH,P}} = 14.4$ Hz, CHO), 5.89–5.72 (m, 2H, H-2'), 5.32–5.18 (m, 2H, H-3' trans, H-3' cis), 4.64–4.37 (m, 4H, H-1'), 3.62 (bs, 3H, OMe) ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = 16.24$ (s) ppm.

^{19}F -NMR (282 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = -74.57$ (s) ppm.

(*S*)-[(Bis(allyloxyphosphoryl)](4-nitrophenyl)methyl (*2S*)-3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropanoat ((*S,S*)-17-*p*)



In einem ausgeheizten NMR-Röhrchen wurde das α -Hydroxymethylphosphonat (**S**)-**14-p** (14.7 mg, 0.047 mmol) in 450 μ L CHCl_3-d_1 und 270 μ L Pyridin gelöst und (*R*)-MTPA-Cl (28.2 μ l, 0.151 mmol, 3.2 Äq.) zugegeben. Der Inhalt wurde durchmischt, für 4 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann ^{31}P -NMR-Spektren aufgenommen. Das Lösungsmittel wurde i.V. entfernt, in 5 mL Hex/EE 60:40 und etwas Toluol aufgenommen und direkt per MPLC (Büchi 150 x 12 mm Kartusche, Kieselgel 0.040–0.063, Hex/EE 60:40) gereinigt. Der Mosher-Ester (**S,S**)-**17-p** wurde nach Trocknen im Feinvakuum als blaß gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 7.05 mg, 0.062 mmol (28 %), $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{NO}_8\text{P}$, 529.40 g/mol

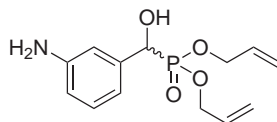
$R_f = 0.45$ (EE/Hex 50:50)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = 8.24$ (d, 2H, $^3J_{3/5,2/6} = 8.6$ Hz, H-3/H-5), 7.62 (dd, 2H, $^3J_{2/6,3/5} = 8.8$ Hz, $^3J_{2/6,6/2} = 2.0$ Hz, H-2/H-6), 7.55–7.35 (m, 5H, Ph), 6.43 (d, 1H, $^2J_{\text{CHOH,P}} = 14.2$ Hz, CHO), 8.55–5.68 (m, 2H, H-2'), 5.33–5.15 (m, 2H, H-3'trans, H-3'cis), 4.57–4.18 (m, 4H, H-1'), 3.50 (bs, 3H, OMe) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = 15.89$ (s) ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (282 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = -74.50$ (s) ppm.

(*R/S*)-Diallyl-(hydroxy-(3-nitrophenyl)methyl)phosphonat (**15-m**)



Die Reaktion des α -Hydroxymethylphosphonats **14-m** (150.0 mg, 0.479 mmol) mit $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (977.7 mg, 4.33 mmol, 9.0 Äq.) für 25.5 h gemäß der AAV4b ergab 98.0 mg (0.346 mmol) des Anilins **16-m** als farbloses Öl.

Rohausbeute: 75.4 mg, 0.266 mmol, 56 %, $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{P}$, 283.26 g/mol

$R_f = 0.39$ (DCM/MeOH 95:5)

ESI-LC/MS: $m/z = 284.0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

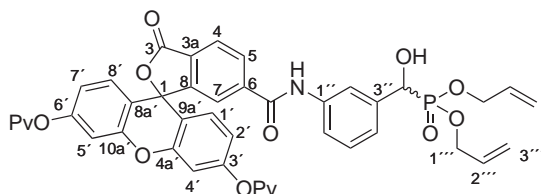
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = 7.08$ (dd, 1H, $^3J_{5,4} = 7.7$ Hz, $^3J_{5,6} = 7.7$ Hz, H-5), 6.82 (bs, 1H, H-2), 6.81 (bd, 1H, $^3J_{6,5} = 8.3$ Hz, H-6), 6.59 (bd, 1H, $^3J_{4,5} = 7.7$ Hz, H-4), 5.93–5.73 (m 2H, All-CH), 5.28 + 5.22 (2 bd, 2H, $^3J_{\text{trans},2'} = 15.3$ Hz und 16.2 Hz, All-trans), 5.18 + 5.15 (2 bd, 2H, $^3J_{\text{cis},2'} = 10.2$ Hz und 9.5 Hz, All-cis), 4.92 (d, $^1J_{\text{CHP,P}} = 11.6$ Hz, CHP), 4.51–4.28 (All- CH_2 -) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (76 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = 146.4$ (d, $^4J_{\text{C,P}} = 2.4$ Hz, C-3), 137.6 (d,

$^2J_{C,P} = 1.5$ Hz, C-1), 132.9 + 132.8 (2 d, $2 \times ^3J_{C,P} = 4.2$ Hz, All-CH), 129.0 (d, $^4J_{C,P} = 2.3$ Hz, C-5), 117.7 (d, $^4J_{C,P} = 3.0$ Hz, All=CH₂), 117.4 (d, $^3J_{C,P} = 6.3$ Hz, C-6), 115.0 (d, $^5J_{C,P} = 3.1$ Hz, C-4), 114.0 (d, $^3J_{C,P} = 5.8$ Hz, C-2), 70.8 (d, $^1J_{CHOH,P} = 160.4$ Hz, CHO), 673 + 67.2 (2 d, $2 \times ^2J_{1',P} = 4.5$ Hz, All-CH-) ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, CHCl₃-*d*₁): $\delta = 23.50$ (s) ppm.

(*R/S*)-Diallyl-(3-(di-*O*-pivaloylfluoresceinyl-5-carboxamido)phenyl)(hydroxy)methylphosphonat (16-*m***)**



Zu dem Rohprodukt der Reduktion von **14-*m*** zu **14-*p*** (0.80 mmol) in 6 mL DCM wurden 6-Carboxy-di-*O*-pivaloylfluorescein (**2-(6)**) (430 mg, 0.80 mmol, 1 Äq.) sowie EDC-HCl (227 mg, 1.18 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben und für 2.5 h gerührt. Nach chromatographischer Reinigung (Kieselgel 0.040–0.063, DCM/MeOH 90:10) wurde das Produkt **16-*m*** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 398 mg, 0.49 mmol (62 %), C₄₄H₄₄NO₁₂P, 809.79 g/mol

$R_f = 0.31$ (DCM/MeOH 95:5)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 832.2493, gef.: 832.2507; $\Delta = 1.68$ ppm

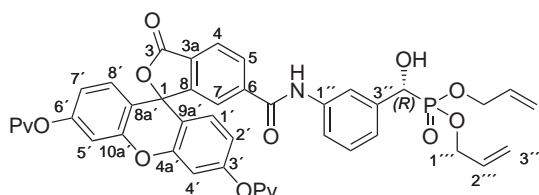
^1H -NMR (300 MHz, CHCl₃-*d*₁): $\delta = 9.10$ (s, 1H, NH), 8.13 (dd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.0$ Hz, $^4J_{5,7} = 1.0$ Hz, H-5), 7.99 (d, 1H, $^3J_{4,5} = 8.0$ Hz, H-4), 7.85 (bs, 1H, H-7), 7.66 (bs, 1H, H-2''), 7.35 (m, 1H, H-5''), 7.13 (bd, 2H, $^3J_{6'',5''} = 5.2$ Hz, H-4'', H-6''), 7.00 + 6.99 (2 d, $2 \times ^4J_{4'/5':2'/7'} = 2.2$ Hz, H-4'/H-5'), 6.88 + 6.83 (2 d, 2H, $2 \times ^3J_{1'/8':2'/7'} = 8.6$ Hz, H-1'/H-8'), 6.75 (dd, 2H, $^3J_{2'/7':1'/8'} = 8.7$ Hz, $^4J_{2'/7':4'/5'}$, H-2'/H-7'), 5.84–5.69 (m, 2H, All-CH-), 5.19 (bd, 2H, $^3J_{\text{trans},2'''} = 17.1$ Hz, All-trans), 5.12 + 5.11 (2 bd, 2H, $2 \times ^3J_{\text{cis},2'''} = 10.4$ Hz, All-cis), 4.69 (d, 1H, $^2J_{\text{CHOH,P}} = 13.3$ Hz, CHOH), 4.51–4.17 (m, 4H, All-CH₂-), 1.35 + 1.34 (2 s, 18H, Pv) ppm.

^{13}C -NMR (76 MHz, CHCl₃-*d*₁): $\delta = 176.79 + 176.7$ (Pv-Carbonyl), 168.0 (C-3), 163.4 (Amid-Carbonyl), 152.6 + 152.6 (C-3'/C-6'), 152.5 (C-8), 151.6 + 151.5 (C-4a'/C-10a'), 141.0 (C-6), 137.7 (d, $^4J_{1'',P} = 2.7$ Hz, C-1''), 137.1 (d, $^2J_{3'',P} = 1.7$ Hz, C-3''), 132.6 + 132.5 (2 d, $2 \times ^3J_{2'',P} = 4.2$ Hz, All-CH-), 130.2 (C-5), 129.0 + 128.9 (C-1'/C-8'), 128.7 (C-3a), 128.5 (d, $^4J_{5'',P} = 2.3$ Hz, C-5''), 125.4 (C-4), 123.2 (d, $^3J_{4'',P} = 5.9$ Hz, C-4''), 122.7 (C-7), 120.5 (d, $^5J_{6'',P} = 3.0$ Hz, C-6''), 119.6 (d, $^3J_{2'',P} =$

5.6 Hz, C-2''), 117.9 (C-2'/C-7'), 117.9 (C-All=CH₂), 115.9 + 115.8 (C-8a'/C-9a'), 110.4 (C-4'/C-5'), 82.0 (C-1), 70.4 (d, ¹J_{C_{HOH},P} = 161.4 Hz, C_{HOH}), 67.6 + 67.3 (2 d, 2 x ²J_{1'',P} = 7.1 Hz, 1''), 39.2 (Pv-C(CH₃)₃), 26.8 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 22.40 (s) ppm.

(R)-Diallyl-(3-(di-O-pivaloylfluoresceinyl-5-carboxamido)phenyl)(hydroxy)methylphosphonat ((R)-16-m)



Die Reaktion des α-Hydroxymethylphosphonats (**R**)-**14-m** (203.2 mg, 0.649 mmol) mit SnCl₂·H₂O (583.1 mg, 2.582 mmol, 4.0 Äq.) für 52 h und mit 6-Carboxy-di-O-pivaloylfluorescein (**2-(6)**) (353.2 mg, 0.649 mmol, 1 Äq.) sowie EDC-HCl (186.5 mg, 0.973 mmol, 1.5 Äq.) für 21 h gemäß der AAV4a ergab nach MPLC-Reinigung (Kieselgel 0.040–0.063, DCM/MeOH-Gradient: [B] = 1–10%) und Lyophilisation aus Dioxan (**R**)-**16-m** als blass gelbes Pulver.

Ausbeute: 304.2 mg, 0.0376 mmol (58%), C₄₄H₄₄NO₁₂P, 809.79 g/mol

*R*_f = 0.27 (DCM/MeOH 95:5)

HRMS (ESI-TOF): *m/z*[M+H]⁺ ber.: 810.2674, gef.: 810.2690; Δ = 1.97 ppm

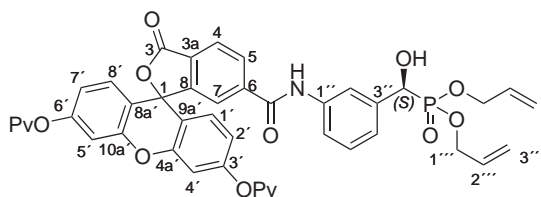
¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 9.30 (s, 1H, NH), 8.13 (dd, 1H, ³J_{5,4} = 8.0 Hz, ⁴J_{5,7} = 0.9 Hz, H-5), 7.98 (d, 1H, ³J_{4,5} = 8.0 Hz, H-4), 7.90 (s, 1H, H-7), 7.66 (bs, 1H, H-2''), 7.34 (d, 1H, ³J_{6'',5''} = 8.2 Hz, H-6''), 7.13–7.05 (m, 2H, H-4'', H-5''), 6.99 (bd, ⁴J_{4'/5',2'/7'} = 2.2 Hz, H-4'/H-5'), 6.90 + 6.81 (2 d, 2H, 2 x ³J_{1'/8',2'/7'} = 8.6 Hz, H-1'/H-8'), 6.75 (bd, 2H, ³J_{2'/7',1'/8'} = 8.8 Hz, H-2'/H-7'), 5.84–5.69 (m, 2H, H-2'''), 5.18 (bd, 2H, ³J_{3'''trans,2'''} = 17.1 Hz, H-3'''trans), 5.11 (bd, 2H, ³J_{3'cis,2'} = 9.1 Hz, H-3'cis), 4.69 (d, 1H, ²J_{C_{HOH},P} = 11.5 Hz, C_{HOH}), 4.41–4.20 (m, 4H, H-1''), 1.35 + 1.34 (2 s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 176.7 + 176.4 (Pv-Carbonyl), 167.9 (C-3), 163.3 (Amid-Carbonyl), 152.5 + 152.4 (C-3'/C-6'), 152.1 (C-8), 151.5 + 151.4 (C-4a'/C-10a'), 140.8 (C-6), 137.5 (d, ⁴J_{1'',P} = 2.6 Hz, C-1''), 137.1 (d, ²J_{3'',P} = 1.2 Hz, C-3''), 132.5 (d, ³J_{2'',P} = 5.9 Hz, C-2''), 130.0 (C-5), 128.9 + 128.6 (C-1'/C-8'), 128.5 (C-3a), 128.3 (C-5''), 125.1 (C-4), 123.0 (d, ³J_{4'',P} = 3.9 Hz, C-4''), 122.7 (C-7),

120.4 (C-6''), 119.6 (d, $^3J_{2'',P} = 5.8$ Hz, C-2''), 117.7 (d, $^4J_{3''',P} = 7.7$ Hz, C-3'''), 117.7 (C-2'/C-7'), 115.8 + 115.7 (C-8a'/C-9a'), 110.3 (C-4'/C-5'), 81.9 (C-1), 70.2 (d, $^1J_{\text{CHOH},P} = 162.0$ Hz, $\underline{\text{CHOH}}$), 67.4 + 67.1 (2 d, $2 \times ^2J_{1''',P} = 7.1$ Hz, 1'''), 39.0 (Pv-C(CH₃)₃), 26.8 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 22.42$ (s) ppm.

(S)-Diallyl-(3-(di-O-pivaloylfluoresceinyl-5-carboxamido)phenyl)(hydroxy)methylphosphonat ((S)-16-m)



Die Reaktion des α -Hydroxymethylphosphonats (**S**)-14-m (220.0 mg, 0.638 mmol) mit SnCl₂·H₂O (576.8 mg, 2.55 mmol, 4.0 Äq.) für 48 h und mit 6-Carboxy-di-O-pivaloylfluorescein (**2**-(**6**)) (347.4 mg, 0.638 mmol, 1 Äq.) sowie EDC-HCl (183.8 mg, 0.959 mmol, 1.5 Äq.) für 18 h gemäß der AAV4a ergab nach MPLC-Reinigung (Kieselgel 0.040–0.063, DCM/MeOH-Gradient: [B] = 1–10 %) und Lyophilisation aus Dioxan (**S**)-16-m als blass gelbes Pulver.

Ausbeute: 290.8 mg, 0.359 mmol (56 %), C₄₄H₄₄NO₁₂P, 809.79 g/mol

$R_f = 0.47$ (DCM/MeOH 90:10)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 810.2674, gef.: 810.2676; $\Delta = 0.25$ ppm

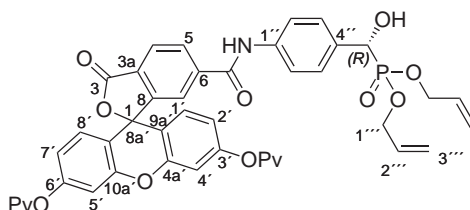
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHCl₃-d₁): 9.33 (s, 1H, NH), 8.13 (bd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.6$ Hz, H-5), 7.97 (d, 1H, $^3J_{4,5} = 8.0$ Hz, H-4), 7.89 (bs, 1H, H-7), 7.66 (bs, 1H, H-2''), 7.34 (bd, 1H, $^3J_{6'',5''} = 6.6$ Hz, H-6''), 7.14–7.05 (m, 2H, H-4'', H-5''), 6.99 (bd, $^4J_{4'/5',2'/7'} = 2.1$ Hz, H-4'/H-5'), 6.89 + 6.81 (2 d, 2H, $2 \times ^3J_{1'/8',2'/7'} = 8.6$ Hz, H-1'/H-8'), 6.75 (bd, 2H, $^3J_{2'/7',1'/8'} = 9.6$ Hz, H-2'/H-7'), 5.82–5.69 (m, 2H, H-2'''), 5.18 (bd, 2H, $^3J_{3'''trans,2'''} = 17.1$ Hz, H-3'''trans), 5.10 (bd, 2H, $^3J_{3'cis,2'} = 10.1$ Hz, H-3'''cis), 4.70 (d, 1H, $^2J_{\text{CHOH},P} = 13.4$ Hz, $\underline{\text{CHOH}}$), 4.40–4.19 (m, 4H, H-1'''), 1.35 + 1.34 (2 s, 18H, Pv) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (76 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 176.7 + 176.4$ (Pv-Carbonyl), 167.9 (C-3), 163.3 (Amid-Carbonyl), 152.5 + 152.4 (C-3'/C-6'), 152.1 (C-8), 151.4 + 151.3 (C-4a'/C-10a'), 140.8 (C-6), 137.5 (d, $^4J_{1'',P} = 2.6$ Hz, C-1''), 137.1 (d, $^2J_{3'',P} = 1.2$ Hz, C-3''), 132.5 (d, $^3J_{2''',P} = 5.9$ Hz, C-2'''), 130.0 (C-5), 128.8 + 128.6 (C-1'/C-8'),

128.4 (C-3a), 128.2 (C-5''), 125.1 (C-4), 123.0 (d, $^3J_{4'',P} = 3.9$ Hz, C-4''), 122.7 (C-7), 120.3 (C-6''), 119.5 (d, $^3J_{2'',P} = 5.8$ Hz, C-2''), 117.7 (C-2'/C-7'), 117.6 (d, $^4J_{3''',P} = 7.7$ Hz, C-3'''), 115.8 + 115.6 (C-8a'/C-9a'), 110.2 (C-4'/C-5'), 81.9 (C-1), 70.1 (d, $^1J_{\text{CHOH},P} = 162.0$ Hz, $\underline{\text{CHOH}}$), 67.3 + 67.1 (2 d, $2 \times ^2J_{1''',P} = 7.1$ Hz, 1'''), 38.9 (Pv-C(CH₃)₃), 26.8 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 22.45$ (s) ppm.

(R)-Diallyl-(4-(di-O-pivaloylfluoresceinyl-5-carboxamido)phenyl)(hydroxy)methylphosphonat ((S)-16-p)



Die Reaktion des α -Hydroxymethylphosphonats (**R**)-14-p (122.6 mg, 0.391 mmol) mit SnCl₂·H₂O (795.6 mg, 3.523 mmol, 9.0 Äq.) für 22 h gemäß der AAV4b ergab 98.0 mg (0.346 mmol) des Anilins (**R**)-15-p. Die Kupplungsreaktion mit 6-Carboxy-di-O-pivaloylfluorescein (**2**-(**6**)) (188.4 mg, 0.346 mmol, 1 Äq.) sowie EDC-HCl (73.0 mg, 0.381 mmol, 1.1 Äq.) für 17 h gemäß der AAV4b ergab nach MPLC-Reinigung (Kieselgel 0.040–0.063, DCM/MeOH-Gradient: [B] = 1–10%) und Lyophilisation aus Dioxan (**R**)-16-p als fast farbloses, leicht gelbliches Pulver.

Ausbeute: 108.7 mg, 0.134 mmol (26%), C₄₄H₄₄NO₁₂P, 809.79 g/mol

$R_f = 0.13$ (DCM/MeOH 95:5)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M-H]⁻ ber.: 808.2528, gef.: 808.2567; $\Delta = 1.85$ ppm

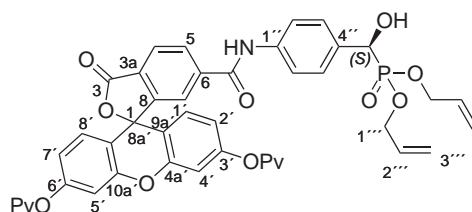
^1H -NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 8.98$ (bs, 1H, NH), 8.21 (bd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.2$ Hz, H-5), 8.03 (bd, 1H, $^3J_{4,5} = 8.0$ Hz, H-4), 7.73 (bs, 1H, H-7), 7.45 (bd, 2H, $^3J_{2''/6'',3''/5''} = 8.4$ Hz, H-2''/H-6''), 7.34 (bd, 2H, $^3J_{3''/5'',2''/6''} = 7.0$ Hz, m, 2H, H-3''/H-5''), 6.99 + 6.97 (2 bd, 2H, $2 \times ^4J_{4'/5',2'/7'} = 1.9$ Hz, H-4'/H-5'), 6.76 (d, 2H, $^3J_{1'/8',2'/7'} = 6.8$ Hz, H-1'/H-8'), 6.70 + 6.71 (2 dd, 2H, $2 \times ^3J_{2'/7',1'/8'} = 8.7$ Hz, $2 \times ^4J_{2'/7',4'/5'} = 1.8$ Hz, H-2'/H-7'), 5.89–5.72 (m, 2H, H-2'''), 5.28–5.12 (m, 2H, H-3''''cis, H-3''''trans), 4.86 (d, 2H, $^2J_{\text{CHOH},P} = 11.6$ Hz, $\underline{\text{CHOH}}$), 4.46–4.24 (m, 4H, H-1'''), 1.35 (s, 18H, Pv) ppm.

^{13}C -NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 176.8 + 176.7$ (Pv-Carbonyl), 168.0 (C-3), 163.6 (Amid-Carbonyl), 152.9 (C-8), 152.6 + 152.6 (C-3'/C-6'), 151.4 + 151.3 (C-4a'/C-

10a'), 141.2 (C-6), 137.6 (d, $^5J_{1'',P} = 3.8$ Hz, C-1''), 132.6 (C-4''), 132.6 + 132.5 (2 d, $2 \times ^3J_{2''',P} = 5.9$ Hz, C-2'''), 132.4 (d, $^2J_{4'',P} = 2.1$ Hz, C-4''), 130.1 (C-5), 128.8 (C-1'/C-8'), 128.5 (C-3a), 127.6 (d, $^4J_{3''/5'',P} = 6.1$ Hz, H-3''/H-5''), 125.5 (C-4), 122.6 (C-7), 120.5 (C-2'''/C-6'''), 118.1 (d, $^4J_{3''',P} = 2.6$ Hz, C-3'''), 117.9 + 117.8 (C-2'/C-7'), 115.6 + 115.5 (C-8a'/C-9a'), 110.5 (C-4'/C-5'), 81.9 (C-1), 70.4 (d, $^1J_{\underline{C}HOH,P} = 161.8$ Hz, $\underline{C}HOH$), 67.5 + 67.3 (2 d, $2 \times ^2J_{1''',P} = 7.1$ Hz, 1'''), 39.2 (Pv-C(CH₃)₃), 27.0 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 22.56$ (s) ppm.

(S)-Diallyl-(4-(di-O-pivaloylfluoresceinyl-5-carboxamido)phenyl)(hydroxy)methylphosphonat ((S)-16-p)



Die Reaktion des α -Hydroxymethylphosphonats (**S**)-14-p (115.6 mg, 0.369 mmol) mit SnCl₂·H₂O (750.2 mg, 3.321 mmol, 9.0 Äq.) für 22 h gemäß der AAV4b ergab 61.3 mg (0.216 mmol) des Anilins (**S**)-15-p. Die Kupplungsreaktion mit 6-Carboxy-di-O-pivaloylfluorescein (**2**-(6)) (117.8 mg, 0.216 mmol, 1 Äq.) sowie EDC-HCl (45.6 mg, 0.216 mmol, 1.1 Äq.) für 17 h gemäß der AAV4b ergab nach MPLC-Reinigung (Kieselgel 0.040–0.063, DCM/MeOH-Gradient: [B] = 1–5 %) und Lyophilisation aus Dioxan (**R**)-16-p als fast farbloses, leicht gelbliches Pulver.

Ausbeute: 66.9 mg, 0.083 mmol (22 %), C₄₄H₄₄NO₁₂P, 809.79 g/mol

$R_f = 0.13$ (DCM/MeOH 95:5)

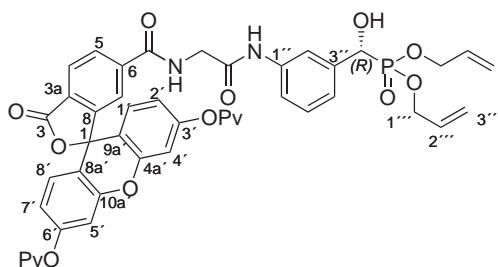
HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 810.2674, gef.: 810.2659; $\Delta = 1.85$ ppm

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 8.99$ (bs, 1H, NH), 8.21 (bd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.2$ Hz, H-5), 8.03 (bd, 1H, $^3J_{4,5} = 8.0$ Hz, H-4), 7.73 (bs, 1H, H-7), 7.45 (bd, 2H, $^3J_{2''/6'',3''/5''} = 8.4$ Hz, H-2''/H-6''), 7.28 (bd, 2H, $^3J_{3''/5'',2''/6''} = 6.9$ Hz, m, 2H, H-3''/H-5''), 6.99 + 6.97 (2 bd, 2H, $2 \times ^4J_{4'/5',2'/7'} = 1.9$ Hz, H-4'/H-5'), 6.76 (d, 2H, $^3J_{1'/8',2'/7'} = 6.8$ Hz, H-1'/H-8'), 6.70 + 6.70 (2 dd, 2H, $2 \times ^3J_{2'/7',1'/8'} = 8.7$ Hz, $2 \times ^4J_{2'/7',4'/5'} = 1.8$ Hz, H-2'/H-7'), 5.89–5.72 (m, 2H, H-2'''), 5.28–5.12 (m, 2H, H-3''') cis, H-3''') trans), 4.86 (d, 2H, $^2J_{\underline{C}HOH,P} = 11.6$ Hz, $\underline{C}HOH$), 4.46–4.24 (m, 4H, H-1'''), 1.35 (s, 18H, Pv) ppm.

^{13}C -NMR (76 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 176.8 + 176.7$ (Pv-Carbonyl), 168.0 (C-3), 163.6 (Amid-Carbonyl), 152.9 (C-8), 152.6 + 152.6 (C-3'/C-6'), 151.4 + 151.3 (C-4a'/C-10a'), 141.2 (C-6), 137.6 (d, $^5J_{1'',\text{P}} = 3.8$ Hz, C-1''), 132.6 (C-4''), 132.6 + 132.5 (2 d, $2 \times ^3J_{2''',\text{P}} = 5.9$ Hz, C-2'''), 132.4 (d, $^2J_{4'',\text{P}} = 2.1$ Hz, C-4''), 130.1 (C-5), 128.8 (C-1'/C-8'), 128.5 (C-3a), 127.6 (d, $^4J_{3''/5'',\text{P}} = 6.1$ Hz, H-3''/H-5''), 125.5 (C-4), 122.6 (C-7), 120.5 (C-2''/C-6''), 118.1 (d, $^4J_{3''',\text{P}} = 2.6$ Hz, C-3'''), 117.9 + 117.8 (C-2'/C-7'), 115.6 + 115.5 (C-8a'/C-9a'), 110.5 (C-4'/C-5'), 81.9 (C-1), 70.4 (d, $^1J_{\text{CHOH,P}} = 161.8$ Hz, $\underline{\text{CHOH}}$), 67.5 + 67.3 (2 d, $2 \times ^2J_{1'',\text{P}} = 7.1$ Hz, 1''), 39.2 (Pv-C(CH₃)₃), 27.0 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 22.57$ (s) ppm.

(*R*)-Diallyl-(3-(2-(di-*O*-pivaloylfluoresceinyl-6-carboxamido)acetamido)phenyl)-(hydroxy)methylphosphonat ((*R*)-16-*m*-G)



Die Reaktion des α -Hydroxymethylphosphonats (***R***)-14-*m*-G (112.4 mg, 0.359 mmol) mit $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (322.6 mg, 1.428 mmol, 4.0 Äq.) für 3 Tage und mit 6-Di-*O*-pivaloylfluoresceinamidoessigsäure (**2-G-(6)**) (209.1 mg, 0.348 mmol, 1 Äq.) sowie EDC-HCl (103.2 mg, 0.538 mmol, 1.5 Äq.) für 4 h gemäß der AAV4a ergab nach MPLC-Reinigung (Kieselgel 0.040–0.063, DCM/MeOH-Gradient: [B] = 1–15 %) und Lyophilisation aus Dioxan (***R***)-16-*m*-G als farbloses Pulver.

Ausbeute: 188.0 mg, 0.217 mmol (60 %), $\text{C}_{46}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}$, 866.84 g/mol

$R_f = 0.43$ (DCM/MeOH 90:10)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 867.2889, gef.: 867.2938; $\Delta = 5.65$ ppm

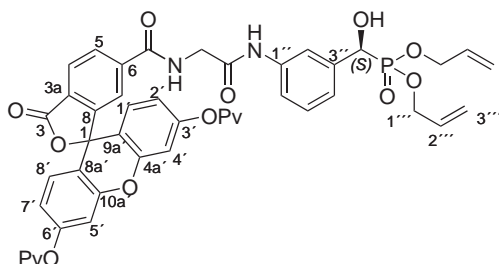
^1H -NMR (300 MHz, CHCl_3 - d_1): $\delta = 9.13$ (s, 1H, Aryl-NH), 8.33 (bs, 1H, Glycin-NH), 7.99 (bd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.0$ Hz, H-5), 7.93 (d, 1H, $^3J_{4,5} = 8.0$ Hz, H-4), 7.71 (bs, 1H, H-7), 7.48 (bs, 1H, H-2''), 7.37–7.25 (m, 1H, H-6''), 7.14–7.02 (m, 2H, H-4'', H-5''), 6.95 (bd, $^4J_{4'/5';2'/7'} = 4.6$ Hz, H-4'/H-5'), 6.83–6.75 (m, 4H, H-1'/H-8', H-2'/H-7'), 5.87–5.68 (m, 2H, H-2'''), 5.22 + 5.19 (2 bd, 2H, $2 \times ^3J_{3'''trans,2'''} = 17.1$ Hz, H-3'''trans), 5.11 + 5.10 (2 bd, 2H, $2 \times ^3J_{3'cis,2'} = 10.2$ Hz, H-3'''cis), 4.90 (d, 1H,

$^2J_{\text{CHOH,P}} = 12.6 \text{ Hz}$, CHOH), 4.48–4.25 (m, 4H, H-1'''), 4.01 (bs, 2H, Glycin-CH₂), 1.35 (bs, 18H, Pv) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (76 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = 176.8 + 176.7$ (Pv-Carbonyl), 168.1 (C-3), 167.5 ($\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})$), 165.7 (Amid-Carbonyl), 152.5 + 152.4 (C-3'/C-6'), 152.4 (C-8), 151.4 (C-4a'/C-10a'), 140.0 (C-6), 137.7 (d, $^2J_{3'',\text{P}} = 3.0 \text{ Hz}$, C-3''), 137.2 (d, $^4J_{1'',\text{P}} = 1.5 \text{ Hz}$, C-1''), 132.6 + 132.4 (d, $^3J_{2''',\text{P}} = 5.8 \text{ Hz}$, C-2'''), 129.7 (C-5), 129.0 (C-1'/C-8'), 128.5 (C-5'', C-3a), 125.1 (C-4), 122.9 (C-7), 122.8 (C-4''), 119.5 (C-6''), 118.3 (d, $^3J_{2'',\text{P}} = 5.8 \text{ Hz}$, C-2''), 117.9 (d, $^4J_{3''',\text{P}} = 1.3 \text{ Hz}$, C-3'''), 117.8 (C-2'/C-7'), 115.6 + 115.6 (C-8a'/C-9a'), 110.3 (C-4', C-5'), 82.0 (C-1), 70.3 (d, $^1J_{\text{CHOH,P}} = 162.8 \text{ Hz}$, CHOH), 67.5 + 67.2 (2 d, $2 \times ^2J_{1''',\text{P}} = 7.1 \text{ Hz}$, 1'''), 43.8 (Glycin-CH₂), 39.0 (Pv-C(CH₃)₃), 26.9 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = 22.79$ (s) ppm.

(S)-Diallyl-(3-(2-(di-O-pivaloylfluoresceinyl-6-carboxamido)acetamido)phenyl)-(hydroxy)methylphosphonat (S)-16-m-G



Die Reaktion des α -Hydroxymethylphosphonats (**S**)-14-m-G (117.9 mg, 0.376 mmol) mit $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (341.3 mg, 1.511 mmol, 4.0 Äq.) für 3 Tage und mit 6-Di-O-pivaloylfluoresceinamidoessigsäure (**2-G-(6)**) (226.2 mg, 0.376 mmol, 1 Äq.) sowie EDC-HCl (108.1 mg, 0.564 mmol, 1.5 Äq.) für 2 h gemäß der AAV3a ergab nach MPLC-Reinigung (Kieselgel 0.040–0.063, DCM/MeOH-Gradient: [B] = 1–15 %) und Lyophilisation aus Dioxan (**S**)-16-m-G als farbloses Pulver.

Ausbeute: 111.9 mg, 0.129 mmol (34 %), $\text{C}_{46}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}$, 866.84 g/mol

$R_f = 0.50$ (DCM/MeOH 90:10)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 867.2889, gef.: 867.2920; $\Delta = 3.57$ ppm

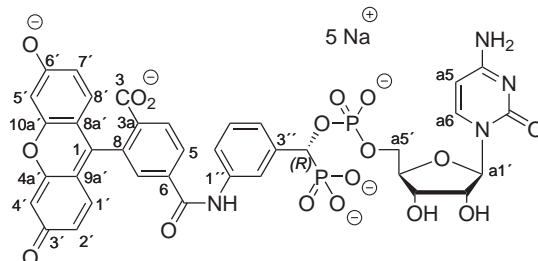
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = 9.12$ (s, 1H, Aryl-NH), 8.28 (bs, 1H, Glycin-NH), 7.99 (bd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.0 \text{ Hz}$, H-5), 7.94 (d, 1H, $^3J_{4,5} = 8.0 \text{ Hz}$, H-4), 7.70 (bs, 1H, H-7), 7.48 (bs, 1H, H-2''), 7.34 (bd, 1H, $^3J_{6,5} = 6.9 \text{ Hz}$, H-6''), 7.13–7.03 (m, 2H, H-4'', H-5''), 6.95 (bd, $^4J_{4'/5';2'/7'} = 4.6 \text{ Hz}$, H-4'/H-5'), 6.84–6.74 (m, 4H, H-1'/H-

8', H-2'/H-7'), 5.87–5.68 (m, 2H, H-2'''), 5.22 + 5.19 (2 bd, 2H, $2 \times {}^3J_{3''''trans,2''''} = 17.1$ Hz, H-3''''trans), 5.11 + 5.10 (2 bd, 2H, $2 \times {}^3J_{3''cis,2''} = 10.5$ Hz, H-3''''cis), 4.90 (d, 1H, ${}^2J_{\text{CHOH,P}} = 12.6$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{HOH}$), 4.50–4.23 (m, 4H, H-1'''), 4.02 (bs, 2H, Glycin-CH₂), 1.35 (bs, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 176.9 + 176.8$ (Pv-Carbonyl), 168.1 (C-3), 167.5 (CH₂C(=O)), 165.7 (Amid-Carbonyl), 152.5 (C-3'/C-6', C-8), 151.4 (C-4a'/C-10a'), 140.1 (C-6), 137.8 (d, ${}^2J_{3'',P} = 3.0$ Hz, C-3''), 137.2 (d, ${}^4J_{1'',P} = 1.5$ Hz, C-1''), 132.6 + 132.5 (d, ${}^3J_{2''',P} = 5.8$ Hz, C-2'''), 129.8 (C-5), 129.0 (C-1'/C-8'), 128.6 (C-3a, C-5''), 125.2 (C-4), 123.0 (C-7), 122.9 (C-4''), 119.6 (C-6''), 118.4 (d, ${}^3J_{2'',P} = 5.4$ Hz, C-2''), 117.9 (d, ${}^4J_{3''',P} = 0.7$ Hz, C-3'''), 117.9 + 117.8 (C-2'/C-7'), 115.6 + 115.6 (C-8a'/C-9a'), 110.3 (C-4', C-5'), 82.1 (C-1), 70.3 (d, ${}^1J_{\text{CHOH,P}} = 161.1$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{HOH}$), 67.6 + 67.3 (2 d, $2 \times {}^2J_{1''',P} = 7.1$ Hz, 1'''), 43.9 (Glycin-CH₂), 39.1 (Pv-C(CH₃)₃), 26.9 (Pv-C(CH₃)₃) ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 22.74$ (s) ppm.

Pentatrium Cytidin-5'-yl-[(*R*)-(3-(fluoresceinyl-6-carboxamido)phenyl)-phosphonomethyl]-phosphat (*R*)-8-*m*-(6)



Die Umsetzung des α -Hydroxymethylphosphonats (***R***)-16-*m* (180.6 mg, 0.223 mmol) und **1** (178.5 mg, 0.313 mmol, 1.4 Äq.) mit 1*H*-Tetrazol (31.2 mg, 0.446 mmol, 2 Äq.) für 4.5 h und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 81.1 μ l, 0.446 mmol, 2.0 Äq.) für 1 h gemäß der AAV1 (MPLC: Büchi 75 x 12 mm Kartusche, Kieselgel 0.040–0.063, EE/MeOH-Gradient: [B] = 1–15 %) ergab das geschützte Kupplungsprodukt als blass gelben Feststoff (246.5 mg, 0.191 mmol). Davon wurden entsprechend der AAV5 151.9 mg (0.117 mmol) in 4 mL MeOH mit Pd(PPh₃)₄ (13.1 mg, 0.011 mmol, 0.10 Äq.) und K₂CO₃ (98.1 mg, 0.710 mmol, 6 Äq.) für 4 h entschützt. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule B, 0.05 M TEAB-Puffer/ACN, Gradient: [B] = 4–30 % in 30 min, Fluss 60 ml/min, $t_R = 14.5$ min) ergab (***R***)-8-*m*-(6) als intensiv orange gefärbtes Lyophilisat.

Ausbeute: 71.1 mg, 0.0739 mmol (54 %), $de = 83\%$, $C_{37}H_{27}N_4Na_5O_{17}P_2$, 976.52 g/mol

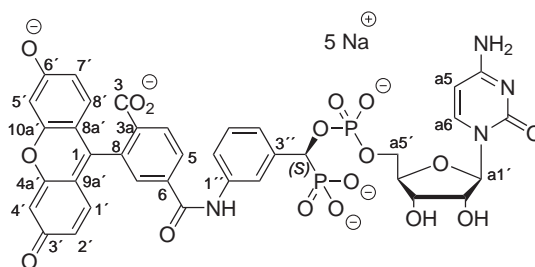
HRMS (ESI-TOF): m/z $[M-5Na+4H]^-$ ber.: 865.1165, gef.: 865.1189; $\Delta = 2.77$ ppm

1H -NMR (300 MHz, H_2O-d_2): $\delta = 7.99$ (bd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.3$ Hz, H-5), 7.95 (d, 1H, $^3J_{4,5} = 8.1$ Hz, H-4), 7.67 (bs, 1H, H-7), 7.60 (bs, 1H, H-2''), 7.50 (d, 1H, $^3J_{a6,a5} = 7.1$ Hz, H-a6), 7.37–7.23 (m, 3H, H-4'', H5'', H-6''), 7.06 + 6.95 (2 d, 2H, 2 x $^3J_{1'/8',2'/7'} = 7.6$ Hz, H-1'/H-8'), 6.62–6.50 (m, 4H, H-4'/H-5', H-2'/H-7'), 5.84 (d, 1H, $^3J_{a5,a6} = 7.5$ Hz, H-a5), (bd, 1H, $^3J_{a1',a2'} = 2.5$ Hz, H-a1'), 5.22 (dd, 1H, $^2J_{CHP,PO_3} = 13.7$ Hz, $^3J_{CHP,PO_4} = 10.4$ Hz, CHP), 3.94–3.56 (m, 5H, Ribose außer a1') ppm.

^{13}C -NMR (76 MHz, H_2O-d_2): $\delta = 173.8$ (C-3'/C-6'), 172.9 (C-3), 166.1 (Amid-Carbonyl), 163.8 (C-a4), 157.3 + 157.2 (C-4a'/C-10a'), 154.8 (C-a2), 154.0 (C-1), 141.7 (C-3a), 141.3 (C-a6), 138.4 (C-3''), 136.9 (C-1''), 136.9 + 134.6 (C-6, C-8), 131.1 (C-1'/C-8'), 129.0 (C-4), 128.8 (C-5''), 128.7 (C-5), 128.5 (C-7), 124.7 + 121.0 (C-4'', C-6''), 120.8 + 120.7 (C-2'/C-7'), 120.4 (d, $^3J_{2'',PO_3} = 7.4$ Hz, C-2''), 114.5 (C-8a'/C-9a'), 103.3 (C-4'/C-5'), 95.8 (C-a5), 89.2 (C-a1'), 82.4 (d, $^3J_{a4',PO_4} = 9.2$ Hz, C-a4'), 75.9 (dd, $^1J_{CHP,PO_3} = 156.6$ Hz, $^2J_{CHP,PO_4} = 7.4$ Hz, CHP), 74.2 (C-a2'), 68.7 (C-a3'), 63.7 (C-a5') ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, H_2O-d_2): $\delta = 14.44$ (d, $^3J_{P,P} = 33.3$ Hz, PO_3), 1.52 (d, $^3J_{P,P} = 33.3$ Hz, PO_4) ppm.

Pentatrium Cytidin-5'-yl-[(S)-(3-(fluoresceinyl-6-carboxamido)phenyl)-phosphonomethyl]-phosphat (S)-8-m-(6)



Die Umsetzung des α -Hydroxymethylphosphonats (**(S)-16-m**) (180.8 mg, 0.223 mmol) und **1** (180.5 mg, 0.317 mmol, 1.4 Äq.) mit 1*H*-Tetrazol (31.3 mg, 0.447 mmol, 2 Äq.) für 3.0 h und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 81.2 μ l, 0.447 mmol, 2.0 Äq.) für 1.2 h gemäß der AAV1 (MPLC: Büchi 75 x 12 mm Kartusche, Kieselgel 0.040–0.063, EE/MeOH-Gradient: [B] = 1–15 %) ergab das geschützte Kupplungsprodukt als blass gelben Feststoff (211.0 mg, 0.163 mmol). Davon wurden entsprechend der AAV5 144.5 mg (0.112 mmol) in 4 mL MeOH mit $Pd(PPh_3)_4$ (6.5 mg, 0.056 mmol, 0.05 Äq.) und K_2CO_3

(92.2 mg, 0.667 mmol, 6 Äq.) über Nacht (24 h) entschützt. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule A, H₂O + 0.1 % TFA/ACN + 0.1 % TFA, Gradient: [B] = 5–32 % in 30 min, Fluss 20 ml/min, t_R = 23.2 min) ergab (**S**)-**8-m**-(**6**) als intensiv orange gefärbtes Lyophilisat.

Ausbeute: 84.3 mg, 0.0904 mmol (59 %), de = 84 %, C₃₇H₂₇N₄Na₅O₁₇P₂, 976.52 g/mol

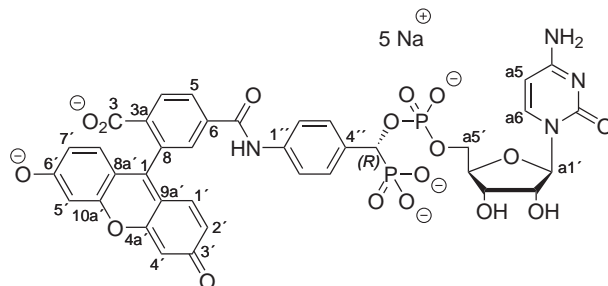
HRMS (ESI-TOF): m/z [M-5Na+4H]⁻ ber.: 865.1165, gef.: 865.1195; Δ = 3.47 ppm

¹H-NMR (300 MHz, H₂O-*d*₂): δ = 8.03 (dd, 1H, $^3J_{5,4}$ = 8.1 Hz, $^4J_{5,7}$ = 1.5 Hz, H-5), 7.90 (bd, 1H, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, H-4), 7.79 (bs, 1H, H-7), 7.61 (d, 1H, $^3J_{a6,a5}$ = 7.6 Hz, H-a6), 7.55 (bs, 1H, H-2'), 7.53–7.33 (m, 3H, H-4'', H5'', H-6''), 7.10 + 7.09 (2 d, 2H, 2 x $^3J_{1'/8',2'/7'}$ = 9.2 Hz, H-1'/H-8'), 6.59 + 6.58 (2 dd, 2H, $^3J_{2'/7',1'/8'}$ = 9.2 Hz, $^4J_{2'/7',4'/5'}$ = 2.1 Hz, H-2'/H-7'), 6.53 + 6.52 (2 d, 2H, $^4J_{4'/5',2'/7'}$ = 2.2 Hz, H-4'/H-5'), 5.96 (d, 1H, $^3J_{a5,a6}$ = 7.5 Hz, H-a5), 5.74 (d, 1H, $^3J_{a1',a2'}$ = 4.4 Hz, H-a1'), 5.09 (dd, 1H, $^2J_{\text{CHP},\text{PO}_3}$ = 13.5 Hz, $^3J_{\text{CHP},\text{PO}_4}$ = 9.5 Hz, CHP), 3.87 (m, 1H, H-a4'), 3.82 (dd, 1H, $^3J_{a2',a3'}$ = 4.9 Hz, $^3J_{a2',a1'}$ = 4.9 Hz, H-a2'), 3.78–3.65 (m, 2H, H-a5'), 3.56 (dd, 1H, $^3J_{a3',a2'}$ = 5.0 Hz, $^3J_{a3',a4'}$ = 5.0 Hz, H-a3') ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, H₂O-*d*₂): δ = 180.6 (C-3'/C-6'), 174.0 (C-3), 167.6 (Amid-Carbonyl), 165.6 (C-a4), 158.5 (C-4a'/C-10a'), 157.3 (C-a2), 157.2 (C-1), 142.8 (C-3a), 141.0 (d, $^2J_{3'',\text{PO}_3}$ = 1.6 Hz, C-3''), 140.9 (C-a6), 136.2 (d, $^4J_{1'',\text{PO}_3}$ = 1.7 Hz, C-1''), 134.4 + 131.6 (C-6, C-8), 131.1 + 131.1 (C-1'/C-8'), 128.8 (C-7), 128.5 (C-5''), 128.4 (C-5), 128.4 (C-4), 125.4 (d, $^3J_{4'',\text{PO}_3}$ = 4.4 Hz, C-4''), 122.9 (C-2'/C-7'), 121.4 (d, $^3J_{2'',\text{PO}_3}$ = 4.4 Hz, C-2''), 121.2 (C-6''), 112.1 (C-8a'/C-9a'), 103.6 (C-4'/C-5'), 96.1 (C-a5), 89.0 (C-a1'), 82.5 (d, $^3J_{a4',\text{PO}_4}$ = 9.2 Hz, C-a4'), 77.4 (dd, $^1J_{\text{CHP},\text{PO}_3}$ = 149.1 Hz, $^2J_{\text{CHP},\text{PO}_4}$ = 9.5 Hz, CHP), 74.0 (C-a2'), 69.1 (C-a3'), 64.2 (d, $^2J_{a5',\text{PO}_4}$ = 5.3 Hz C-a5') ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, H₂O-*d*₂): δ = 13.36 (d, $^3J_{\text{P},\text{P}}$ = 33.5 Hz, PO₃), 1.93 (d, $^3J_{\text{P},\text{P}}$ = 33.7 Hz, PO₄) ppm.

Pentatrium Cytidin-5'-yl-[(*R*)-(4-(fluoresceinyl-6-carboxamido)phenyl)-phosphonomethyl]-phosphat (*R*)-8-*p*-(6)



Die Umsetzung des α -Hydroxymethylphosphonats (***R***)-16-*p* (42.0 mg, 0.052 mmol) und **1** (36.2 mg, 0.063 mmol, 1.2 Äq.) mit 1*H*-Tetrazol (8.0 mg, 0.114 mmol, 2.2 Äq.) für 3.0 h und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 18.5 μ l, 0.101 mmol, 2.0 Äq.) über Nacht (20 h) gemäß der AAV1 (MPLC: Büchi 150 x 12 mm Kartusche, Kieselgel 0.040–0.063, EE/MeOH-Gradient: [B] = 0–30 %) ergab das geschützte Kupplungsprodukt als blass gelben Feststoff (40.2 mg, 0.031 mmol). Davon wurden entsprechend der AAV5 30.4 mg (0.024 mmol) in 2 mL MeOH mit Pd(PPh₃)₄ (4.7 mg, 0.004 mmol, 0.18 Äq.) und K₂CO₃ (20.5 mg, 0.148 mmol, 6 Äq.) über Nacht (20 h) entschützt. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule A, H₂O + 0.1 % TFA/ACN + 0.1 % TFA, Gradient: [B] = 15–40 % in 11 min, Fluss 30 ml/min, t_R = 8.2 min) ergab (***R***)-8-*p*-(6) als intensiv orange gefärbtes Lyophilisat.

Ausbeute: 18.5 mg, 0.0189 mmol (48 %), $de = 71$ %, C₃₇H₂₇N₄Na₅O₁₇P₂, 976.52 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z [M-5Na+4H]⁻ ber.: 865.1165, gef.: 865.1153; $\Delta = 1.39$ ppm

¹H-NMR (300 MHz, H₂O-*d*₂): $\delta = 7.98$ (dd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.1$ Hz, $^4J_{5,7} = 1.5$ Hz, H-5), 7.91 (bd, 1H, $^3J_{4,5} = 7.9$ Hz, H-4), 7.70 (bs, 1H, H-7), 7.51 (d, 2H, $^3J_{2''/6'',3'',5''} = 8.4$ Hz, H-2''/H-6''), 7.44 (d, 2H, $^3J_{3'',5'',2''/6''} = 9.9$ Hz, H-3''/H-5''), 7.43 (d, 1H, $^3J_{a6,a5} = 7.5$ Hz, H-a6), 7.09 + 7.05 (2 d, 2H, $2 \times ^3J_{1'/8',2'/7'} = 7.1$ Hz, H-1'/H-8'), 6.71–6.60 (m, 4H, H-2'/H-7', H-4'/H-5'), 5.90 (d, 1H, $^3J_{a5,a6} = 7.5$ Hz, H-a5), 5.70 (d, 1H, $^3J_{a1',a2'} = 3.9$ Hz, H-a1'), 5.21 (dd, 1H, $^2J_{\text{CHP},\text{PO}_3} = 13.3$ Hz, $^3J_{\text{CHP},\text{PO}_4} = 10.4$ Hz, CHP), 3.96 (m, 1H, H-a4'), 3.89 (dd, 1H, $^3J_{a2',a3'} = 4.7$ Hz, $^3J_{a2',a1'} = 4.7$ Hz, H-a2'), 3.98–3.82 (m, 2H, H-a5'), 3.81 (dd, 1H, $^3J_{a3',a2'} = 5.0$ Hz, $^3J_{a3',a4'} = 5.0$ Hz, H-a3') ppm.

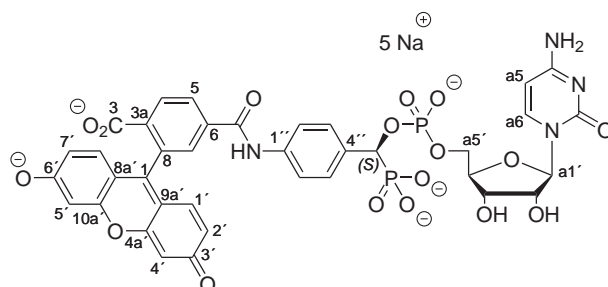
HMQC (¹H: 300 Mhz; ¹³C: 76 MHz, H₂O-*d*₂): $\delta = 140.7$ (C-a6), 130.7 (C-1'/C-8'), 128.2 (C-4), 128.2 (C-7), 128.1 (C-5), 127.9 (C-3''/C-5''), 121.1 (C-2'/C-7'), 120.8 (C-2''/C-6''), 102.8 (C-4'/C-5'), 95.5 (C-a5), 88.7 (C-a1'), 81.8 (C-a4'), 75.3

(d, $^1J_{\text{CHP,PO}_3} = 149.1 \text{ Hz}$, CHP), 73.6 (C-a2'), 68.3 (C-a3'), 63.1 (C-a5') ppm.

HMBC (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 76 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 175.1$ (C-3'/C-6'), 172.8 (C-3), 165.9 (Amid-Carbonyl), 164.6 (C-a4), 157.4 (C-4a'/C-10a'), 156.6 (C-1), 155.9 (C-a2), 141.8 (C-3a), 136.1 (C-1''), 133.9 (C-4''), 133.9 + 131.2 (C-6, C-8), 113.9 (C-8a'/C-9a') ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 14.55$ (d, $^3J_{\text{P,P}} = 34.4 \text{ Hz}$, PO_3), 1.93 (d, $^3J_{\text{P,P}} = 34.5 \text{ Hz}$, PO_4) ppm.

Pentatrium Cytidin-5'-yl-[(S)-4-(fluoresceinyl-6-carboxamido)phenyl]-phosphonomethyl]-phosphat (S)-8-p-(6)



Die Umsetzung des α -Hydroxymethylphosphonats (**S**)-**16-p** (16.3 mg, 0.0202 mmol) und **1** (23.5 mg, 0.0413 mmol, 2 Äq.) mit 5-Benzylthio-1*H*-tetrazol (7.8 mg, 0.0404 mmol, 2 Äq.) über Nacht (18 h) und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 8.1 μL , 0.0444 mmol, 2.2 Äq.) für (2 h) gemäß der **AAV1** (MPLC: Kieselgel 0.015–0.040, EE/MeOH-Gradient: [B] = 1–15 %) ergab das geschützte Kupplungsprodukt als blass gelben Feststoff (24.2 mg, 0.0187 mmol), der entsprechend der **AAV5** in 2 mL MeOH mit $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (4.1 mg, 0.0036 μmol , 0.19 Äq.) und K_2CO_3 (15.1 mg, 0.109 mmol, 5.9 Äq.) für 5 h entschützt wurde. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule A, H_2O + 0.1 % TFA/ACN + 0.1 % TFA, Gradient: [B] = 15–35 % in 11 min, Fluss 30 ml/min, $t_{\text{R}} = 8.6$ min) ergab (**S**)-**8-p-(6)** als intensiv orange gefärbtes Lyophilisat.

Ausbeute: 12.0 mg, 0.0113 mmol (61 %), $de = 83 \%$, $\text{C}_{37}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{Na}_5\text{O}_{17}\text{P}_2$, 976.52 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z [M-5Na+4H] $^-$ ber.: 865.1165, gef.: 865.1155; $\Delta = 1.16$ ppm

^1H -NMR (300 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 8.01$ (dd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.1 \text{ Hz}$, $^4J_{5,7} = 1.6 \text{ Hz}$, H-5), 7.92 (bd, 1H, $^3J_{4,5} = 8.1 \text{ Hz}$, H-4), 7.70 (bd, 1H, $^4J_{7,5} = 1.2 \text{ Hz}$, H-7), 7.60 (d, 1H, $^3J_{a6,a5} = 7.5 \text{ Hz}$, H-a6), 7.51 (d, 2H, $^3J_{2''/6'',3'',5''} = 8.5 \text{ Hz}$, H-2''/H-6''), 7.46 (d, 2H, $^3J_{3'',5'',2''/6''} = 8.9 \text{ Hz}$, H-3''/H-5''), 7.10 + 7.09 (2 d, 2H, 2 x $^3J_{1'/8',2'/7'} = 9.5 \text{ Hz}$, H-1'/H-8'), 6.72–6.61 (m, 4H, H-2'/H-7', H-4'/H-5'), 5.95 (d, 1H, $^3J_{a5,a6} =$

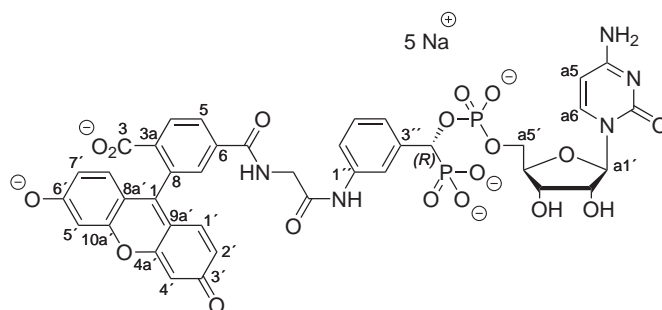
7.6 Hz, H-a5), 5.77 (d, 1H, $^3J_{a1',a2'} = 4.6$ Hz, H-a1'), 5.20 (dd, 1H, $^2J_{\text{CHP,PO}_3} = 13.7$ Hz, $^3J_{\text{CHP,PO}_4} = 10.0$ Hz, CHP), 4.00 (dd, 1H, $^3J_{a2',a3'} = 4.9$ Hz, $^3J_{a2',a1'} = 4.9$ Hz, H-a2'), 3.96 (m, 1H, H-a4'), 3.89 (ddd, 1H, $^2J_{a5a',a5b'} = 11.6$ Hz, $^3J_{a5a',\text{PO}_4} = 4.1$ Hz $^3J_{a5a',a4'} = 2.8$ Hz H-a5a'), 3.81–3.74 (m, 1H, H-a5b'), 3.73 (dd, 1H, $^3J_{a3',a2'} = 5.0$ Hz, $^3J_{a3',a4'} = 5.0$ Hz, H-a3') ppm.

HMQC (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 76 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 140.5$ (C-a6), 130.7 (C-1'/C-8'), 128.3 (C-7), 128.2 (C-4), 128.0 (C-5), 127.9 (C-3''/C-5''), 121.2 (C-2'/C-7'), 121.1 (C-2''/C-6''), 102.9 (C-4'/C-5'), 95.8 (C-a5), 88.6 (C-a1'), 82.3 (C-a4'), 75.3 (d, $^1J_{\text{CHP,PO}_3} = 160$ Hz, CHP), 73.6 (C-a2'), 68.8 (C-a3'), 63.8 (C-a5') ppm.

HMBC (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 76 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): 176.3 (C-3'/C-6'), 173.0 (C-3), 166.2 (Amid-Carbonyl), 165.0 (C-a4), 157.6 (C-4a'/C-10a'), 157.1 (C-1), 156.5 (C-a2), 141.9 (C-3a), 135.9 (C-1''), 134.2 (C-4''), 133.9 + 131.2 (C-6, C-8), 113.5 (C-8a'/C-9a') ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, $\text{H}_2\text{O}-d_2$): $\delta = 14.51$ (d, $^3J_{\text{P,P}} = 34.9$ Hz, PO_3), 1.39 (d, $^3J_{\text{P,P}} = 34.9$ Hz, PO_4) ppm.

Pentatrium Cytidin-5'-yl-[(*R*)-(3-(2-(fluoresceinyl-6-carboxamido)acetamido)phenyl)-phosphonomethyl]-phosphat (*R*)-8-*m*-G-(6)



Die Umsetzung des α -Hydroxymethylphosphonats (**(*R*)-16-*m*-G**) (122.7 mg, 0.142 mmol) und **1** (200.4 mg, 0.352 mmol, 2.5 Äq.) mit 1*H*-Tetrazol (40.0 mg, 0.572 mmol, 4 Äq.) für 3.5 h und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 77.2 μl , 0.425 mmol, 3.0 Äq.) für 1.5 h gemäß der AAV1 (MPLC: Kieselgel 0.015–0.040, EE/MeOH-Gradient: [B] = 1–30 %) ergab das geschützte Kupplungsprodukt als blass gelben Feststoff (39.7 mg, 0.0296 mmol), der entsprechend der AAV5 in 4 mL MeOH mit $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (6.1 mg, 0.0053 μmol , 0.18 Äq.) und K_2CO_3 (24.7 mg, 0.179 mmol, 6.0 Äq.) für 4 h entschützt wurde. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule C, 0.05 M TEAB-Puffer/ACN, Gradient: [B] = 2–30 % in 20 min, Fluss 10 ml/min, $t_{\text{R}} = 7.8$ min) ergab (**(*R*)-8-*m*-G-(6)**) als intensiv orange

gefärbtes Lyophilisat.

Ausbeute: 8.13 mg, 7.9 μmol (6 %), $de = 84\%$, $\text{C}_{39}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{Na}_5\text{O}_{18}\text{P}$, 1033.57 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z [M-5Na+4H]⁻ ber.: 922.1380, gef.: 922.1378; $\Delta = 0.22$ ppm

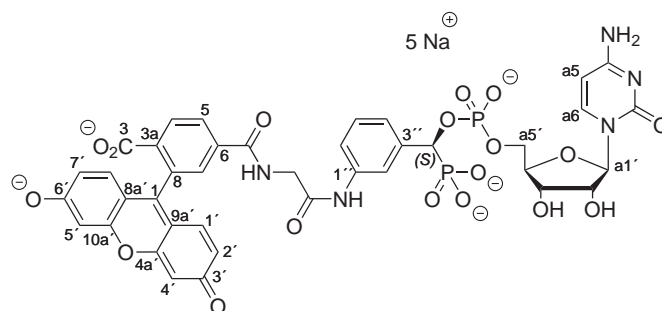
¹H-NMR (300 MHz, H₂O-*d*₂): $\delta = 8.06$ (dd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.1$ Hz, $^4J_{5,7} = 1.8$ Hz, H-5), 8.00 (bd, 1H, $^3J_{4,5} = 8.1$ Hz, H-4), 7.69 (bs, 1H, H-7), 7.53 (d, 1H, $^3J_{a6,a5} = 7.7$ Hz, H-a6), 7.41 (bs, 1H, H-2''), 7.39–7.35 (m, 1H, H5''), 7.29–7.23 (m, 2H, H-4'', H-6''), 7.13 + 7.12 (2 d, 2H, $2 \times ^3J_{1'/8',2'/7'} = 9.1$ Hz, H-1'/H-8'), 6.76 (bs, 2H, H-4'/H-5'), 6.70 + 6.69 (2 bd, 2H, $^3J_{2'/7',1'/8'} = 9.1$ Hz, H-2'/H-7'), 5.59 (d, 1H, $^3J_{a5,a6} = 7.2$ Hz, H-a5), 5.67 (d, 1H, $^3J_{a1',a2'} = 3.5$ Hz, H-a1'), 5.19 (dd, 1H, $^2J_{\text{CHP},\text{PO}_3} = 13.8$ Hz, $^3J_{\text{CHP},\text{PO}_4} = 10.2$ Hz, CHP), 4.16 (s, 2H, CH₂), 4.05–3.91 (m, 3H, H-a4', H-a5'), 3.90 (dd, 1H, $^3J_{a2',a3'} = 4.3$ Hz, $^3J_{a2',a1'} = 4.3$ Hz, H-a2'), 3.85 (dd, 1H, $^3J_{a3',a2'} = 5.2$ Hz, $^3J_{a3',a4'} = 5.2$ Hz, H-a3') ppm.

HMQC (¹H: 300 Mhz; ¹³C: 76 MHz, H₂O-*d*₂): $\delta = 142.0$ (C-a6), 131.4 (C-1'/C-8'), 128.8 (C-5''), 128.8 (C-4), 128.8 (C-5), 128.3 (C-7), 124.6 (C-4''), 120.7 (C-6''), 120.3 (C-2'/C-7'), 120.1 (C-2''), 103.2 (C-4'/C-5'), 95.7 (C-a5), 89.5 (C-a1'), 82.5 (C-a4'), 75.8 (dd, $^1J_{\text{CHP},\text{PO}_3} = 172$ Hz, CHP), 74.3 (C-a2'), 68.7 (C-a3'), 63.6 (C-a5'), 43.5 (Glycin-CH₂) ppm.

HMBC (¹H: 300 Mhz; ¹³C: 76 MHz, H₂O-*d*₂): $\delta = 173.1$ (C-3), 172.9 (C-3'/C-6'), 169.1 (CH₂C(=O)), 168.9 (Amid-Carbonyl), 163.0 (C-a4), 157.3 (C-1, C-4a'/C-10a'), 153.6 (C-a2), 141.0 (C-3a), 138.2 (C-1''), 136.5 (C-3''), 134.3 + 133.4 (C-6, C-8), 114.5 (C-8a'/C-9a') ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, H₂O-*d*₂): $\delta = 14.51$ (d, $^3J_{\text{P},\text{P}} = 34.0$ Hz, PO₃), 1.40 (d, $^3J_{\text{P},\text{P}} = 34.4$ Hz, PO₄) ppm.

Pentatrium Cytidin-5'-yl-[(*S*)-(3-(2-(fluoresceinyl-6-carboxamido)acetamido)phenyl)-phosphonomethyl]-phosphat (*S*)-8-*m*-G-(6)



Die Umsetzung des α -Hydroxymethylphosphonats (*S*)-16-*m*-G (37.5 mg,

0.0433 mmol) und **1** (47.5 mg, 0.0833 mmol, 1.9 Äq.) mit 5-Benzylthio-1*H*-tetrazol (16.6 mg, 0.0866 mmol, 2 Äq.) über Nacht (20 h) und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 15.7 µl, 0.0866 mmol, 2.0 Äq.) für 4.0 h gemäß der AAV1 (MPLC: Kieselgel 0.015–0.040, EE/MeOH-Gradient: [B] = 1–10 %) ergab das geschützte Kupplungsprodukt als blass gelben Feststoff (57.8 mg, 0.0428 mmol), der entsprechend der AAV5 in 2.5 mL MeOH mit Pd(PPh₃)₄ (7.4 mg, 0.0064 µmol, 0.15 Äq.) und K₂CO₃ (35.4 mg, 0.257 mmol, 6.0 Äq.) für 6 h entschützt wurde. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule A, H₂O + 0.1 % TFA/ACN + 0.1 % TFA, Gradient: [B] = 5–30 % in 19 min, Fluss 30 ml/min, *t*_R = 15.9 min) ergab (**S**)-**8-m-G-(6)** als intensiv orange gefärbtes Lyophilisat.

Ausbeute: 26.4 mg, 0.0255 µmol (59 %), *de* = 83 %, C₃₉H₃₀N₅Na₅O₁₈P, 1033.57 g/mol

HRMS (ESI-TOF): *m/z*[M-5Na+4H]⁻ ber.: 922.1380, gef.: 922.1362; Δ = 0.18 ppm

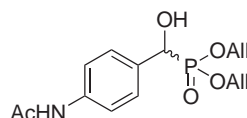
¹H-NMR (300 MHz, H₂O-*d*₂): δ = 8.05 (dd, 1H, ³*J*_{5,4} = 8.1 Hz, ⁴*J*_{5,7} = 1.8 Hz, H-5), 7.92 (d, 1H, ³*J*_{4,5} = 8.1 Hz, H-4), 7.73 (bd, 1H, ⁴*J*_{7,5} = 1.7 Hz, H-7), 7.56 (d, 1H, ³*J*_{a6,a5} = 7.6 Hz, H-a6), 7.45–7.27 (m, 1H, Ph), 7.15 + 7.14 (2 d, 2H, 2 x ³*J*_{1'/8',2'/7'} = 9.1 Hz, H-1'/H-8'), 6.70–6.61 (m, 4H, H-2'/H-7', H-4'/H-5'), 5.96 (d, 1H, ³*J*_{a5,a6} = 7.6 Hz, H-a5), 5.73 (d, 1H, ³*J*_{a1',a2'} = 4.6 Hz, H-a1'), 5.14 (dd, 1H, ²*J*_{CHP,PO₃} = 13.8 Hz, ³*J*_{CHP,PO₄} = 10.0 Hz, CHP), 4.20 (s, 2H, CH₂), 4.98–3.90 (m, 3H, H-a4', H-a5a'), 3.87 (dd, 1H, ³*J*_{a2',a3'} = 4.9 Hz, ³*J*_{a2',a1'} = 4.9 Hz, H-a2'), 3.89 (ddd, 1H, ²*J*_{a5a',a5b'} = 12.2 Hz, ³*J*_{a5a',PO₄} = 4.0 Hz, ³*J*_{a5a',a4'} = 3.9 Hz, H-a5b'), 3.54 (dd, 1H, ³*J*_{a3',a2'} = 5.0 Hz, ³*J*_{a3',a4'} = 5.0 Hz, H-a3') ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, H₂O-*d*₂): δ = 178.0 (C-3'/C-6'), 173.8 (C-3), 169.5 (CH₂C(=O)), 169.4 (Amid-Carbonyl), 165.8 (C-a4), 158.3 (C-4a'/C-10a'), 157.5 (C-1), 157.2 (C-a2), 142.8 (C-3a), 141.3 (C-a6), 139.1 (C-3'), 136.3 (d, ⁴*J*_{1',PO₃} = 2.0 Hz, C-1'), 133.6 + 131.6 (C-6, C-8), 131.4 (C-1'/C-8'), 128.9 (C-5'), 128.8 (C-7), 128.8 (C-4), 128.6 (C-5), 124.8 (C-4'), 122.1 (C-2'/C-7'), 121.1 (C-6'), 120.7 (d, ³*J*_{2',PO₃} = 4.3 Hz, C-2'), 113.6 (C-8a'/C-9a'), 103.5 (C-4'/C-5'), 96.3 (C-a5), 89.3 (C-a1'), 82.7 (d, ³*J*_{a4',PO₄} = 9.5 Hz, C-a4'), 76.1 (dd, ¹*J*_{CHP,PO₃} = 154.1 Hz, ²*J*_{CHP,PO₄} = 8.8 Hz, CHP), 74.1 (C-a2'), 69.3 (C-a3'), 64.5 (d, ²*J*_{a5',PO₄} = 6.9 Hz, C-a5'), 43.5 (Glycin-CH₂) ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, H₂O-*d*₂): δ = 14.18 (d, ³*J*_{P,P} = 33.5 Hz, PO₃), 1.47 (d, ³*J*_{P,P} = 33.5 Hz, PO₄) ppm.

9.6. Synthese unmarkierter Inhibitoren

(*R/S*)-Diallyl-((4-acetamidophenyl)hydroxymethyl)phosphonat (**21**)



Zu einer Lösung von 4-Acetamidobenzaldehyd (0.30 g, 1.84 mmol) und Diallylphosphonat **11b** (0.16 ml, 1.12 mmol, 0.6 Äq.) in DCM wurde Triethylamin (0.13 ml, 0.93 mmol, 0.5 Äq.) zugegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde eingengt und nach chromatographischer Reinigung (MPLC: Kieselgel 0.040–0.063, EE/MeOH-Gradient: [B] = 0–10 %) **21** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.27 g, 0.83 mmol (74 %), C₁₅H₂₀NO₅P, 325.30 g/mol

R_f = 0.30 (EE/MeOH 95:5)

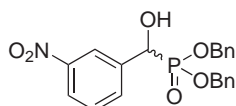
HRMS (ESI-TOF): *m/z*[M+Na]⁺ ber.: 348.0971, gef.: 348.0978 ; Δ = 2.01 ppm

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-*d*₁): δ = 8.96 (s, 1H, NH), 7.35 (d, 2H, ³*J*_{3/5,2/6} = 7.35 Hz, H-3/H-5), 7.26 (bd, 2H, ³*J*_{2/6,3/5} = 8.7 Hz), 5.94–7.26 (m, 2H, All-CH), 5.28 + 5.22 (2 d, 2H, ³*J*_{trans,2'} = 17.7 Hz und 16.8 Hz, All-trans), 5.18 + 5.15 (bd, 2H, ³*J*_{cis,2'} = 9.6 Hz und 9.6 Hz, All-cis), 4.99–4.85 (m, 2H, CHP, OH), 4.58–4.30 (m 4H, All-CH₂-), 2.08 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-*d*₁): δ = 169.6 (Carbonyl), 139.3 (d, ⁵*J*_{C,P} = 3.3 Hz, C-4), 132.7 + 132.5 (2 d, ³*J*_{C,P} = 3.7 Hz, All-CH), 131.7 (d, ²*J*_{C,P} = 1.7 Hz, C-1), 127.7 (d, ³*J*_{C,P} = 6.0 Hz, C-2/C-6), 120.0 (d, ⁴*J*_{C,P} = 2.1 Hz, C-3/C-5), 118.0 (d, ⁴*J*_{C,P} = 2.2 Hz, All=CH₂), 70.4 (d, ¹*J*_{C,P} = 163.9 Hz, CHP), 67.6 + +67.3 (2 d, ²*J*_{C,P} = 7.1 Hz, All-CH₂-), 24.1 (Me) ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, CHCl₃-*d*₁): δ = 22.99 (s) ppm.

(*R/S*)-Dibenzyl-(hydroxy-(3-nitrophenyl)methyl)phosphonat (**23**)



Zu einer Lösung von 3-Nitrobenzaldehyd (205.0 mg, 1.36 mmol) und Dibenzylphosphonat (0.54 ml, 2.45 mmol, 1.8 Äq.) in DCM wurde Triethylamin (208 µl, 1.494 mmol, 2.1 Äq.) zugegeben und für 2 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde eingengt und chro-

matographisch gereinigt (Kieselgel 0.040–0.063, Hex/EE 80:20). Beim Einengen der Produktfraktion fiel **23** als farbloser Feststoff aus und wurde nach nach Abfiltrieren und Waschen mit Hexan im Feinvakuum getrocknet.

Ausbeute: 487.8 mg, 1.18 mmol (87 %), C₂₁H₂₀NO₆P, 413.36 g/mol

$R_f = 0.50$ (EE/Hex 80:20)

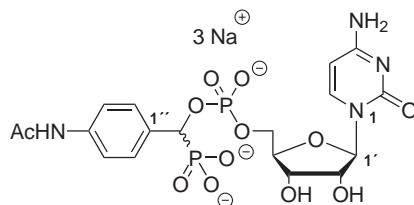
HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 414.1101, gef.: 414.1100; $\Delta = 0.24$ ppm

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 8.25$ (bs, 1H, H-2), 8.11 (bd, 2H, ³ $J_{4,5} = 7.5$ Hz, H-4), 7.71 (bd, 2H, ³ $J_{6,5} = 7.6$ Hz, H-6), 7.44 (dd, 1H, ³ $J_{5'',4''} = 8.0$ Hz, ³ $J_{5'',6''} = 8.0$ Hz, H-5), 7.35–7.20 (m, 10 H, Bn), 5.13 (d, 1H, ² $J_{1,P} = 10.7$ Hz, CHOH), 5.08–4.92 (m, 4H, CH₂Bn), 4.03 (br, 1H, OH) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 148.1$ (C-3), 138.3 (C-1), 135.5 + 135.5 (2 d, 2 x ⁴ $J_{C,P} = 5.5$ Hz, Bn-quartär), 133.0 (d, ³ $J_{C,P} = 5.1$ Hz, C-6), 129.0 (d, ⁴ $J_{C,P} = 1.6$ Hz, C-5), 128.7 (d, ⁶ $J_{C,P} = 2.3$ Hz, *m*-Bn), 128.6 (d, $J_{C,P} = 3.2$ Hz, Bn), 128.1 (Bn), 122.9 (d, ³ $J_{C,P} = 3.1$ Hz, C-2), 122.0 (d, ⁵ $J_{C,P} = 5.7$ Hz, C-4), 69.1 + 68.8 (2 d, ² $J_{C,P} = 7.5$ Hz und 7.2 Hz, CH₂Bn), 70.2 (d, ¹ $J_{C,P} = 158.3$ Hz, CHOH) ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 21.84$ (s) ppm.

Trinatrium Cytidin-5'-yl-[(*R/S*)-(4-acetamidophenyl)-phosphonomethyl]-phosphat (**18**)



Die Umsetzung des α -Hydroxymethylphosphonats **21** (93.2 mg, 0.286 mmol) und **1** (165.0 mg, 0.289 mmol, 1.0 Äq.) mit 5-Benzylthio-1*H*-tetrazol (110.1 mg, 0.573 mmol, 2 Äq.) über Nacht (23 h) und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 104.1 μ l, 0.573 mmol, 2.0 Äq.) für 1 h gemäß der AAV1 (MPLC: Kieselgel 0.040–0.063, EE/MeOH-Gradient: [B] = 3–12 %) ergab **22** als farblosen Feststoff (169.7 mg, 0.210 mmol). Davon wurden entsprechend der AAV5 70.8 mg (0.0874 mmol) in 3.5 mL MeOH mit Pd(PPh₃)₄ (48.5 mg, 0.0175 mmol, 0.2 Äq.) und K₂CO₃ (50.1 mg, 0.363 mmol, 4.1 Äq.) für 4.5 h entschützt. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule A, H₂O + 0.1 % TFA/MeOH + 0.1 % TFA, Gradient: [B] = 3–11 % in 8 min, Fluss 30 ml/min, $t_R = 4.5$ min) ergab **18** als farbloses Lyophilisat.

Ausbeute: 15.5 mg, 0.0282 mmol (24%), C₁₈H₂₁N₄Na₃O₁₂P₃, 616.30 g/mol

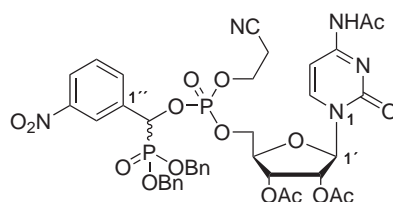
HRMS (ESI-TOF): m/z [M-H]⁻ ber.: 549.0793, gef.: 549.0801; Δ = 1.46 ppm

¹H-NMR (300 MHz, H₂O-*d*₂): δ = 7.83 + 7.66 (2 d, 1H, 2 x ³J_{6,5} = 7.8 Hz, H-6), 7.46 + 7.43 (2 d, 2H, 2 x ³J_{2''/6'',3''/5''} = 8.0 Hz, H-2''/H-6''), + 7.39 + 7.33 (2 d, 2H, 2 x ³J_{3''/5'',2''/6''} = 8.4 Hz, H-3''/H-5''), 6.09 + 6.05 (2 d, 1H, ³J_{5,6} = 7.9 Hz und 8.7 Hz, H-5), 5.82 + 5.75 (2 d, 1H, ³J_{1',2'} = 4.4 Hz und 3.2 Hz, H-1'), 5.18 + 5.17 (2 dd, 1H, ²J_{CHP,PO₃} = 13.8 Hz und 14.1 Hz, ³J_{CHP,PO₄} = 9.8 Hz und 10.1 Hz, CHP), 4.12–4.04 (m, 1H, H-4'), 4.02 (m, 1.5H, H-5a', H-5b'), 4.04 + 3.93 (dd, 1H, ³J_{a2',a3'} = 4.4 Hz, ³J_{a2',a1'} = 4.4 Hz, H-a2'), 3.88–7.80 (m, 0.5H, H-5a'), 4.04 + 3.93 (dd, 1H, ³J_{a2',a3'} = 4.1 Hz, ³J_{a2',a1'} = 4.1 Hz, H-a2'), 3.77 + 4.79 (2 dd, 1H, ³J_{a3',a2'} = 5.4 Hz und 4.8 Hz, ³J_{a3',a4'} = 5.4 Hz und 4.8 Hz, H-a3'), 2.15 + 2.13 (2 s, 3H, Acetyl) ppm.

¹³C-NMR(76 MHz, H₂O-*d*₂): 172.2 + 172.0 (Ac-Carbonyl), 161.1 + 161.0 (C-4), 151.2 (C-5), 142.2 + 142.1 (C-6), 136.2 + 136.1 (2 d, 2 x ⁵J_{C,P} = 2.7 Hz, C-4''), 133.6 + 133.3 (2 d, 2 x ²J_{C,P} = 1.6 Hz, C-1''), 127.9 (d, ³J_{C,P} = 4.7 Hz, C-2''/H-6''), 120.6 + 120.2 (C-3''/5''), 95.1 + 94.9 (C-5), 89.1 + 88.6 (C-1'), 82.7 + 82.1 (2 d, ³J_{C,P} = 9.5 Hz, C-4'), 81.8 (d, ¹J_{CHP,PO₃} = 159.2 Hz, ³J_{CHP,PO₄} = 6.7 Hz, CHP), 73.8 (C-2'), 68.8 + 67.7 (C-3'), 63.8.8 + 62.8 (2 d, 2 x ²J_{C,P} = 5.0 Hz, C-5'), 22.4 (Ac-CH₃) ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, H₂O-*d*₂): δ = 14.83 + 14.76 (d, 2 x ³J_{P,P} = 34.8 Hz, PO₃), 1.67 + 1.32 (2 d, 2 x ³J_{P,P} = 34.8 Hz, PO₄) ppm.

(*R/S*)-*N*⁴-Acetyl-2',3'-di-*O*-acetylcytidin-5'-yl-[(*R/S*)-bis(benzyloxy)phosphoryl](3-nitrophenyl)methyl]-2-cyanoethylphosphat (24)



Die Umsetzung des α -Hydroxymethylphosphonats **23** (311.2 mg, 0.452 mmol) und **1** (207.9 mg, 0.503 mmol, 1.1 Äq.) mit 1*H*-Tetrazol (70.5 mg, 1.01 mmol, 2.0 Äq.) für 3.5 h und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 137 μ l, 0.754 mmol, 1.7 Äq.) für 1 h gemäß der AAV1 (Kieselgel 0.040–0.063, EE/MeOH 95:5) und Lyophilisation aus H₂O/ACN ergab **24** als farbloses Pulver, bestehend aus den vier (*R,R*), (*R,S*), (*S,R*) und (*S,S*) Diastereomeren.

Ausbeute: 284.0 mg, 0.32 mmol (70%), C₃₉H₄₁N₅O₁₆P₂, 897.71 g/mol

$R_f = 0.30$ (EE/MeOH 95:5)

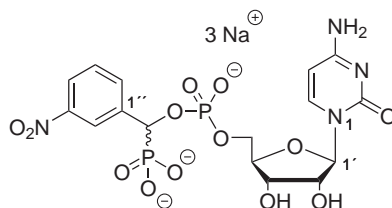
HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 898.2096, gef.: 898.2115; $\Delta = 2.12$ ppm

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 10.94$ (s, 1H, NH), 8.25 (m, 1H, 2''), 8.13–8.22 (m, 1H, H-4''), 8.05 + 8.04 + 8.00 + 7.53 (4 d, 1H, 4 x ³*J*_{6,5} = 8.0 Hz, H-6), 7.87 (m, 1H, H-6''), 7.66 (3 dd, 1H, 3 x ³*J*_{5'',4''} = 7.7 Hz, 3 x ³*J*_{5'',6''} = 7.7 Hz, H-5''), 7.30 (m, 10H, Bn), 7.19 + 7.17 + 7.14 + 7.13 (4 d, 1H, 4 x ³*J*_{5,6} = 7.6 Hz, H-5), 6.13 + 6.21 + 6.18 (3 d, 3 x ²*J*_{CHP,PO₃} = 14.0 Hz, 3 x ³*J*_{CHP,PO₄} = 10.4 Hz, CHP), 5.86 + 5.83 + 5.82 (3 d, 1H, ³*J*_{1',2'} = 3.9 Hz, 3.7 Hz und 3.5 Hz, H-1'), 5.50–5.36 (m, 1H, H-2'), 5.36–5.22 (m, 1H, H-3'), 5.11–4.93 (m, 4H, CH₂Bn), 4.22 (m, 3H, H-5a', H-5b', H-4'), 4.17 (m, 1H, OCH₂CH₂CN), 4.05 (q, 1H, ³*J*_{OCH₂,CH₂} = 6.2 Hz, OCH₂CH₂CN), 2.80 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 2.10 (s, 3H, *N*-Ac), 2.05 + 2.04 + 2.03 + 2.01 (4 s, 6H, Ac) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 171.0$ (*N*-Ac-Carbonyl), 169.2 (Ac-Carbonyl), 162.9 + 154.2 (C-2, C-4), 147.5 (C-3''), 146.6 (C-6), 135.8 + 135.7 + 135.7 + 135.6 (C-1'', Bn-quartär), 133.9 (C-6''), 129.9 (C-5''), 128.4 + 127.8 (Bn), 123.7 (C-4''), 122.3 (C-2''), 117.9 + 117.8 (CN), 95.9 (C-5), 90.8 + 90.6 + 90.6 + 90.4 (C-1'), 99.6 (C-4'), 73.0 (d, ¹*J*_{C,P} = 163.8 Hz, CHP), 72.5 (C-2'), 69.1 (C-3'), 68.4 + 68.2 (2 d, 2 x ²*J*_{C,P} = 6.7 Hz, CH₂Bn), 66.9 (C-5'), 63.0 (OCH₂CH₂CN), 24.45 (*N*-Ac-CH₃), 20.2 (Ac-CH₃), 18.9 + 18.8 (OCH₂CH₂CN) ppm.

Trinatrium Cytidin-5'-yl-[(*R*)-(3-nitrophenyl)-phosphonomethyl]-phosphat (19-l) und Trinatrium

Cytidin-5'-yl-[(*S*)-(3-nitrophenyl)-phosphonomethyl]-phosphat (19-h)



Der geschützte Inhibitor **32** (43.2 mg, 0.048 mmol) wurde in 2 mL DCM gelöst und Triethylamin (0.33 mL, 2.40 mmol, 50 Äq.) zugegeben. Nach Rühren über Nacht (17 h) wurde das Lösungsmittel im Stickstoffgasstrom entfernt und der Rückstand im Feinvakuum getrocknet. Er wurde in 1 mL trockenem MeOH aufgenommen und gemäß der AAV2 zunächst mit H₂ und Pd/C 10 % (7.0 mg, Reaktionszeit 30 min) hydriert und anschließend mit NaOMe in MeOH (0.5 M, 0.96 mL, 0.482 mmol, 10 Äq., Reaktionszeit 30 min) umgesetzt. Es wurde Aceton zugegeben und der entstandene Niederschlag abfiltriert, mit Aceton und MeOH gewaschen und der erhaltene Feststoff in H₂O

aufgenommen. Nach Behandlung mit H⁺- und Na⁺-Ionenaustauscherharz wurde das Rohprodukt HPLC-gereinigt (RP-18, Säule A, H₂O + 0.1 % TFA/ACN + 0.1 % TFA, Gradient: [B] = 2.5 %, Fluss 30 ml/min, $t_R(\mathbf{19-1}) = 13.0$ min, $t_R(\mathbf{19-h}) = 14.8$ min) und ergab nach Lyophilisation aus H₂O die Isomere **19-1** und **19-h** als farblose Pulver.

19-1: Ausbeute: 2.22 mg, 3.67 μ mol (7 %), C₁₆H₁₇N₄Na₃O₁₃P₂, 604.97 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+Na-2H]⁻ ber.: 559.0249, gef.: 559.0261; $\Delta = 2.15$ ppm

¹H-NMR (300 MHz, H₂O-*d*₂): $\delta = 8.29$ (bs, 1H, H-2''), 8.16 (bd, 1H, $^3J_{4'',5''} = 8.2$ Hz, H-4''), 7.86 (bd, 1H, $^3J_{6'',5''} = 8.2$ Hz, H-6''), 7.79 (d, 1H, $^3J_{6,5} = 7.8$ Hz, H-6), 7.60 (dd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.0$ Hz, $^3J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-5'), 6.02 (d, 1H, $^3J_{5,6} = 6.0$ Hz, H-5), 5.82 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 4.0$ Hz, H-1'), 5.32 (dd, 1H, $^2J_{\text{CHP},\text{PO}_3} = 14.1$ Hz, $^3J_{\text{CHP},\text{PO}_4} = 10.0$ Hz, CHP), 4.06 (m, 2H, H-4', H-5a'), 4.05 (dd, 1H, $^3J_{a2',a3'} = 4.4$ Hz, $^3J_{a2',a1'} = 4.4$ Hz, H-a2'), 3.98–3.88 (m, 1H, H-5a'), 3.86 (dd, 1H, $^3J_{a3',a2'} = 5.2$ Hz, $^3J_{a3',a4'} = 5.2$ Hz, H-a3') ppm.

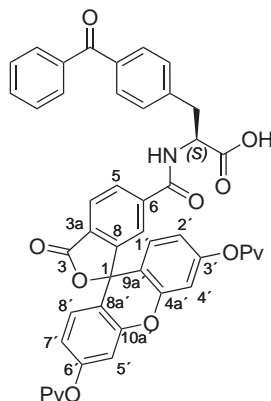
19-h: Ausbeute: 1.38 mg, 2.28 μ mol (5 %), C₁₆H₁₇N₄Na₃O₁₃P₂, 604.97 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z [M-H]⁻ ber.: 537.0429, gef.: 537.0421; $\Delta = 1.49$ ppm

¹H-NMR (300 MHz, H₂O-*d*₂): $\delta = 8.26$ (bs, 1H, H-2''), 8.08 (bd, 1H, $^3J_{4'',5''} = 8.1$ Hz, H-4''), 7.83 (bd, 1H, $^3J_{6'',5''} = 7.5$ Hz, H-6''), 7.57 (d, 1H, $^3J_{6,5} = 7.8$ Hz, H-6), 7.53 (dd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.4$ Hz, $^3J_{5,6} = 8.4$ Hz, H-5'), 5.96 (d, 1H, $^3J_{5,6} = 7.6$ Hz, H-5), 5.76 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 3.3$ Hz, H-1'), 5.31 (dd, 1H, $^2J_{\text{CHP},\text{PO}_3} = 13.8$ Hz, $^3J_{\text{CHP},\text{PO}_4} = 10.1$ Hz, CHP), 4.08–3.89 (m, 4H, H-2', H-3', H-4', H-5a/b') ppm.

9.7. Synthese der PAL-Sonden

6-[(1*S*)-(2-(4-Benzoylphenyl)-1-carboxyethylcarbamoyl)]-di-*O*-pivaloylfluorescein **L-25**



L-4-Benzoylphenylalanin (105.2 mg, 0.391 mmol) und 6-Carboxy-di-*O*-pivaloylfluorescein-*N*-succinimidylester (**2-(6)-OSu**) (250.8 mg, 0.391 mmol, 1 Äq.) wurden in 6 mL DMF suspendiert und nach Zugabe von Diisopropylethylamin (81.7 μ L, 0.469 mmol, 1.2 Äq.) bei Raumtemperatur gerührt. Innerhalb von 3 h klärte sich die Lösung und nach 4 h wurde das Lösungsmittel i.V. entfernt, der Rückstand in EE aufgenommen, mit 40 mL HCl (0.5 M) sowie 20 mL Brine extrahiert und die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet. MPLC-Reinigung (Kieselgel 0.015–0.040, DCM/MeOH-Gradient + 2 % CH_3COOH : [B] = 0 – 10 %) und anschließende Lyophilisation aus Dioxan ergaben das Produkt **L-25** als farbloses Pulver.

Ausbeute: 292.5 mg, 0.368 mmol (94 %), $\text{C}_{47}\text{H}_{41}\text{NO}_{11}$, 795.27 g/mol

$R_f = 0.37$ (DCM/MeOH 95:5 + 2 % CH_3COOH)

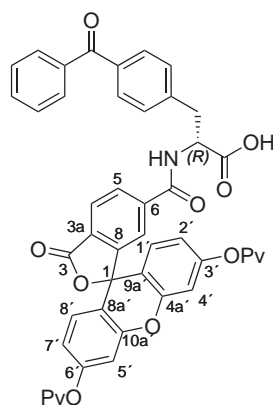
HRMS (ESI-TOF): m/z [M+Na] $^+$ ber.: 818.2572, gef.: 818.2577; $\Delta = 0.61$ ppm

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = 8.10$ (bs, 1H, COOH), 7.94 (d, 1H, $^3J_{4,5} = 7.9$ Hz, H-4), 7.85 (d, 2H, $^3J_{\text{Bz-o},\text{Bz-m}} = 7.2$ Hz, Bz-*o*), 7.73 (bd, 1H, $^3_{5,4} = 8.0$ Hz, H-5), 7.64 (t, 1H, $^3J_{\text{Bz-p},\text{Bz-m}} = 7.4$ Hz, Bz-*p*), 7.51 (dd, 2H, $^3J_{\text{Bz-m},\text{Bz-o}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{Bz-m},\text{Bz-p}} = 7.6$ Hz, Bz-*m*), 7.45 (d, 2H, $^3J_{\text{Phe-3/5},\text{Phe-2/6}} = 8.1$ Hz, Phe-3/5), 7.27 (s, 1H, H7), 7.12 (d, 2H, $^3J_{\text{Phe-2/6},\text{Phe-3/5}} = 8.1$ Hz, Phe-2/6), 7.06 (d, 1H, $^4J_{4',2'} = 2.1$ Hz, H-4'), 6.94 (bd, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{CH}} = 8.0$ Hz, NH), 6.85 (dd, 1H, $^3J_{2',1'} = 8.7$ Hz, $^4J_{2',4'} = 2.2$ Hz, H-2'), 6.77 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 8.7$ Hz, H-1'), 6.70 (s, 1H, H-7'), 6.70 (s, 1H, H-8'), 6.61 (bs, 1H, H-5'), 4.87 (ddd, 1H, $^3J_{\text{CH},\text{NH}} = 8.3$ Hz, $^3J_{\text{CH},\text{CH}_2\text{-a}} = 5.5$ Hz, $^3J_{\text{CH},\text{CH}_2\text{-b}} = 5.5$ Hz, Phe-CH), 3.26 (dd, 1H, $^2J_{\text{CH}_2\text{-b},\text{CH}_2\text{-a}} = 13.8$ Hz, $^3J_{\text{CH}_2\text{-b},\text{CH}} = 4.8$ Hz, Phe-CH₂-b), 3.13

(dd, 1H, $^2J_{\text{CH}_2\text{-a,CH}_2\text{-b}} = 13.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{CH}_2\text{-a,CH}} = 6.0 \text{ Hz}$, Phe-CH₂-a), 1.38 (s, 9H, Pv), 1.33 (s, 9H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 198.1$ (Ph(CO)Ph), 176.4 (Pv-Carbonyl), 176.4 (Pv-Carbonyl), 172.4 (COOH), 168.3 (C-3), 165.0 (Amid-Carbonyl), 153.4 (C-8), 152.6 (C-3'), 152.6 (C-6'), 151.2 (10a'), 151.1 (C-4a'), 141.0 (Phe-1), 139.9 (C-6), 136.9 (Phe-4), 136.6 (Bz-1), 133.2 (Bz-*p*), 130.7 (Bz-*o*), 129.8 (Phe-3/5), 129.4 (C-5), 129.4 (Phe-2/6), 128.9 (C-1'), 128.8 (C-8'), 128.4 (Bz-*m*), 128.2 (C-3a), 125.3 (C-4), 122.7 (C-7), 117.9 (C-7'), 117.8 (C-2'), 115.5 (C-8a'), 115.1 (C-9a'), 110.2 (C-5'), 110.1 (C-4'), 81.7 (C-1), 52.8 (Phe-CH), 39.2 (Pv-C(CH₃)₃), 39.1 (Pv-C(CH₃)₃), 37.1 (Phe-CH₂), 27.0 (Pv-CH₃), 27.0 (Pv-CH₃) ppm.

6-[(1*R*)-(2-(4-Benzoylphenyl)-1-carboxyethylcarbamoyl)]-di-*O*-pivaloylfluorescein **D-25**



D-4-Benzoylphenylalanin (155.7 mg, 0.578 mmol) und 6-Carboxy-di-*O*-pivaloylfluorescein-*N*-succinimidylester (**2-(6)-OSu**) (371.2 mg, 0.579 mmol, 1 Äq.) wurden in 6 mL DMF suspendiert und Diisopropylethylamin (89.7 μL , 0.694 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben. Innerhalb von 3 h klärte sich die Lösung und nach 4 h Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel i.V. entfernt, der Rückstand in EE aufgenommen und mit 40 mL HCl (0.5 M) und 40 mL Brine extrahiert und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. MPLC-Reinigung (Kieselgel 0.04–0.064, DCM + 5% CH₃COOH/MeOH-Gradient: [B] = 0–10%) und anschließende Lyophilisation aus Dioxan ergab das Produkt **D-25** als farbloses Pulver.

Ausbeute: 299.1 mg, 0.376 mmol (65%), C₄₇H₄₁NO₁₁, 795.27 g/mol

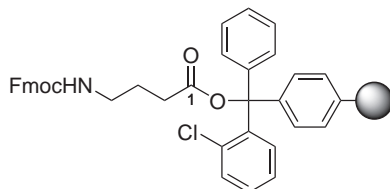
$R_f = 0.57$ (EE/Hex 80:20)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+Na]⁺ ber.: 818.2572, gef.: 818.2565; $\Delta = 0.86$ ppm

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = 7.95$ (d, 1H, $^3J_{4,5} = 8.0$ Hz, H-4), 7.84 (d, 2H, $^3J_{\text{Bz-o},\text{Bz-m}} = 7.2$ Hz, Bz-o), 7.74 (bd, 1H, $^3J_{5,4} = 7.6$ Hz, H-5), 7.64 (t, 1H, $^3J_{\text{Bz-p},\text{Bz-m}} = 7.4$ Hz, Bz-p), 7.50 (dd, 2H, $^3J_{\text{Bz-m},\text{Bz-o}} = 7.8$ Hz, $^3J_{\text{Bz-m},\text{Bz-p}} = 7.8$ Hz, Bz-m), 7.46 (d, 2H, $^3J_{\text{Phe-3/5},\text{Phe-2/6}} = 8.2$ Hz, Phe-3/5), 7.29 (s, 1H, H7), 7.13 (d, 2H, $^3J_{\text{Phe-2/6},\text{Phe-3/5}} = 8.0$ Hz, Phe-2/6), 7.06 (d, 1H, $^4J_{4',2'} = 2.1$ Hz, H-4'), 6.98 (bd, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{CH}} = 8.1$ Hz, NH), 6.84 (dd, 1H, $^3J_{2',1'} = 8.7$ Hz, $^4J_{2',4'} = 2.2$ Hz, H-2'), 6.78 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 8.7$ Hz, H-1'), 6.71 (s, 1H, H-7'), 6.71 (s, 1H, H-8'), 6.64 (bs, 1H, H-5'), 4.89 (ddd, 1H, $^3J_{\text{CH},\text{NH}} = 8.0$ Hz, $^3J_{\text{CH},\text{CH}_2\text{-a}} = 5.7$ Hz, $^3J_{\text{CH},\text{CH}_2\text{-b}} = 5.7$ Hz, Phe-CH), 3.26 (dd, 1H, $^2J_{\text{CH}_2\text{-b},\text{CH}_2\text{-a}} = 13.7$ Hz, $^3J_{\text{CH}_2\text{-b},\text{CH}} = 4.8$ Hz, Phe-CH₂-b), 3.15 (dd, 1H, $^2J_{\text{CH}_2\text{-a},\text{CH}_2\text{-b}} = 13.7$ Hz, $^3J_{\text{CH}_2\text{-a},\text{CH}} = 6.0$ Hz, Phe-CH₂-a), 1.38 (s, 9H, Pv), 1.33 (s, 9H, Pv) ppm.

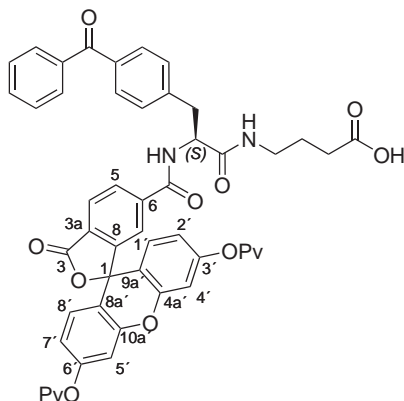
$^{13}\text{C-NMR}$ (76 MHz, CHCl_3-d_1): $\delta = 197.7$ (Ph(CO)Ph), 176.3 (Pv-Carbonyl), 176.3 (Pv-Carbonyl), 172.3 (COOH), 168.3 (C-3), 165.2 (Amid-Carbonyl), 153.1 (C-8), 152.5 (C-3'), 152.4 (C-6'), 151.1 (10a'), 151.0 (C-4a'), 141.0 (Phe-1), 139.8 (C-6), 136.6 (Bz-1), 136.5 (Phe-4), 133.0 (Bz-p), 130.4 (Bz-o), 129.8 (Phe-3/5), 129.4 (C-5), 129.4 (Phe-2/6), 128.9 (C-1'), 128.8 (C-8'), 128.4 (Bz-m), 128.2 (C-3a), 125.2 (C-4), 122.8 (C-7), 117.8 (C-7'), 117.7 (C-2'), 115.3 (C-8a'), 115.0 (C-9a'), 110.1 (C-5'), 110.0 (C-4'), 81.8 (C-1), 52.9 (Phe-CH), 39.0 (Pv-C(CH₃)₃), 38.9 (Pv-C(CH₃)₃), 37.0 (Phe-CH₂), 26.9 (Pv-CH₃), 26.8 (Pv-CH₃) ppm.

Fmoc-GABA beladenes 2-Chlortritylharz (**26**)



In einem ausgeheizten Schlenkrohr wurden unter Stickstoffatmosphäre 2-Chlortritylchloridharz (399.7 mg; 100-200 mesh, 1% DVB, 1.3 mmol/g) und Fmoc- γ -aminobuttersäure (508.1 mg, 1.562 mmol, 3 Äq.) in 10 mL trockenem DCM aufgenommen und Diisopropylethylamin (0.56 mL, 3.23 mmol, 6.2 Äq.) zugegeben. Nach 3.5 h Kupplungsreaktion wurden 0.64 mL MeOH zum Blockieren unreaktiver Tritylchloridfunktionalitäten zugegeben und nach 45 min wurde das Harz gewaschen (jeweils 3–5 mL: 3 x DCM, 3 x THF, 6x DMF, 3 x THF, 3 x DCM) und im Feinvakuum getrocknet. Die Fmoc-Bestimmung ergab für **26** eine Beladung von 0.878 mmol/g.

Ausbeute: 591.4 mg, 0.878 mmol/g (93 % Beladung)

6-[(2S)-3-(3-(4-Benzoylphenyl)-1-(3-carboxypropylamino)-1-oxopropan-2-yl-carbamoyl)]-di-O-pivaloylfluorescein L-25-GABA


Mit 2 x 5 mL Piperidin/DMF 20:80 (für je 5 min) wurde die Fmoc-Gruppe von Verbindung **26** (290.2 mg, 0.707 mmol/g, 0.205 mmol) abgespalten und anschließend wurde das Harz mehrfach mit DCM und zuletzt DMF gewaschen.

Fmoc-L-Bpa-OH (504.2 mg, 1.026 mmol, 5 Äq.) sowie HOBt (157.1 mg, 1.026 mmol, 5 Äq.) wurden in 3 mL DMF gelöst und anschließend *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (159 μ L, 1.026 mmol, 5 Äq.) zugegeben. Die Mischung wurde auf das Harz gegeben und 2 Tage intensiv geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde abgetrennt und das Harz gewaschen (je 3–5 mL: 10 x DCM, 10 x DMF). Durch Behandlung des Harzes mit 2 x 5 mL Piperidin/DMF 20:80 (für je 10 min) wurde die Fmoc-Gruppe abgespalten und das Harz mit DMF und DCM gewaschen. Es wurden 6-Carboxy-di-O-pivaloylfluorescein (**2-(6)**) (334.0 mg, 0.613 mmol, 3 Äq.) und HOBt (94.3 mg, 0.616 mmol, 3 Äq.) zugegeben und die Mischung in 4 mL DMF aufgenommen. *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (95 μ L, 0.616 mmol, 3 Äq.) wurde zugegeben und nach Reaktion über Nacht (21 h) die Reaktionslösung entfernt sowie das Harz gewaschen (je 3–5 mL: 10 x DMF, 10 x DCM). Die Abspaltung von **L-25-GABA** vom Harz erfolgte mit 1 % TFA in DCM (4 x 1 min, jeweils 5 mL). Die vereinigten Filtrate wurden mit Brine gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und Lyophilisation aus Dioxan ergab **L-25-GABA** als einen blass gelben Feststoff.

Ausbeute: 172.3 mg, 0.196 mmol (96 %), C₅₁H₄₈N₂O₁₂, 880.93 g/mol

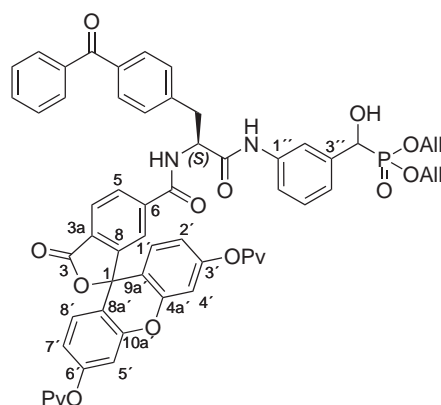
HRMS (ESI-TOF): *m/z*[M+Na]⁺ ber.: 903.3099, gef.: 903.3045; Δ = 5.98 ppm

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 8.54 (bs, 1H, NH), 7.98 (d, 1H, ³*J*_{4,5} = 8.0 Hz, H-4), 7.80 (bd, 1H, ³*J*_{5,4} = 7.7 Hz, H-5), 7.66 (d, 2H, ³*J*_{Bz-o,Bz-m} = 7.6 Hz, Bz-*o*), 7.62 (bs, 1H, H-7), 7.55 (t, 1H, ³*J*_{Bz-p,Bz-m} = 7.3 Hz, Bz-*p*), 7.52 (d, 2H, ³*J*_{Phe-3/5,Phe-2/6} = 7.7 Hz, Phe-3/5), 7.41 (dd, 2H, ³*J*_{Bz-m,Bz-o} = 7.6 Hz, ³*J*_{Bz-m,Bz-p} = 7.6 Hz, Bz-*m*), 7.27

(d, 2H, $^3J_{\text{Phe-2/6, Phe-3/5}} = 7.6$ Hz, Phe-2/6), 7.06 (bs, 1H, H-5'), 7.02 (bs, 1H, H-4'), 6.95 (d, 1H, $^3J_{2',1'} = 8.5$ Hz, H-2'), 6.83 (t, 1H, $^3J_{\text{NH},\alpha\text{-CH}_2} = 5.8$ Hz, NH-GABA), 6.80 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 8.6$ Hz, H-1'), 6.65 (bs, 2H, H-7', H-8'), 4.78 (ddd, 1H, $^3J_{\text{CH},\text{NH}} = 7.7$ Hz, $^3J_{\text{CH},\text{CH}_2\text{-a}} = 7.7$ Hz, $^3J_{\text{CH},\text{CH}_2\text{-b}} = 7.7$ Hz, Phe-CH), 3.13 (m, 2H, Phe-CH₂), 3.04 (m, 1H, NHCH₂CH₂CH₂b), 2.84 (bs, 1H, NHCH₂CH₂CH₂-a), 2.19 (dt, 1H, $^2J_{\text{H-b,H-a}} = 15.6$ Hz, $^3J_{\text{H-b,CH}_2} = 7.6$ Hz, NHCH₂CH₂CH₂-b), 2.11 (dt, 1H, $^2J_{\text{H-a,H-b}} = 15.1$ Hz, $^3J_{\text{H-a,CH}_2} = 7.6$ Hz, NHCH₂CH₂CH₂-a), 1.68 (dtt, 1H, $^2J_{\text{H-b,H-a}} = 6.7$ Hz, $^3J_{\text{H-b,CH}_2} = 6.7$ Hz, $^3J_{\text{H-b,CH}_2} = 6.7$ Hz, NHCH₂CH₂CH₂-b), 1.55 (dtt, 1H, $^2J_{\text{H-a,H-b}} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{H-a,CH}_2} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{H-a,CH}_2} = 6.8$ Hz, NHCH₂CH₂CH₂-a), 1.39 (s, 9H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 196.2$ (Ph(CO)Ph), 178.0 (Pv-Carbonyl), 176.6 (Pv-Carbonyl), 176.0 (COOH), 171.5 (Phe-CONH), 167.9 (C-3), 164.9 (Amid-Carbonyl), 152.7 (C-6'), 152.5 (C-3'), 151.8 (C-8), 151.6 (C-4a'), 151.5 (10a'), 141.4 (Phe-1), 139.9 (C-6), 137.4 (Bz-1), 136.0 (Phe-4), 132.3 (Bz-p), 129.9 (Phe-3/5), 129.9 (C-5), 129.7 (Bz-o), 129.5 (C-1'), 129.1 (Phe-2/6), 129.0 (C-3a), 128.8 (C-8'), 128.1 (Bz-m), 125.1 (C-4), 122.7 (C-7), 118.7 (C-2'), 118.0 (C-7'), 116.0 (C-9a'), 115.5 (C-8a'), 110.4 (C-4'), 110.0 (C-5'), 82.2 (C-1), 54.7 (Phe-CH), 39.1 (Pv-C(CH₃)₃), 39.0 (Pv-C(CH₃)₃), 38.7 (Phe-CH₂), 38.7 (CH₂CH₂CH₂COOH), 30.9 (CH₂CH₂CH₂COOH), 26.9 (Pv-CH₃), 26.8 (Pv-CH₃), 23.8 (CH₂CH₂CH₂COOH) ppm.

(S/R)-Diallyl-(3-((2S)-3-(4-benzoylphenyl)-2-(di-O-pivaloylfluoresceinyl-6-carboxamido)propanamido)phenyl)-(hydroxy)methylphosphonat L-26



Die Nitroverbindung **14-m** (236 mg, 0.754 mmol) und SnCl₂·H₂O (1.53 g, 6.79 mmol, 9 Äq.) wurden in 5 mL absolutem Ethanol im Mikrowellenreaktor für 100 min auf 60 °C erhitzt. Zu der Reaktionslösung wurden 20 mL EE gegeben und mit 40 mL NaHCO₃ sowie 40 mL Brine gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde

das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur entfernt und das Anilin **15-m** für wenige Minuten im Feinvakuum getrocknet. Das erhaltene Öl wurde in 3 mL DCM aufgenommen und **L-25** (200 mg, 0.251 mmol, 1 Äq.), HOAt (68 mg, 0.503 mmol, 2 Äq.) und zuletzt EDC-HCl (53 mg, 0.277 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben. Nach Reaktion über Nacht wurde die Reaktionslösung mit 20 mL HCl (0.5 M) und 20 mL NaHCO₃ (ges.) gewaschen und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Die organische Phase wurde eingengt und das Produkt **L-26** nach MPLC-Reinigung (Kieselgel 0.040–0.063, Hex/EE 25:75) als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 166.7 mg, 0.157 mmol (63%), C₆₀H₅₇N₂O₁₄, 1061.07 g/mol

$R_f = 0.40$ (EE/Hex 80:20)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 1061.3620, gef.: 1061.3629; $\Delta = 0.85$ ppm

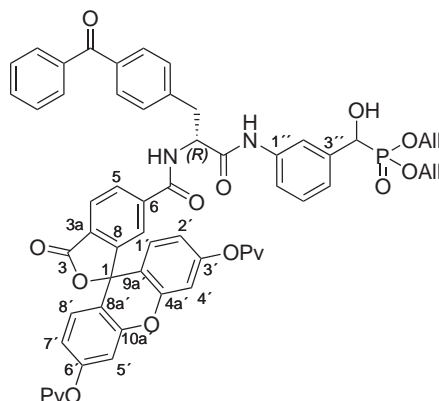
¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 8.79 + 8.72$ (2 bs, 1H, Anilin-NH), 7.97 + 7.96 (2 d, 1H, 2 x ³J_{4,5} = 8.0 Hz, H-4), 7.77 (bs, 1H, H-7), 7.66 (m, 1H, H-2''), 7.62 (m, 1H, H-5), 7.58 (d, 2H, ³J_{Bz-o,Bz-m} = 8.3 Hz, Bz-o), 7.54 (t, 1H, ³J_{Bz-p,Bz-m} = 7.7 Hz, Bz-p), 7.42 (m, 4H, Phe-2/6,3/5), 7.38 (dd, 2H, ³J_{Bz-m,Bz-o} = 7.8 Hz, ³J_{Bz-m,Bz-p} = 7.8 Hz, Bz-m), 7.31–7.25 (m, 1H, H-6''), 7.17 (dd, 1H, ³J_{5'',4''} = 7.6 Hz, ³J_{5'',6''} = 7.6 Hz, H-5''), 7.17 (d, 1H, ³J_{7',8'} = 7.7 Hz, H-7'), 7.09 + 6.96 (2 d, 1H, 2 x ³J_{4',5''} = 7.4 Hz, H-4''), 6.82 + 6.84 (2 d, 1H, 2 x ³J_{8',7'} = 8.6 Hz, H-8'), 6.77 (bs, 1H, H-5'), 6.65 (bs, 1H, H-4'), 6.50–6.35 (m, 2H, H-1', H-2'), 5.86–5.62 (m, 2H, Allyl-CH), 5.22 + 5.18 (2 d, 2H, 2 x ³J_{trans,2-All} = 18.2 Hz, Allyl-trans), 5.09 + 5.03 (2 d, 2H, 2 x ³J_{cis,2-All} = 10.2 Hz, Allyl-cis), 4.90 (d, 1H, ²J_{CHP,P} = 11.2 Hz, CHOH), 4.88 (m, 1H, Phe-CH), 4.49–4.20 (m, 4H, All-CH₂), 3.25 (dd, 1H, ²J_{CH2-b,CH2-a} = 13.1 Hz, ³J_{CH2-b,CH} = 3.3 Hz, Phe-CH₂-b), 3.10 + 3.06 (2 dd, 1H, 2 x ²J_{CH2-a,CH2-b} = 11.9 Hz, 2 x ³J_{CH2-a,CH} = 5.4 Hz, Phe-CH₂-a), 1.53 + 1.52 + 1.50 + 1.33 (4 s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 196.33 + 196.25$ (Ph(CO)Ph), 180.70 + 177.41 (Pv-Carbonyl), 170.53 + 170.39 (PhNHCOR), 167.74 (C-3), 164.42 (Fluo-CO), 152.61 (C-3'), 152.16 (C-6'), 151.91 (C-4a'), 151.76 (C-10a'), 150.94 (C-8), 141.73 + 141.67 (Phe-1), 140.09 + 140.02 (C-6), 137.85 (Bz-1), 137.84 + 137.60 (C-1''), 137.37 + 137.21 (C-3''), 136.28 (Phe-4), 132.90 + 132.72 + 132.64 + 132.63 (4 d, 4 x ³J_{CH,P} = 6.5 Hz, Allyl-CH), 132.35 (Bz-p), 130.42 (C-8'), 129.81 (Phe-3/5), 129.74 (Bz-o), 129.41 (C-5), 129.37 (Phe-2/6), 129.10 (C-1'), 129.04 (C-5''), 128.43 (Bz-m), 128.14 (C-3a), 124.87 (C-4), 123.05 (C-4''), 122.46 (C-7), 119.43 (C-7'), 117.99 (Allyl=CH₂), 117.92 (C-2'), 117.75 + 117.70 (C-6''), 117.00 (C-2''), 116.47 (C-8a'), 115.57 (C-9a'), 110.77 (C-4'), 110.67 (C-5'), 82.50 (C-1), 70.34 + 70.07 (2 d, 2 x ¹J_{CHP,P} = 160.0 Hz, CHP),

67.50 + 67.37 + 67.19 + 67.04 (4 d, $4 \times {}^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 6.9$ Hz, Allyl-CH₂), 55.53 (Phe-CH), 40.21 (Phe-CH₂), 39.51 + 39.16 (Pv-C(CH₃)₃), 27.20 + 27.01 (Pv-CH₃) ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 22.40 + 22.37$ (2 s, PO₃) ppm.

(S/R)-Diallyl-(3-((2R)-3-(4-benzoylphenyl)-2-(di-O-pivaloylfluoresceinyl-6-carboxamido)propanamido)phenyl)-(hydroxy)methylphosphonat D-26



Die Nitrobenzylverbindung **14-m** (441.0 mg, 1.408 mmol) und SnCl₂·H₂O (2.82 g, 12.5 mmol, 9 Äq.) wurden in 11 mL absolutem Ethanol im Mikrowellenreaktor für 90 min auf 60 °C erhitzt. Zu der Reaktionslösung wurden 50 mL EE gegeben und mit 2 x 50 mL NaHCO₃ gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur entfernt und das Anilin **15-m** in 7.05 mL DCM aufgenommen. Zu einer Hälfte der Lösung von **15-m** wurden **D-25** (205.8 mg, 0.259 mmol, 0.33 Äq.), HOAt (105.6 mg, 0.776 mmol, 0.66 Äq.) und zuletzt EDC-HCl (74.4 mg, 0.389 mmol, 0.5 Äq.) zugegeben. Nach 2.5 h Reaktion unter Rühren wurde die Reaktionslösung durch Kieselgel gefiltert und mit EE eluiert. Die MPLC-Reinigung (Kieselgel 0.040–0.063, Hex/EE-Gradient: [B] = 50–100 %) und Lyophilisation aus Dioxan ergab **D-26** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 150.7 mg, 0.142 mmol (55 %), C₆₀H₅₇N₂O₁₄, 1061.07 g/mol

$R_f = 0.16$ (EE/Hex 75:25)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 1083.3440, gef.: 1083.3498; $\Delta = 5.35$ ppm

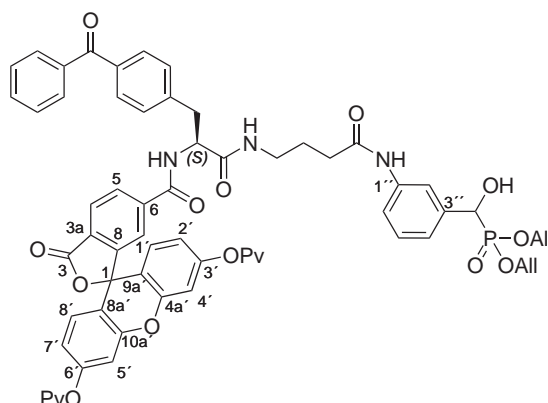
¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 8.82 + 8.74$ (2 bs, 1H, Anilin-NH), 7.97 + 7.95 (2 d, 1H, $2 \times {}^3J_{4,5} = 8.0$ Hz, H-4), 7.77 (bs, 1H, H-7), 7.66 (m, 1H, H-2''), 7.62 (m, 1H, H-5), 7.59 (d, 2H, ${}^3J_{\text{Bz-o},\text{Bz-m}} = 8.0$ Hz, Bz-o), 7.55 (t, 1H, ${}^3J_{\text{Bz-p},\text{Bz-m}} = 7.7$ Hz, Bz-p), 7.42 (m, 4H, Phe-2/6,3/5), 7.38 (dd, 2H, ${}^3J_{\text{Bz-m},\text{Bz-o}} = 7.8$ Hz, ${}^3J_{\text{Bz-m},\text{Bz-p}} = 7.8$ Hz, Bz-m), 7.32–7.24 (m, 1H, H-6''), 7.18 (dd, 1H, ${}^3J_{5'',4''} = 7.6$ Hz, ${}^3J_{5'',6''} = 7.6$ Hz,

H-5''), 7.16 (d, 1H, $^3J_{7',8'} = 7.7$ Hz, H-7'), 7.09 + 6.97 (2 d, 1H, $2 \times ^3J_{4'',5''} = 7.4$ Hz, H-4''), 6.84 + 6.82 (2 d, 1H, $2 \times ^3J_{8',7'} = 8.6$ Hz, H-8'), 6.76 (bs, 1H, H-5'), 6.65 (bs, 1H, H-4'), 6.46 (m, 2H, H-1', H-2'), 5.75 (m, 2H, Allyl-CH), 5.22 + 5.18 (2 d, 2H, $2 \times ^3J_{\text{trans},2\text{-All}} = 18.2$ Hz, Allyl-trans), 5.09 + 5.03 (2 d, 2H, $2 \times ^3J_{\text{cis},2\text{-All}} = 10.3$ Hz, Allyl-cis), 4.91 (d, 1H, $^2J_{\text{CHP},\text{P}} = 11.2$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{HOH}$), 4.88 (m, 1H, Phe-CH), 4.33 (m, 4H, All-CH₂), 3.25 (dd, 1H, $^2J_{\text{CH}_2\text{-b},\text{CH}_2\text{-a}} = 13.1$ Hz, $^3J_{\text{CH}_2\text{-b},\text{CH}} = 3.3$ Hz, Phe-CH₂-b), 3.10 + 3.06 (2 dd, 1H, $2 \times ^2J_{\text{CH}_2\text{-a},\text{CH}_2\text{-b}} = 12.2$ Hz, $2 \times ^3J_{\text{CH}_2\text{-a},\text{CH}} = 5.5$ Hz, Phe-CH₂-a), 1.53 + 1.51 + 1.50 + 1.33 (4 s, 18H, Pv) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (76 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-}d_1$): $\delta = 196.22 + 196.16$ (Ph(CO)Ph), 180.58 + 177.13 (Pv-Carbonyl), 170.46 + 170.32 (PhNHCOR), 167.70 (C-3), 164.38 (Fluo-CO), 152.54 (C-3'), 152.05 (C-6'), 151.81 (C-4a'), 151.65 (C-10a'), 150.82 (C-8), 141.59 + 141.55 (Phe-1), 139.93 + 139.86 (C-6), 137.68 (Bz-1), 137.64 + 137.49 (C-1''), 137.25 (C-3''), 136.14 (Phe-4), 132.72 + 132.58 + 132.53 + 1.32.50 (4 d, $4 \times ^3J_{\text{CH},\text{P}} = 6.0$ Hz, Allyl-CH), 132.25 (Bz-*p*), 130.19 (C-8'), 129.68 (Bz-*o*), 129.65 (Phe-3/5), 129.59 (C-5), 129.25 (Phe-2/6), 128.92 (C-1'), 128.40 (C-5''), 128.14 (C-3a), 128.03 (Bz-*m*), 124.77 (C-4), 122.95 + 122.66 (C-4''), 122.33 (C-7), 119.30 (C-7'), 117.85 (C-2'), 117.84 (Allyl=CH₂), 117.70 + 171.642 (C-6''), 116.97 (C-2''), 116.32 (C-8a'), 115.39 (C-9a'), 110.77 (C-4'), 110.67 (C-5'), 82.50 (C-1), 70.14 + 69.91 (2 d, $2 \times ^1J_{\text{CHP},\text{P}} = 160.5$ Hz, CHP), 67.40 + 67.28 + 67.19 + 67.03 (4 d, $4 \times ^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 6.9$ Hz, Allyl-CH₂), 55.38 (Phe-CH), 40.03 (Phe-CH₂), 39.37 + 39.02 (Pv-C(CH₃)₃), 27.05 + 26.88 (Pv-CH₃) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-}d_1$): $\delta = 22.49$ (s, PO₃) ppm.

(R)-Diallyl-(3-(4-((2S)-3-(4-benzoylphenyl)-2-(di-O-pivaloylfluoresceinyl-6-carboxamido)propanamido)butanamido)phenyl)(hydroxy)methylphosphonat L-26-GABA



Die Darstellung des Anilins **15-m** erfolgte wie unter **D-26** beschrieben. Es wurde die zweite Hälfte des in DCM aufgenommenen **15-m** eingesetzt. Zu der Lösung mit **15-m** (1 Äq.) wurden **L-25-GABA** (180.0 mg, 0.635 mmol, 0.33 Äq.), HOAt (85.2 mg, 0.629 mmol, 0.66 Äq.) und zuletzt EDC-HCl (59.2.4 mg, 0.309 mmol, 0.5 Äq.) zugegeben. Nach Reaktion über Nacht (24 h) wurde die Reaktionslösung durch Kieselgel gefiltert und mit EE/MeOH 90:10 eluiert. Die MPLC-Reinigung (Kieselgel 0.040–0.063, Hex/MeOH-Gradient: [B] = 0–10%) und Lyophilisation aus Dioxan ergab **L-26-GABA** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 182.0 mg, 0.159 mmol (77%), C₆₄H₆₄N₃O₁₅P, 1146.18 g/mol

$R_f = 0.33$ (EE/MeOH 95:5)

HRMS (ESI-TOF): m/z [M+H]⁺ ber.: 1146.4148, gef.: 1146.4147; $\Delta = 0.09$ ppm

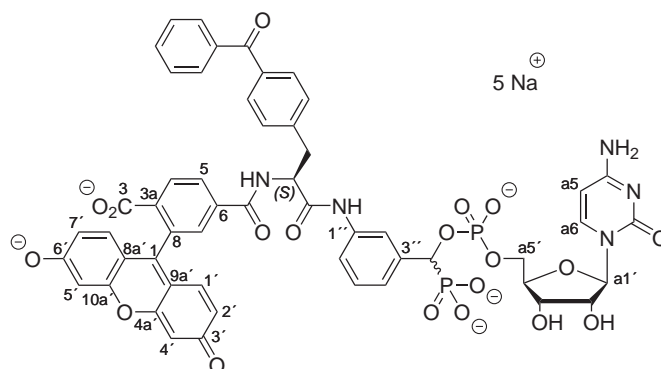
¹H-NMR (600 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 8.75 + 8.71$ (2 bs, 1H, Anilin-NH), 8.36 (bs, 1H, Flu-CONH), 7.89 (m, 1H, H-4, H-5), 7.66 (d, 2H, ³J_{Bz-o,Bz-m} = 7.3 Hz, Bz-o), 7.65 (m, 1H, H-2'), 7.63 (bs, 1H, H-7), 7.54 (t, 1H, ³J_{Bz-p,Bz-m} = 7.4 Hz, Bz-p), 7.50 (d, 2H, ³J_{Phe-3/5,Phe-2/6} = 7.3 Hz, Phe-3/5), 7.48 + 7.44 (2 d, 1H, 2 x ³J_{6',5'} = 8.5 Hz, H-6'), 7.41 (dd, 2H, ³J_{Bz-m,Bz-o} = 7.6 Hz, ³J_{Bz-m,Bz-p} = 7.6 Hz, Bz-m), 7.31 (bs, 1H, NH-GABA), 7.25 (d, 2H, ³J_{Phe-2/6,Phe-3/5} = 6.5 Hz, Phe-2/6), 7.13 + 7.11 (t, 1H, ³J_{5'',4''} = 7.6 Hz, ³J_{5'',6''} = 7.6 Hz, H-5''), 7.05 + 7.04 (2 d, 1H, 2 x ³J_{4'',5''} = 7.9 Hz, H-4''), 7.01 (bs, 1H, H-5'), 6.97 (bs, 1H, H-4'), 6.86 (bd, 1H, ³J_{1',2'} = 6.9 Hz, H-1'), 6.75 (bd, 1H, ³J_{2',1'} = 6.9 Hz, H-2'), 6.73 (d, 1H, ³J_{7',8'} = 7.9 Hz, H-7'), 6.69 (d, 1H, ³J_{8',7'} = 8.6 Hz, H-8'), 5.77–5.89 (m, 2H, Allyl-CH), 5.25 + 5.20 (2 d, 2H, 2 x ³J_{trans,2-All} = 17.4 Hz, Allyl-trans), 5.15 + 5.11 (2 d, 2H, 2 x ³J_{cis,2-All} = 10.4 Hz, Allyl-cis), 4.96 + 4.89 (2 d, 1H, 2 x ²J_{CHP,P} = 12.5 Hz, CHOH), 4.84 (m, 1H, Phe-CH), 4.50–4.27 (m, 4H, All-CH₂), 3.14 (m, 1H, Phe-CH₂-b), 3.08 (m, 1H, Phe-CH₂-a), 3.03 (m, 1H, NHCH₂CH₂CH₂b), 2.30 (m, 1H, NHCH₂CH₂CH₂-a), 2.18–1.99 (m, 1H, NHCH₂CH₂CH₂), 1.73–1.56 (m, 1H, NHCH₂CH₂CH₂), 1.37+1.34 (4 s, 18H, Pv) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CHCl₃-d₁): $\delta = 196.29$ (Ph(CO)Ph), 177.27 + 176.66 (Pv-Carbonyl), 171.28 (PhNH₂COR), 171.14 (CHCONH), 167.88 (C-3), 165.14 (Fluo-CO), 152.60 (C-3'), 152.46 (C-6'), 152.01 (C-8), 151.49 (C-4a'), 151.46 (C-10a'), 141.79 (Phe-1), 139.88 (C-6), 138.30 (C-1''), 137.21 (Bz-1), 137.15 (C-3''), 135.92 (Phe-4), 132.58 + 132.55 + 132.45 + 132.42 (4 d, 4 x ³J_{CH,P} = 8.5 Hz, Allyl-CH), 132.34 (Bz-p), 129.81 (Bz-o), 129.77 (Phe-2/6), 129.53 (C-5), 129.09 (Phe-3/5), 128.96 (C-1'), 128.92 (C-8'), 128.72 (C-3a), 128.49 (C-5''), 128.09 (Bz-m), 125.11 (C-4), 122.83 (C-7), 122.54 (C-4''), 119.59 + 118.56 (C-6''), 118.34 (C-2''), 117.92 (C-2'), 117.84

(Allyl=CH₂), 117.81 (C-7'), 115.79 (C-9a'), 115.58 (C-8a'), 110.35 (C-5'), 110.19 (C-4'), 82.03 (C-1), 70.41 (d, ¹J_{CHP,P} = 163.0 Hz, CHP), 67.54 + 67.49 + 67.24 + 67.18 (4 d, 4 x ²J_{CH₂,P} = 7.0 Hz, Allyl-CH₂), 54.91 (Phe-CH), 39.05 (NHCH₂CH₂CH₂), 39.01 (Pv-C(CH₃)₃), 38.48 (Phe-CH₂), 33.67 (NHCH₂CH₂CH₂), 26.88 + 26.86 (Pv-CH₃), 24.18 (NHCH₂CH₂CH₂) ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, CHCl₃-d₁): δ = 22.71 + 22.69 (2 s, PO₃) ppm.

Pentatrium Cytidin-5'-yl-[(R/S)-3-((2S)-3-(4-benzoylphenyl)-2-(fluoresceinyl-6-carboxamido)propanamido)phenyl]-phosphonomethyl]-phosphat L-27



Die Umsetzung des α -Hydroxymethylphosphonats L-26 (78.4 mg, 0.0739 mmol) und **1** (84.4 mg, 0.148 mmol, 2.0 Äq.) mit 5-Benzylthio-1*H*-tetrazol (31.3 mg, 0.163 mmol, 2.2 Äq.) für 5 h und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 26.9 μ l, 0.148 mmol, 2.0 Äq.) für 2 h gemäß der AAV1 (MPLC: Büchi 75 x 40 mm Kartusche, Kieselgel 0.040–0.063, EE/MeOH-Gradient: [B] = 0–10%) ergab einen blass gelben Feststoff (76.4 mg, 0.0491 mmol), der entsprechend der AAV5 in 2 mL MeOH mit Pd(PPh₃)₄ (7.5 mg, 0.0066 mmol, 0.15 Äq.) und K₂CO₃ (36.8 mg, 0.266 mmol, 6.0 Äq.) für 3 h entschützt wurde. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule A, H₂O + 0.1% TFA/ACN + 0.1% TFA, Gradient: [B] = 5–42% in 41 min, Fluss 20 ml/min, *t*_R = 37.2 min) ergab L-27 als intensiv orange gefärbtes Lyophilisat.

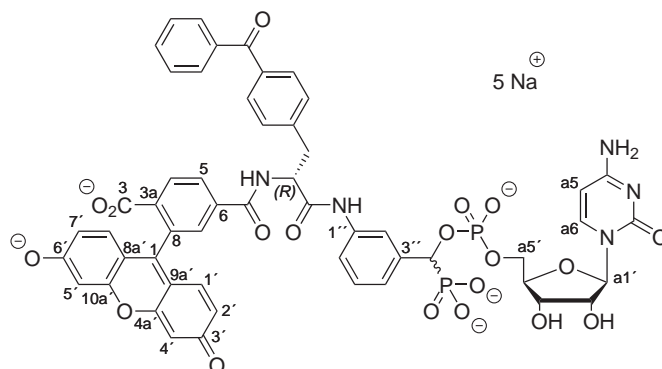
Ausbeute: 51.1 mg, 0.0416 mmol (56%), C₅₃H₄₀N₅Na₅O₁₉P₂, 1227.80 g/mol

HRMS (ESI-TOF): *m/z* [M-5Na+4H]⁻ ber.: 1116.2111, gef.: 1116.2095; Δ = 1.43 ppm

¹H-NMR (600 MHz, D₂O-d₂, 340 K, presat): δ = 7.99 (bd, 1H, ³J_{5,4} = 8.0 Hz, H-5), 7.92–7.32 (m, 15H, H-4, H-a6, Phe, Bz, Ph), 7.05–6.51 (m, 7H, Xanthen, H-7), 6.06–5.76 (m, 2H, H-a5, H-a1'), 5.38–5.21 (m, 1H, CHP), 5.19–5.08 (m, 1H, Phe-CH), 4.10–3.78 (m, 5H, a2', a3', a4', a5a', a5b'), 3.60–3.49 (m, 1H, Phe-CH₂-b), 3.19–2.98 (m, 1H, Phe-CH₂-a) ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, $\text{D}_2\text{O}-d_2$, 340 K): $\delta = 14.98\text{--}13.74$ (m, PO_3), 2.38–0.97 (m, PO_4) ppm.

Pentatrium Cytidin-5'-yl-[(*R/S*)-(3-((2*R*)-3-(4-benzoylphenyl)-2-(fluoresceinyl-6-carboxamido)propanamido)phenyl)-phosphonomethyl]-phosphat D-27



Die Umsetzung des α -Hydroxymethylphosphonats **D-26** (83.7 mg, 0.0789 mmol) und **1** (90.4 mg, 0.158 mmol, 2.0 Äq.) mit 5-Benzylthio-1*H*-tetrazol (33.4 mg, 0.174 mmol, 2.2 Äq.) über Nacht (24 h) und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 29.0 μl , 0.158 mmol, 2.0 Äq.) für 2 h gemäß der **AAV1** (Kieselgel 0.040–0.063, EE/MeOH-Gradient: [B] = 0–10%) ergab einen blass gelben Feststoff (57.1 mg, 0.0369 mmol), der entsprechend der **AAV5** in 3 mL MeOH mit $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (9.0 mg, 0.0078 mmol, 0.2 Äq.) und K_2CO_3 (30.0 mg, 0.221 mmol, 6.0 Äq.) für 4 h entschützt wurde. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule A, H_2O + 0.1% TFA/MeOH + 0.1% TFA, Gradient: [B] = 15–64% in 35 min, Fluss 30 ml/min, $t_{\text{R}} = 32.7$ min) ergab **L-27** als intensiv orange gefärbtes Lyophilisat.

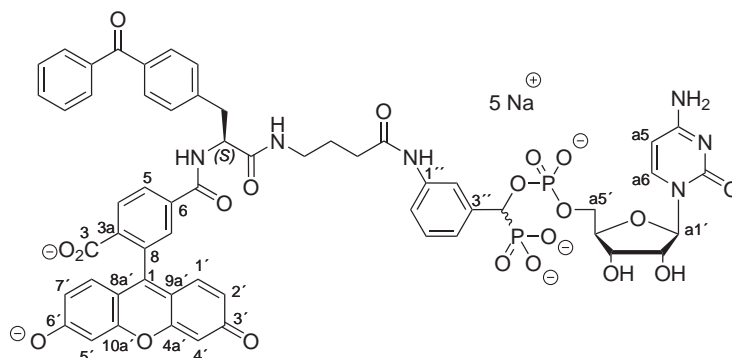
Ausbeute: 13.3 mg, 0.0108 mmol (14%), $\text{C}_{53}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{Na}_5\text{O}_{19}\text{P}_2$, 1227.80 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z [M-5Na+4H] $^+$ ber.: 1116.2111, gef.: 1116.2089; $\Delta = 1.97$ ppm

^1H -NMR (600 MHz, $\text{D}_2\text{O}-d_2$, 330 K, presat): $\delta = 7.98$ (bd, 1H, $^3J_{5,4} = 8.0$ Hz, H-5), 7.90–7.13 (m, 15H, H-4, H-a6, Phe, Bz, Ph), 7.13–6.45 (m, 7H, Xanthen, H-7), 6.03 + 5.94 (2 d, 1H, 2 x $^3J_{a5,a6} = 7.6$ Hz, H-a5), 5.85–5.68 (m, 1H, H-a1'), 5.35–5.20 (m, 1H, CHP), 5.20–5.06 (m, 1H, Phe-CH), 4.05–3.74 (m, 5H, a2', a3', a4', a5a', a5b'), 3.62–3.43 (m, 1H, Phe-CH₂-b), 3.19–2.80 (m, 1H, Phe-CH₂-a) ppm.

^{31}P -NMR (122 MHz, $\text{D}_2\text{O}-d_2$, 330 K): $\delta = 15.30\text{--}13.45$ (m, PO_3), 2.47–0.84 (m, PO_4) ppm.

Pentatrium Cytidin-5'-yl-[(*R/S*)-(3-(((2*S*)-3-(4-benzoylphenyl)-2-(fluoresceinyloxy)-6-carboxamido)propanamido)butanamido)phenyl]-phosphonomethyl]-phosphat L-27-GABA



Die Umsetzung des α -Hydroxymethylphosphonats **L-26-GABA** (102.8 mg, 0.090 mmol) und **1** (104.2 mg, 0.183 mmol, 2.0 Äq.) mit 5-Benzylthio-1*H*-tetrazol (38.0 mg, 0.197 mmol, 2.2 Äq.) über Nacht (24 h) und mit *t*-Butylhydroperoxid (5.5 M, 32.6 μ l, 0.179 mmol, 2.0 Äq.) für 3 h gemäß der **AAV1** (Kieselgel 0.040–0.063, EE/MeOH-Gradient: [B] = 0–20 %) ergab einen blass gelben Feststoff (116.4 mg, 0.071 mmol), der entsprechend der **AAV5** in 3.5 mL MeOH mit Pd(PPh₃)₄ (9.0 mg, 0.0150 mmol, 0.2 Äq.) und K₂CO₃ (59.7 mg, 0.428 mmol, 6.0 Äq.) für 4 h entschützt wurde. Die Aufarbeitung und Reinigung (RP-18, Säule A, H₂O + 0.1 % TFA/MeOH + 0.1 % TFA, Gradient: [B] = 30–65 % in 22 min, Fluss 30 ml/min, t_R = 19.6 min) ergab **L-27-GABA** als intensiv orange gefärbtes Lyophilisat.

Ausbeute: 35.3 mg, 0.0269 mmol (30 %), C₅₃H₄₀N₅Na₅O₁₉P₂, 1312.91 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z [M-5Na+4H]⁻ ber.: 1201.2639, gef.: 1201.2592; Δ = 3.91 ppm

¹H-NMR (600 MHz, H₂O-*d*₂, 315 K, presat): δ = 7.88 (d, 1H, ³ $J_{4,5}$ = 8.0 Hz, H-4), 7.86 (dd, 1H, ³ $J_{5,4}$ = 8.2 Hz, ⁴ $J_{5,7}$ = 1.3 Hz, H-5), 7.62 + 7.51 (2 d, 1H, 2 x ³ $J_{a6,a5}$ = 7.6 Hz, H-a6), 7.43–7.38 (m, 2H, H-2'', Bz-*p*), 7.34–7.21 (m, 3H, H-4'', H-5'', H-6''), 7.19–7.11 (m, 8H, Phe2/3/5/6, Bz-*o/m*), 6.96 (bs, 1H, H-7), 6.95 + 6.94 (2 d, 1H, 2 x ³ $J_{1'/8',2'/7'}$ = 9.2 Hz, H-1'/H-8'), 6.88 (d, 1H, ³ $J_{1'/8',2'/7'}$ = 9.3 Hz, H-1'/H-8'), 6.57 + 6.56 (2 dd, 1H, 2 x ³ $J_{2'/7',1'/8'}$ = 9.2 Hz, ⁴ $J_{2'/7',4'/5'}$ = 2.8 Hz, H-2'/H7'), 6.48–6.45 (m, 2H, H-2'/H7', H-4'/H-5'), 6.42 + 6.42 (2 d, 1H, 2 x ⁴ $J_{4'/5',2'/7'}$ = 2.0 Hz, H-4'/H-5'), 5.94 + 5.90 (2 d, 1H, ³ $J_{a5,a6}$ = 7.6 Hz, H-a5), 5.75 + 5.69 (2 d, 1H, ³ $J_{a1',a2'}$ = 4.6 Hz, ³ $J_{a1',a2'}$ = 3.8 Hz, H-a1'), 5.18 + 5.17 (2 dd, 1H, ² J_{CHP,PO_3} = 13.6 Hz, ³ J_{CHP,PO_4} = 10.2 Hz, CHP), 4.82 + 4.80 (2 t, 1H, ³ $J_{Phe-CH,Phe-CH_2}$ = 5.3 Hz, Phe-CH), 3.95–3.87 (m, 2H, H-a4', H-a5b'), 3.87 (dd, 0.5H, ³ $J_{a2',a3'}$ = 4.8 Hz, ³ $J_{a2',a1'}$ = 4.8 Hz, H-a2'),

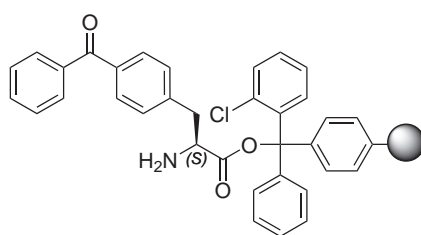
3.83 (dd, 0.5H, $^3J_{a3',a2'} = 5.3$ Hz, $^3J_{a3',a4'} = 5.3$ Hz, H-a3'), 3.79 (dd, 0.5H, $^3J_{a2',a3'} = 4.7$ Hz, $^3J_{a2',a1'} = 4.2$ Hz, H-a2'), 3.75 (ddd, 1H, $^2J_{a5a',a5b'} = 11.7$ Hz, $^3J_{a5a',PO_4} = 4.3$ Hz, $^3J_{a5a',a4'} = 2.8$ Hz, H-a5a'), 3.62 (dd, 0.5H, $^3J_{a3',a2'} = 5.1$ Hz, $^3J_{a3',a4'} = 5.1$ Hz, H-a3'), 3.30–3.20 (m, 3H, Phe-CH₂-b, NHCH₂CH₂CH₂), 2.95–2.87 (m, 1H, Phe-CH₂-a), 7.60 (q, 2H, $^3J_{CH_2,CH_2} = 7.6$ Hz, NHCH₂CH₂CH₂), 1.79 (sext, 2H, $^3J_{CH_2,CH_2} = 7.2$ Hz, NHCH₂CH₂CH₂) ppm.

HMQC (¹H: 300 Mhz; ¹³C: 76 MHz, H₂O-*d*₂): $\delta = 140.9$ (C-a6), 132.9 (Bz-*p*), 130.9 (C-1'/C-8'), 129.0 (Bz-*m*), 129.5 (Bz-*o*), 128.5 (Phe-C3/5), 128.5 (Phe-C2/6), 128.5 (C-7), 128.5 (C-5'), 128.5 (C-5), 128.5 (C-4), 124.2 (C-4'), 120.9 (C-2'/C-7'), 120.6 (C-6'), 120.1 (C-2'), 103.1 (C-4'/C-5'), 95.9 (C-a5), 88.8 (C-a1'), 82.4 (C-a4'), 73.5 (d, $^1J_{CHP,PO_3} = 163$ Hz, CHP), 73.9 (C-a2'), 68.8 (C-a3'), 63.9 (C-a5'), 55.1 (Phe-CH), 38.5 (NHCH₂CH₂CH₂), 36.8 (Phe-CH₂), 33.4 (NHCH₂CH₂CH₂), 24.4 (NHCH₂CH₂CH₂) ppm.

HMBC (¹H: 300 Mhz; ¹³C: 76 MHz, H₂O-*d*₂): $\delta = 198.2$ (Ph(CO)Ph), 174.9 (C-3'/C-6'), 173.9 (Ph-NHCO), 172.8 (C-3), 172.4 (CHCONH), 169.1 (Flu-CO), 165.1 (C-a4), 157.2 (C-4a'/C-10a'), 156.4 (C-a2), 155.7 (C-1), 142.4 (Phe-C1), 142.3 (C-3a), 138.2 (C-3'), 136.5 (Bz-C1), 136.6 (C-1'), 135.5 (Phe-C4), 134.2 (C-6 oder C-8), 131.5 (C-6 oder C-8), 114.0 (C-8a'/C-9a') ppm.

³¹P-NMR (122 MHz, H₂O-*d*₂): $\delta = 14.40$ (d, $^3J_{P,P} = 33.2$ Hz, PO₃), 1.58 + 1.30 (2 d, $^3J_{P,P} = 34.0$ Hz und 33.6 Hz, PO₄) ppm.

Fmoc-L-Bpa-beladenes 2-Chlortritylharz 28

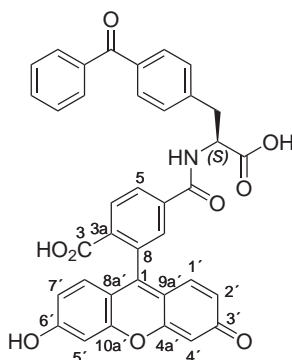


In einem ausgeheizten Schlenkrohr wurden unter Stickstoffatmosphäre 2-Chlortritylchloridharz (251.7 mg; 100-200 mesh, 1% DVB, 1.3 mmol/g) und Fmoc-L-Bpa-OH (484.1 mg, 0.985 mmol, 3 Äq.) in 5 mL trockenem DCM aufgenommen und Diisopropylethylamin (0.36 mL, 2.07 mmol, 6.3 Äq.) zugegeben. Nach 3.5 h Kupplungsreaktion wurden 0.44 mL MeOH zum Blockieren verbliebener Tritylchloridfunktionalitäten zugegeben. Nach 45 min wurde es gewaschen (jeweils 3–5 mL: 3 x DCM, 3 x THF, 6x DMF, 3 x THF, 3 x DCM) und im Feinvakuum getrocknet. Die Fmoc-Bestimmung ergab eine

Beladung des Harzes **28** von 0.706 mmol/g.

Ausbeute: 387.4 mg, 0.706 mmol/g (93 % Beladung)

Trinatrium 6-[(1*S*)-(2-(4-Benzoylphenyl)-1-carboxyethylcarbamoyl)]-fluorescein L-29



Die Fmoc-Schutzgruppe des Harzes **28** (197.0 mg, 0.706 mmol/g, 0.139 mmol) wurde mit 3 mL Piperidin/DMF 20:80 in 30 min abgespalten. Nach Waschen des Harzes (mehrfach mit DCM und zuletzt DMF) wurde dieses in 2 mL DMF aufgenommen und 6-Carboxy-di-*O*-pivaloylfluorescein (**2-(6)**) (207.3 mg, 0.381 mmol, 2.7 Äq.) sowie HOBT (59.7 mg, 0.390 mmol, 2.8 Äq.) zugegeben. Die Kupplungsreaktion wurde durch die Zugabe von *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (66 μ L, 0.424 mmol, 3 Äq.) gestartet. Nach Reaktion über Nacht (16 h) wurde die Reaktionslösung entfernt und das Harz gewaschen (jeweils 3–5 mL: 3 x DMF, 3 x DCM, 3 x MeOH, 3 x DCM, 6 x THF, 3 x DMF, 6 x DCM) und anschließend im Vakuum getrocknet. Die Schutzgruppenabspaltung erfolgte mit NaOMe (0.05 M, DCM/MeOH 90:10, 2.5 mL) für 30 min. Nach Waschen des Harzes (5 x DCM, 3 x THF, 6 x DCM) wurde das Produkt mit 5 x 2 mL 5 % TFA in DCM (2, 5, 10, 30 und 30 min) vom Harz abgespalten. HPLC-Reinigung (RP-18, Säule A, H₂O + 0.1 % TFA/MeOH + 0.1 % TFA, [B] = 60 %, Fluss 30 ml/min, t_R = 4.8 min) und Lyophilisation aus *t*-Butanol ergab L-**29** als gelbes Pulver.

Ausbeute: 45.5 mg, 0.0724 mmol (52 %), C₃₇H₂₅NO₉, 627.60 g/mol

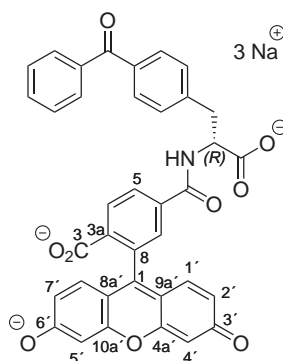
HRMS (ESI-TOF): m/z [M-H]⁻ ber.: 626.1457, gef.: 626.1442; Δ = 2.40 ppm

¹H-NMR (300 MHz, CH₃OH-*d*₄): δ = 7.73 (d, 1H, ³*J*_{4,5} = 8.0 Hz, H-4), 7.81 (bd, 1H, ³_{5,4} = 8.1 Hz, H-5), 7.62 (t, 1H, ³*J*_{Bz-p,Bz-m} = 8.6 Hz, Bz-*p*), 7.60 (d, 2H, ³_{Bz-o,Bz-m} = 7.7 Hz, Bz-*o*), 7.51 (d, 2H, ³*J*_{Phe-2/6,Phe-3/5} = 8.0 Hz, Phe-2/6), 7.44 (dd, 2H, ³_{Bz-m,Bz-o} = 8.0 Hz, ³_{Bz-m,Bz-p} = 8.0 Hz, Bz-*m*), 7.44 (bs, 1H, H7), 7.34 (d, 2H, ³*J*_{Phe-3/5,Phe-2/6} = 8.0 Hz, Phe-3/5), 6.73 + 6.72 (2 d, 2H, 2 x ³*J*_{4'/5',2'/7'} = 2.1 Hz, H-4'/H-5'), 6.65 + 6.64

(2 d, 2H, $2 \times {}^4J_{1'/8',2'/7'} = 8.7$ Hz, H-1'/H-8'), 6.59 + 6.56 (2 dd, 2H, ${}^3J_{2'/7',1'/8'} = 8.6$ Hz, ${}^4J_{2'/7',4'/5'} = 2.1$ Hz, H-2'/H-7'), 4.91 (dd, 1H, ${}^3J_{\text{CH},\text{CH}_2\text{-a}} = 10.1$ Hz, ${}^3J_{\text{CH},\text{CH}_2\text{-b}} = 4.9$ Hz, Phe-CH), 3.40 (dd, 1H, ${}^2J_{\text{CH}_2\text{-b},\text{CH}_2\text{-a}} = 13.9$ Hz, ${}^3J_{\text{CH}_2\text{-b},\text{CH}} = 4.9$ Hz, Phe-CH₂-b), 3.11 (dd, 1H, ${}^2J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{-b}} = 13.6$ Hz, ${}^3J_{\text{CH}_2\text{-a},\text{CH}} = 10.4$ Hz, Phe-CH₂-a) ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, CH₃OH-*d*₄): $\delta = 198.8$ Ph(CO)Ph), 174.4 (COOH), 170.4 (C-3), 168.5 (Flu-CO), 162.6 (C-3'/C-6'), 154.7 (C-1, C-4a'/C-10a'), 151.6 (C-3a), 144.0 (Phe-C1), 141.5 (C-6 oder C-8), 138.4 (Bz-C1), 137.1 (Phe-C4), 134.0 (Bz-*p*), 131.1 (Phe-C3/5), 130.9 (Bz-*o*), 130.8 (C-6 oder C-8), 130.5 (C-1'/C-8'), 130.4 (Phe-C2/6), 130.3 C-5), 129.5 (Bz-*m*), 127.2 (C-4), 124.9 (C-7), 114.7 (C-2'/C-7'), 111.6 (C-8a'/C-9a'), 103.7 (C-4'/C-5'), 55.2 (Phe-CH), 38.0 (Phe-CH₂) ppm.

6-[(1*S*)-(2-(4-Benzoylphenyl)-1-carboxyethylcarbamoyl)]-fluorescein D-29



Verbindung D-25 (10.2 mg, 0.0126 mmol) wurde in 1 mL MeOH gelöst und K₂CO₃ (8.0 mg, 0.0579 mmol, 5 Äq.) zugegeben und nach 3 h Rühren das Lösungsmittel i.V. entfernt. Der Rückstand wurde in H₂O aufgenommen und durch Gelfiltration (Sephadex G-25M) entsalzt. Chromatographische Reinigung über RP-18 Kieselgel (H₂O/MeOH, 90:10 -> 70:30) ergab D-29 als intensiv rot gefärbten Feststoff.

Ausbeute: 6.9 mg, 0.0099 mmol (79 %), C₃₇H₂₂NNa₃O₉, 693.54.60 g/mol

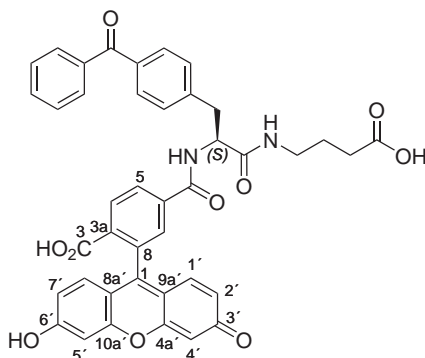
HRMS (ESI-TOF): m/z [M-H]⁻ ber.: 626.1457, gef.: 626.1429; $\Delta = 4.47$ ppm

¹H-NMR (300 MHz, H₂O-*d*₂): $\delta = 7.81$ (d, 1H, ${}^3J_{4,5} = 8.1$ Hz, H-4), 7.78 (dd, 1H, ${}^3J_{5,4} = 8.2$ Hz, ${}^4J_{5,7} = 1.4$ Hz, H-5), 7.79 (m, 1H, H-4, H-5), 7.48 (t, 1H, ${}^3J_{\text{Bz-p},\text{Bz-m}} = 7.3$ Hz, Bz-*p*), 7.25 (d, 2H, ${}^3J_{\text{Phe-2/6},\text{Phe-3/5}} = 7.9$ Hz, Phe-2/6), 7.23 (d, 2H, ${}^3J_{\text{Bz-o},\text{Bz-m}} = 7.3$ Hz, Bz-*o*), 7.16 (dd, 2H, ${}^3J_{\text{Bz-m},\text{Bz-o}} = 7.7$ Hz, ${}^3J_{\text{Bz-m},\text{Bz-p}} = 7.7$ Hz, Bz-*m*), 7.11 (d, 2H, ${}^3J_{\text{Phe-3/5},\text{Phe-2/6}} = 8.0$ Hz, Phe-3/5), 7.02 + 6.89 (2 d, 2H, $2 \times {}^4J_{1'/8',2'/7'} = 9.3$ Hz, H-1'/H-8'), 6.63 + 6.42 (2 dd, 2H, ${}^3J_{2'/7',1'/8'} = 9.2$ Hz, ${}^4J_{2'/7',4'/5'} = 2.1$ Hz,

H-2'/H-7'), 6.64 + 6.23 (2 d, 2H, $2 \times {}^3J_{4'/5',2'/7'} = 2.3$ Hz, H-4'/H-5'), 6.24 (s, 1H, H7), 4.71 (m, 1H, Phe-CH), 3.49 (dd, 1H, ${}^2J_{\text{CH}_2\text{-b,CH}_2\text{-a}} = 13.5$ Hz, ${}^3J_{\text{CH}_2\text{-b,CH}} = 5.0$ Hz, Phe-CH₂-b), 2.94 (dd, 1H, ${}^2J_{\text{CH}_2\text{-a,CH}_2\text{-b}} = 13.4$ Hz, ${}^3J_{\text{CH}_2\text{-a,CH}} = 11.2$ Hz, Phe-CH₂-a), ppm.

¹³C-NMR (76 MHz, H₂O-*d*₂): $\delta = 201.2$ (Ph(CO)Ph), 180.6 (C-3'/C-6'), 179.0 + 175.2 (C-3, COOH), 171.6 (Flu-CO), 159.6 (C-1), 159.5 + 158.5 (C-4a'/C-10a'), 145.1 (Phe-C1), 143.2 (C-3a), 137.1 (C-6 oder C-8), 136.6 (Bz-C1), 136.2 (Phe-C4), 134.9 (Bz-*p*), 132.9 (C-6 oder C-8), 132.3 (C-1'/C-8'), 131.4 (Phe-C3/5), 131.4 (Bz-*o*), 130.7 (Phe-C2/6), 129.6 (C-4, C-5, C-7, Bz-*m*), 124.2 + 123.9 (C-2'/C-7'), 113.85 (C-8a'/C-9a'), 105.0 + 104.8 (C-4'/C-5'), 57.5 (Phe-CH), 39.3 (Phe-CH₂) ppm.

6-[(2*S*)-3-(3-(4-Benzoylphenyl)-1-(3-carboxypropylamino)-1-oxopropan-2-yl-carbamoyl)]-fluorescein L-29-GABA



Mit 3 mL Piperidin/DMF 20:80 wurde innerhalb von 30 min die Fmoc-Schutzgruppe vom Harz **26** (200.0 mg, 0.877 mmol/g, 0.176 mmol) abgespalten und dieses anschließend gewaschen (mehrfach mit DCM und zuletzt DMF). Nach Trocknen des Harzes i.V. wurde es in 2.5 mL DMF aufgenommen und Fmoc-L-Bpa-OH (260.3 mg, 0.527 mmol, 3 Äq.), HOBT (84.5 mg, 0.553 mmol, 3.2 Äq.) und zuletzt *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (80 μ L, 0.0.527 mmol, 3 Äq.) zugegeben und über Nacht kräftig geschüttelt (16 h). Die Reaktionslösung wurde entfernt, das Harz gewaschen (jeweils 3–5 mL: 3 x DMF, 3 x DCM, 3 x MeOH, 3 x DCM, 6 x THF, 3 x DMF, 6 x DCM) und mit 3 mL Piperidin/DMF 20:80 für 40 min die Fmoc-Gruppe abgespalten. Nach Trocknen i.V. wurden 6-Carboxy-di-*O*-pivaloylfluorescein (**2-(6)**) (287.1 mg, 0.527 mmol, 3 Äq.), HOBT (83.2 mg, 0.527 mmol, 3 Äq.) und zuletzt *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (80 μ L, 0.0.527 mmol, 3 Äq.) zugegeben und für 2 h kräftig geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde entfernt und das Harz gewaschen (mehrfach DCM, MeOH, THF und DMF). Mit NaOMe

in einer Mischung aus DCM und MeOH (0.05 M, DCM/MeOH 90:10, 3 mL) wurden innerhalb von 30 min die Pivaloylgruppen abgespalten. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit 5 % TFA in DCM (5 x 2 min für 2, 5, 10, 30 und 30 min). HPLC-Reinigung (RP-18, Säule A, H₂O + 0.1 % TFA/MeOH + 0.1 % TFA, [B] = 60 %, Fluss 30 ml/min, t_R = 4.0 min) und Lyophilisation aus *t*-Butanol ergab **L-29-GABA** als gelbes Pulver. Ausbeute: 49.9 mg, 0.0658 mmol (37 %), C₄₁H₃₂N₂O₁₀, 712.70 g/mol

HRMS (ESI-TOF): m/z [M-H]⁻ ber.: 711.1973, gef.: 711.1984; Δ = 1.55 ppm

¹H-NMR (300 MHz, CH₃OH-*d*₄): δ = 8.09 (d, 1H, ³ $J_{4,5}$ = 8.2 Hz, H-4), 8.05 (dd, 1H, ³ $J_{5,4}$ = 8.1 Hz, ⁴ $J_{5,7}$ = 1.1 Hz, H-5), 7.65 (d, 2H, ³ $J_{Bz-o,Bz-m}$ = 8.4 Hz, Bz-*o*), 7.61 (t, 1H, ³ $J_{Bz-p,Bz-m}$ = 8.6 Hz, Bz-*p*), 7.61 (bs, 1H, H7), 7.58 (d, 2H, ³ $J_{Phe-3/5,Phe-2/6}$ = 8.2 Hz, Phe-3/5), 7.46 (dd, 2H, ³ $J_{Bz-m,Bz-o}$ = 7.5 Hz, ³ $J_{Bz-m,Bz-p}$ = 7.5 Hz, Bz-*m*), 7.35 (d, 2H, ³ $J_{Phe-2/6,Phe-3/5}$ = 8.1 Hz, Phe-2/6), 6.75 + 6.74 (2 d, 2H, 2 x ³ $J_{4'/5',2'/7'}$ = 1.7 Hz, H-4'/H-5'), 6.68 (bd, 2H, ⁴ $J_{1'/8',2'/7'}$ = 8.8 Hz, H-1'/H-8'), 6.60 + 6.57 (2 dd, 2H, ³ $J_{2'/7',1'/8'}$ = 7.0 Hz, ⁴ $J_{2'/7',4'/5'}$ = 2.0 Hz, H-2'/H-7'), 4.82 (dd, 1H, ³ J_{CH,CH_2-a} = 8.6 Hz, ³ J_{CH,CH_2-b} = 6.9 Hz, Phe-CH), 3.25 (dd, 1H, ² J_{CH_2-b,CH_2-a} = 13.1 Hz, ³ $J_{CH_2-b,CH}$ = 6.5 Hz, Phe-CH₂-b), 3.20 (dt, 1H, ² $J_{H-b,H-a}$ = 12.7 Hz, ³ J_{H-b,CH_2} = 6.5 Hz, NHCH₂-CH₂CH₂b), 3.11 (dt, 1H, ² $J_{H-a,H-b}$ = 13.5 Hz, ³ J_{H-a,CH_2} = 6.7 Hz, NHCH₂CH₂CH₂b), 3.06 (dd, 1H, ² J_{CH_2a,CH_2-b} = 13.3 Hz, ³ $J_{CH_2-a,CH}$ = 8.6 Hz, Phe-CH₂-a), 2.19 (t, 2H, ³ J_{H,CH_2} = 7.4 Hz, CH₂COOH), 1.68 (pent, 2H, ³ J_{H,CH_2} = 7.1 Hz, CH₂CH₂CH₂) ppm

¹³C-NMR (76 MHz, CH₃OH-*d*₄): δ = 198.2 (Ph(CO)Ph), 176.8 (COOH), 173.0 (Phe-CONH), 170.0 (C-3), 168.1 (Flu-CO), 163.1 (C-3'/C-6'), 159.6 (C-1, C-4a'/C-10a'), 151.4 (C-3a), 143.8 (Phe-C1), 141.4 (C-6 oder C-8), 138.7 (Bz-C1), 137.3 (Phe-C4), 133.7 (Bz-*p*), 131.2 (Phe-C3/5), 131.1 (C-6 oder C-8), 130.9 (Bz-*o*), 132.3 (C-1'/C-8'), 129.6 (C-4, C-5), 130.8 (Phe-C2/6), 129.4 (Bz-*m*), 125.2 (C-7), 114.8 (C-2'/C-7'), 111.8 (C-8a'/C-9a'), 103.6 (C-4'/C-5'), 56.6 (Phe-CH), 39.8 (CH₂CH₂CH₂COOH), 38.9 (Phe-CH₂), 32.0 (CH₂CH₂CH₂COOH), 25.6 (CH₂CH₂CH₂COOH) ppm.

10. Fluoreszenzpolarisationsassays

10.1. Materialien und Methoden

Die Sialyltransferasen rST3Gal II (*Rattus norvegicus*, rekombinant, exprimiert in *S. frugiperda*, ohne Transmembrandomäne, Kat. Nr.: 566227, $c = 19.0 \mu\text{M}$) und hST6Gal I (Human, Recombinant, *S. frugiperda*, ohne Transmembrandomäne, am N-Terminus mit einem His-Tag fusioniert, Kat. Nr.: 566223, $c = 4.9 \mu\text{M}$; Produktion eingestellt) wurden von *Calbiochem* bezogen und wie erhalten (50 mM MES, 250 mM NaCl, 500 μM β -mercaptoethanol, 50 % glycerol, pH 6.0–6.2) eingesetzt. Die Pd2,6ST(N) (*Photobacterium damsela*, rekombinant, exprimiert in *Escherichia coli* BL21 (DE3), Kat. Nr.: S2076) und PmST1 (*Pasteurella multocida*, rekombinant, exprimiert in *Escherichia coli* BL21 (DE3), Kat. Nr.: S1951) wurden als lyophilisiertes Pulver ($\geq 20\%$ Protein, 38–40 % Tris-HCl und 5 % NaCl) von *Sigma-Aldrich* erhalten, in H_2O aufgenommen, aliquotiert, tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentrationen wurden durch Messung der Extinktionen (BioPhotometer plus, *Eppendorf*) bestimmt (Pd2,6ST(N): $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 77365 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; PmST1: $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 53290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Während der Assays wurden die Sialyltransferasen auf Eis gelagert.

Puffer und Reagenzien wurden von *Sigma-Aldrich* bezogen. Für alle Assays, Herstellung der Puffer und der Stammlösungen wurde ultrareines Wasser verwendet (aufbereitet mit einer *Millipore* Milli-Q Biocel A10 Anlage). Alle Assays wurden in Natriumcacodylatpuffer (50 mM, 0.1 % Triton X-100, pH 7.4) durchgeführt.

Stammlösungen der Inhibitoren und der FP-Sonden wurden mit Milli-Q aufbereitetem Wasser hergestellt und bei -20°C gelagert.

Mikrotiterplatten wurden von der Firma *Corning* bezogen. Alle Anisotropiemessungen wurden auf 384-well *Corning* 3676 low volume black round bottom polystyrene

NBSTM (empfohlenes Arbeitsvolumen: 2–20 μ L) Mikrotiterplatten durchgeführt.

Anisotropiemessungen wurden mit einem Sapphire2 (*Tecan*) bei einer Temperatur von 28 °C durchgeführt. Die Anisotropien wurden mit der Gleichung 5.1 aus den Intensitäten der parallel und senkrecht zur Anregungsachse orientierten Fluoreszenzemissionen berechnet, die totalen Intensitäten entsprechend nach Gleichung 5.2. Von den Intensitäten wurden die einer Leermessung mit Puffer abgezogen. Der G-Faktor wurde mit einer 1 nM Fluoresceinlösung in 0.05 M NaOH auf 27 mP kalibriert. Messparameter: $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm (bw 20 nm), G-Faktor = 1.1548, *Time between move and flash* = 100 ms, Gain = 64, *Number of reads* = 10, Z-position = 13300 μ m.

10.2. FP-Bindungsassays

Zu 2.5 μ L der Sialyltransferasen wurden 1 μ L der FP- oder PAL-Sondenlösungen ($c_{\text{final}} = 10$ nM) zugegeben und die Platte mit Folie versiegelt, zentrifugiert (800 rpm, 1 Minute), geschüttelt (2500 rpm, 15 s), erneut zentrifugiert (800 rpm) und nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur die Anisotropien gemessen. Die Experimente wurden als Mehrfachbestimmungen ausgeführt (rST3Gal II: drei Dreifachbestimmungen; hST6Gal I: zwei Doppelbestimmungen; Pd2,6ST(*N*) und PmST1: drei Doppelbestimmungen).
rST3Gal II: $c = 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0155, 0.0078, 0.0039, 0.0013, 0 \mu\text{M}$
hST6Gal I: $c = 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0155, 0.0078, 0.0039, 0.002, 0.000667, 0 \mu\text{M}$
Pd2,6ST(*N*): $c = 4.0, 1.333, 0.667, 0.333, 0.167, 0.0833, 0.0417, 0.0139, 0.0046, 0 \mu\text{M}$
PmST1: $c = 2.0, 0.5, 0.2, 0.08, 0.32, 0.0128, 0.00512, 0.00205, 0.00082, 0 \mu\text{M}$

10.3. FP-Verdrängungsassays

Zu 2.5 μ L der Sialyltransferasen (finale Assaykonzentrationen: $c_{\text{rST3Gal II}} = 23$ nM, $c_{\text{hST6Gal I}} = 10$ nM, $c_{\text{Pd2,6ST(N)}} = 76$ nM, $c_{\text{PmST1}} = 25$ nM) mit den FP-Sonden ($c_{\text{final}} = 10$ nM; für rST3Gal II: (**S**)mG6, hST6Gal I: (**S**)p6, Pd2,6ST(*N*): (**R**)p6, PmST1: (**S**)p6) wurden 1 μ L der Inhibitoren **I**-CDP, **I**-NHAc, **I**-NO₂-lrt und **I**-NO₂-hrt hinzutitriert (Konzentrationen siehe Tabelle 10.1). Die Platten wurden mit Folie versiegelt, zentrifugiert (800 rpm, 1 Minute), geschüttelt (2500 rpm, 15 s), erneut zentrifugiert (800 rpm) und nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur die Anisotropie bei 28 °C gemessen.

Die Experimente wurden als Mehrfachbestimmungen ausgeführt (rST3Gal II und hST6Gal I: drei Dreifachbestimmungen; Pd2,6ST(*N*) und PmST1: drei Doppelbestimmungen).

Tab. 10.1.: Konzentrationen der Inhibitoren bei den FP-Verdrängungsassays

rST3Gal II			hST6Gal I			Pd2,6ST(<i>N</i>)/PmST1		
I-lrt/ hrt	I- NHAc	I-CDP	I-lrt/ hrt	I- NHAc	I-CDP	I-lrt/ hrt	I- NHAc	I-CDP
-	1000	10000	-	1000.0	10000	-	1000.0	1000.0
-	100	1000	32.0	100.0	1000	-	100.0	100.00
	30.000	250.00	16.0	30.0	250.00	30.000		12.50
	10.000	100.00	8.0	10.0	100.00	10.000		3.100
	4.000	50.00		4.000	50.00	4.000		1.500
	2.000	25.00		2.000	25.00	2.000		0.700
	1.000	12.50		1.000	12.50	1.000		0.350
	0.500	6.25		0.500	6.25	0.500		0.175
	0.250	3.10		0.250	3.10	0.250		0.088
	0.125	1.50		0.125	1.50	0.125		0.044
	0.060	0.70		0.060	0.70	0.060		0.022
	0.015	0.25		0.015	0.25	0.015		0.007
	0.002	0.04		0.002	0.04	0.002		0.001
	0	0		0	0	0		0
	μM	μM		μM	μM		μM	μM

10.4. Einfluss von DMSO auf die FP-Verdrängungsassays

Zu 2.5 μL der Sialyltransferasen (finale Assaykonzentrationen: $c_{\text{rST3Gal II}} = 23 \text{ nM}$, $c_{\text{hST6Gal I}} = 10 \text{ nM}$, $c_{\text{Pd2,6ST(N)}} = 76 \text{ nM}$, $c_{\text{PmST1}} = 25 \text{ nM}$) mit den FP-Sonden ($c_{\text{final}} = 10 \text{ nM}$; für rST3Gal II: (**S**)mG6, hST6Gal I: (**S**)p6, Pd2,6ST(*N*): (**R**)p6, PmST1: (**S**)p6) bei einem DMSO-Anteil von 0, 0.25 oder 1.0% wurde 1 μL des Inhibitors **I-NHAc** hinzutitriert (Konzentrationen siehe Tabelle 10.1). Die Experimente wurden als Mehrfachbestimmungen ausgeführt (rST3Gal II und hST6Gal I: drei Dreifachbestimmungen; Pd2,6ST(*N*) und PmST1: drei Doppelbestimmungen).

11. HT-Screening der rST3Gal II

11.1. Materialien und Methoden

Für **Sialyltransferasen**, **Puffer** und **Reagenzien**, **Mikrotiterplatten** und **Anisotropiemessungen** siehe Kapitel 10.1. Der Compoundtransfer erfolgte mit einem Sciclone ALH-3000 (*CaliperLS*) Pipettierroboter. LC- und MS-Analyse erfolgten auf einem *Agilent 6220 ESI-TOF-2* (*Agilent Technologies*) mit Wasser und Methanol (+ 0.1 % Ameisensäure) als Eluenten.

11.2. Primärscreen

11.2.1. EC50-Bestimmung der rST3Gal II Charge

Für das Screening wurden 11 Chargen der rST3Gal II vereinigt und gemäß der Beschreibung für direkte FP-Bindungsassys für die rST3Gal II der EC50-Wert der FP-Sonde (*S*)mG6 kontrolliert.

11.2.2. Screeningprotokoll

11 Chargen der rST3Gal II wurden vereinigt und gemeinsam mit der (*S*)mG6 mit Natriumcacodylatpuffer (50 mM, pH 7.4, 0.1 % Triton X-100) verdünnt, so dass nach dem Compoundtransfer finale Assaykonzentrationen von $c_{\text{rST3Gal II}} = 18 \text{ nM}$ und $c_{(\text{S})\text{mG6}} = 10 \text{ nM}$ erreicht wurden. Je 20 μL der Assaylösung wurden mit einem Dispenser auf die Reihen A-1–P23 einer *Corning 3767* gegeben und die letzte Reihe „von Hand“ mit der Positivkontrolle (finale Assaykonzentration: $c_{(\text{S})\text{mG6}} = 10 \text{ nM}$) befüllt. Von den Mutterplatten wurden je 0.2 μL der Compounds mit dem Sciclone ALH-3000 auf die Assayplatten transferiert (die Reihe 24 beinhaltete reines DMSO) und zur Durchmischung 5 μL wieder aufgesogen und wieder in die Platte zurückgegeben. Die Platten

wurden geschüttelt (900 rpm, 60 s), anschließend zentrifugiert (800 rpm, 60 s) und nach 15 min Inkubation bei RT die Anisotropien bei 28 °C gemessen.

11.2.3. Z'-Faktor Bestimmung

Vor Durchführung des Screens wurde – das Screeningprotokoll befolgend – der Z'-Faktor für eine Assayplatte bestimmt. Dazu wurden mit einem Dispenser die Reihen A1–P12 mit der Assaylösung und „von Hand“ die Reihen A13–P24 mit der Positivkontrolle befüllt. Mit dem Sciclone ALH-3000 wurden je 0.2 µL DMSO in jedes Well transferiert. Der Z'-Faktor wurde nach den Gleichungen 6.2 und 5.13 berechnet.

11.3. Validierung

11.3.1. LC/MS-Qualitätskontrolle

Die selektierten Hit-Compounds wurden mit H₂O/ACN (50:50) auf eine Konzentration von 25 µM verdünnt und gefiltert. Die Bestimmung der Reinheit erfolgte durch Integration des Absorptionschromatogramms (bei 254 nm).

11.3.2. IC50-Validierung

Die Hit-Compounds wurden auf eine 384-well Platte „gepickt“ und von dieser ausgehend eine serielle Verdünnung mit DMSO angefertigt (finale Konzentrationen 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.533, 0.781, 0.391, 0.195, 0.0977 µM). Der Versuchsablauf entspricht dem Screeningprotokoll (Kapitel 11.2.2), wobei eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

12. Photomarkierungsexperimente

12.1. Materialien und Methoden

Sialyltransferasen, Puffer und Reagenzien sind unter Kapitel 10.1 beschrieben.

Mikrosomale Fraktionen mit der hST8Sia II, hST8Sia III oder hST8Sia VI wurden als gefrorene Zentrifugatpellets erhalten und in Lagerpuffer (50 mM Cacodylat, pH 6.8, 500 μ M DTT, 0.1 % Triton X-100) suspendiert, aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Mikrotiterplatten wurden von der Firma *Corning* bezogen (*Corning* 3640: clear flat bottom polystyrene NBSTM, empfohlenes Arbeitsvolumen 20-80 μ L; *Corning* 3711: black clear flat bottom polystyrene, empfohlenes Arbeitsvolumen 20-80 μ L; *Corning* 3540: low volume black clear flat bottom polystyrene, empfohlenes Arbeitsvolumen 5-40 μ L).

Photoreaktor war ein konventioneller Transilluminator (IL-350-M der Firma *Bachofner*), ausgestattet mit UV-A Leuchtstoffröhren ($\lambda_{\max} = 366$ nm).

SDS-Page wurden mit dem CriterionTM-System der Firma *Bio-Rad* (Netzteil: „PowerPac Basic Power Supply“; Laufkammer: „Criterion Cell“) und 4-20 % Tris-HCl Polyacrylamidgele (*Bio-Rad*, CriterionTM #345-0034) durchgeführt. Als Proteingrößenreferenz wurde der vorgefärbte „Precision Plus Protein Dual Color Standards“ von *Bio-Rad* (Kat. Nr.:#161-0374; die Banden bei 75 und 25 kDa sind fluoreszent) verwendet. Der 5 x Ladungspuffer bestand aus 240 mM Tris-HCl, pH 6.8, 40 % Glycerin, 8 % SDS, 20 % β -Mercaptoethanol und 0.04 % Bromphenolblau. Für die Probenerhitzung wurde ein Thermoschüttler (*Eppendorf*) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit Laemmli-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % SDS).

Imaging und Geldokumentation wurden mit einem *Fujifilm* LAS-4000-System durchgeführt. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit einem UV-Transilluminator ($\lambda_{\max} = 312 \text{ nm}$) und die Detektion mit einer gekühlten CCD-Kamera ($-30 \text{ }^\circ\text{C}$) unter Verwendung eines SYBR Green Filter (520 nm) für die Emissionswellenlängenselektion. Die Dokumentation coomassiegefärbter Gele erfolgte mit einem Durchlichteinsatz (weiß).

Quantifizierung der Fluoreszenzbandenintensitäten erfolgte mit der Software Multi-Gauge Ver2.0 (*Fujifilm*). Von den Bandenintensitäten wurde die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert. Für letzteres wurde eine Region in dem Gel gewählt, die keine sichtbaren Banden aufwies.

Coomassiefärbung der Gele erfolgte mit einer kolloidalen CBBG-250 Coomassiefärbung (Roti-Blue, *Carl-Roth* Kat. Nr.: A152).

12.2. Allgemeine Vorschrift

Bestrahlungsreaktion

Die Bestrahlung der Proben erfolgte im Kühlraum bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf 384-well Mikrotiterplatten mit transparentem Boden, die mit Folie versiegelt wurden, in 50 mM Cacodylatpuffer (pH 7.4, 0.1 % Triton X-100). Die Platten wurden auf einem Transilluminator mit UV-A Leuchtstoffröhren ($\lambda_{\max} = 366 \text{ nm}$) so platziert, dass die gefüllten Reihen parallel zu den Leuchtstoffröhren ausgerichtet waren. Nach der Bestrahlungsreaktion wurden die Mikrotiterplatten auf Raumtemperatur erwärmt und das an der Abdeckfolie kondensierte Wasser herunterzentrifugiert (2000 rpm, 1 Minute).

SDS-Page

Die Proben wurden intensiv mit Ladungspuffer (5 x konzentriert) gemischt und in hitzebeständigen 500 μL Eppendorf Mikroreaktionsgefäßen mit einem Thermoschüttler für 5 min auf $95 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Anschließend wurde das Kondenswasser herunterzentrifugiert und die Proben sowie der Proteingrößenmarker auf ein 4-20 % Tris-HCl Polyacrylamidgel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 200 V für 1.25 h.

Fluoreszenzimaging

Die Fluoreszenz in den Gelen wurde direkt nach der SDS-Page mit dem LAS-4000 Imaging-System detektiert. Die Gele wurden vorher kurz durch Wasser geschwenkt, um ihre Oberfläche vom Puffer zu befreien.

Coomassiefärbung der Gele und Gelddokumentation

Die Proteine wurden im Gel fixiert (10 % HOAc, 30 % MeOH und 60 % Wasser) und mit Coomassie kolloidal G-250 (Roti-Blue) über Nacht gefärbt. Nach Waschen der Gele (MeOH/H₂O 25:75 und anschließend mehrmals mit Wasser) wurden sie mit dem LAS-4000 dokumentiert (Verwendung des Durchlichteinsatzes).

12.3. Photomarkierung gereinigter Sialyltransferasen

Die Durchführung der Experimente erfolgte nach den unter „Allgemeine Vorschrift“ (Kapitel 12.2) beschriebenen Methoden. Alle Experimente wurden zweimal als Doppelbestimmung durchgeführt.

**12.3.1. Effizienzen und Ausbeuten der Photomarkierung
(EC₅₀_{PAL})****rST3Gal II und hST6Gal I**

Die rST3Gal II oder hST6Gal I wurden auf einer Corning 3640 Mikrotiterplatte vorgelegt und L-PAL, D-PAL oder GABA-L-PAL hinzutitriert ($V_{\text{final}} = 18 \mu\text{L}$). Die Platte wurde geschüttelt (2500 rpm, 15 s) und nach 15 min Inkubation für 60 min bestrahlt. Zu 15 μL jeder Probe wurden 3.75 μL Ladungspuffer gegeben und 16 μL der Mischung auf das Gel geladen.

rST3Gal II: $c_{\text{rST3Gal II}} = 2.5 \mu\text{M}$, $c_{\text{PAL-Sonden}} = 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 3.0, 20.0 \mu\text{M}$

hST6Gal I: $c_{\text{hST6Gal I}} = 0.4 \mu\text{M}$, $c_{\text{PAL-Sonden}} = 0.2, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0, 20.0 \mu\text{M}$

Pd2,6ST(N) und PmST1

Die Pd2,6ST(N) oder PmST1 wurden auf einer Corning 3540 Mikrotiterplatte vorgelegt und L-PAL, D-PAL oder GABA-L-PAL hinzutitriert ($V_{\text{final}} = 13 \mu\text{L}$). Die Platte wurde geschüttelt (2500 rpm, 15 s) und nach 15 min Inkubation für 120 min bestrahlt.

Zu jeder Probe wurden 3.25 μL Ladungspuffer gegeben und 15 μL der Mischung auf das Gel geladen.

Pd2,6ST(N): $c_{\text{Pd2,6ST(N)}} = 0.125 \mu\text{M}$, $c_{\text{PAL-Sonden}} = 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.8, 2.4 \mu\text{M}$

PmST1: $c_{\text{PmST1}} = 0.34 \mu\text{M}$, $c_{\text{PAL-Sonden}} = 0.015, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 \mu\text{M}$

12.3.2. Affinitätsbasierte Photomarkierung

rST3Gal II und hST6Gal I

Die rST3Gal II oder hST6Gal I wurden auf einer Corning 3640 Mikrotiterplatte vorgelegt und L-PAL, D-PAL, GABA-L-PAL, Flu-L-Bpa, Flu-D-Bpa oder Flu-L-Bpa-GABA zugegeben ($V_{\text{final}} = 18 \mu\text{L}$). Die Platte wurde geschüttelt (2500 rpm, 15 s) und nach 15 min Inkubation für 60 min bestrahlt. Zu 15 μL jeder Probe wurden 3.75 μL Ladungspuffer gegeben und 16 μL der Mischung auf das Gel geladen.

rST3Gal II: $c_{\text{rST3Gal II}} = 2.5 \mu\text{M}$, $c_{\text{PAL/Bpa}} = 1.0 \mu\text{M}$

hST6Gal I: $c_{\text{hST6Gal I}} = 0.4 \mu\text{M}$, $c_{\text{PAL/Bpa}} = 3.0 \mu\text{M}$

Pd2,6ST(N) und PmST1

Die Pd2,6ST(N) und PmST1 wurden auf einer Corning 3640 Mikrotiterplatte vorgelegt und L-PAL, D-PAL, GABA-L-PAL, Flu-L-Bpa, Flu-D-Bpa oder Flu-L-Bpa-GABA zugegeben ($V_{\text{final}} = 13 \mu\text{L}$). Die Platte wurde geschüttelt (2500 rpm, 15 s) und nach 15 min Inkubation für 120 min bestrahlt. Zu jeder Probe wurden 3.25 μL Ladungspuffer gegeben und 15 μL der Mischung auf das Gel geladen.

Pd2,6ST(N): $c_{\text{Pd2,6ST(N)}} = 0.85 \mu\text{M}$, $c_{\text{PAL/Bpa}} = 2.4 \mu\text{M}$

PmST1: $c_{\text{PmST1}} = 0.26 \mu\text{M}$, $c_{\text{PAL/Bpa}} = 1 \mu\text{M}$

12.3.3. Kontrolle mit mG6

Die rST3Gal II oder hST6Gal I wurden auf einer Corning 3640 Mikrotiterplatte vorgelegt und L-PAL oder mG6 zugegeben ($V_{\text{final}} = 20 \mu\text{L}$). Die Platte wurde geschüttelt (2500 rpm, 15 s) und nach 15 min Inkubation für 60 min bestrahlt. Zu 15 μL jeder Probe wurden 3.75 μL Ladungspuffer gegeben und 16 μL der Mischung auf das Gel geladen.

rST3Gal II: $c_{\text{rST3Gal II}} = 2.5 \mu\text{M}$, $c_{\text{L-PAL/mG6}} = 1.0 \mu\text{M}$

hST6Gal I: $c_{\text{hST6Gal I}} = 0.4 \mu\text{M}$, $c_{\text{L-PAL/mG6}} = 3.0 \mu\text{M}$

12.3.4. Photomarkierung unter denaturierenden Bedingungen

rST3Gal II und hST6Gal I

Zu den Sialyltransferasen rST3Gal II und hST6Gal I wurde Harnstoff (finale Assaykonzentration 6 M), SDS (finale Assaykonzentration 1 %) oder Puffer gegeben. Die Proben zur Denaturierung mit SDS und durch Erhitzen wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Lösungen wurden auf eine Corning 3640 Mikrotiterplatte übertragen und **L-PAL** zugegeben ($V_{\text{final}} = 18 \mu\text{L}$). Die Platte wurde geschüttelt (2500 rpm, 15 s) und nach 15 min Inkubation für 60 min bestrahlt. Zu 15 μL jeder Probe wurden 3.75 μL Ladungspuffer gegeben und 16 μL der Mischung auf das Gel geladen.

rST3Gal II: $c_{\text{rST3Gal II}} = 2.5 \mu\text{M}$, $c_{\text{L-PAL}} = 1.0 \mu\text{M}$

hST6Gal I: $c_{\text{hST6Gal I}} = 0.4 \mu\text{M}$, $c_{\text{L-PAL}} = 3.0 \mu\text{M}$

Pd2,6ST(N) und PmST1

Zu den Sialyltransferasen Pd2,6ST(N) oder PmST1 wurde Harnstoff (finale Assaykonzentration 6 M, für PmST1 3.9 μM), SDS (finale Assaykonzentration 1 %) oder Puffer gegeben. Die Proben zur Denaturierung mit SDS und durch Erhitzen wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Lösungen wurden auf eine Corning 3540 Mikrotiterplatte übertragen und **L-PAL** zugegeben ($V_{\text{final}} = 13 \mu\text{L}$). Die Platte wurde geschüttelt (2500 rpm, 15 s) und nach 15 min Inkubation für 120 min bestrahlt. Zu jeder Probe wurden 3.25 μL Ladungspuffer gegeben und 15 μL der Mischung auf das Gel geladen.

Pd2,6ST(N): $c_{\text{Pd2,6ST(N)}} = 0.85 \mu\text{M}$, $c_{\text{L-PAL}} = 2.4 \mu\text{M}$

PmST1: $c_{\text{PmST1}} = 0.333 \mu\text{M}$, $c_{\text{L-PAL}} = 1 \mu\text{M}$

12.3.5. Inhibition der Photomarkierung

rST3Gal II und hST6Gal I

Zu den Sialyltransferasen rST3Gal II und hST6Gal I mit **L-PAL** auf einer Corning 3640 Mikrotiterplatte wurden die Inhibitoren I-NHAc ($c = 2 \text{ mM}$), I-CDP ($c = 2 \text{ mM}$) oder Puffer zugegeben ($V_{\text{final}} = 20 \mu\text{L}$). Die Platte wurde geschüttelt (2500 rpm, 15 s) und nach 15 min Inkubation für 60 min bestrahlt. Zu 15 μL jeder Probe wurden 3.75 μL Ladungspuffer gegeben und 16 μL der Mischung auf das Gel geladen.

rST3Gal II: $c_{\text{rST3Gal II}} = 2.5 \mu\text{M}$, $c_{\text{L-PAL}} = 1.0 \mu\text{M}$

hST6Gal I: $c_{\text{hST6Gal I}} = 0.4 \mu\text{M}$, $c_{\text{L-PAL}} = 3.0 \mu\text{M}$

Pd2,6ST(N) und PmST1

Zu den Sialyltransferasen Pd2,6ST(N) oder PmST1 mit L-PAL auf einer Corning 3640 Mikrotiterplatte wurden die Inhibitoren I-NHAc ($c = 2 \text{ mM}$), I-CDP ($c = 2 \text{ mM}$) oder Puffer zugegeben ($V_{\text{final}} = 13 \text{ }\mu\text{L}$). Die Platte wurde geschüttelt (2500 rpm, 15 s) und nach 15 min Inkubation für 120 min bestrahlt. Zu jeder Probe wurden $3.25 \text{ }\mu\text{L}$ Ladungspuffer gegeben und $15 \text{ }\mu\text{L}$ der Mischung auf das Gel geladen..

Pd2,6ST(N): $c_{\text{Pd2,6ST(N)}} = 0.85 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{\text{L-PAL}} = 2.4 \text{ }\mu\text{M}$

PmST1: $c_{\text{PmST1}} = 0.333 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{\text{L-PAL}} = 1 \text{ }\mu\text{M}$

12.3.6. Zeitabhängigkeit der Photomarkierung**rST3Gal II und hST6Gal I**

Mischungen aus der rST3Gal II und hST6Gal I mit L-PAL wurden auf eine Corning 3711 Mikrotiterplatte gegeben ($V_{\text{final}} = 18 \text{ }\mu\text{L}$) und der Boden mit lichtundurchlässiger Aluminiumklebefolie abgeklebt. Für die Bestrahlungszeiten von 0, 15, 30, 60, 120 und 180 min wurde die Lichtisolierung entsprechend entfernt. Zu $15 \text{ }\mu\text{L}$ jeder Probe wurden $3.75 \text{ }\mu\text{L}$ Ladungspuffer gegeben und $16 \text{ }\mu\text{L}$ der Mischung auf das Gel geladen.

rST3Gal II: $c_{\text{rST3Gal II}} = 2.5 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{\text{L-PAL}} = 4.0 \text{ }\mu\text{M}$

hST6Gal I: $c_{\text{hST6Gal I}} = 0.4 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{\text{L-PAL}} = 3.0 \text{ }\mu\text{M}$

Pd2,6ST(N) und PmST1

Mischungen aus der Pd2,6ST(N) und PmST1 mit L-PAL wurden auf eine Corning 3540 Mikrotiterplatte gegeben ($V_{\text{final}} = 18 \text{ }\mu\text{L}$) und der Boden mit lichtundurchlässiger Aluminiumklebefolie abgeklebt. Für die Bestrahlungszeiten von 0, 15, 30, 60, 120 und 240 min wurde die Lichtisolierung entsprechend entfernt. Zu jeder Probe wurden $3.25 \text{ }\mu\text{L}$ Ladungspuffer gegeben und $15 \text{ }\mu\text{L}$ der Mischung auf das Gel geladen.

Pd2,6ST(N): $c_{\text{Pd2,6ST(N)}} = 0.85 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{\text{L-PAL}} = 2.4 \text{ }\mu\text{M}$

PmST1: $c_{\text{PmST1}} = 0.33 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{\text{L-PAL}} = 1 \text{ }\mu\text{M}$

12.3.7. Detektionsgrenze der Photomarkierung**rST3Gal II und hST6Gal I**

L-PAL wurde auf einer Corning 3640 Mikrotiterplatte vorgelegt und die Enzymlösungen der rST3Gal II und hST6Gal I hinzutitriert ($V_{\text{final}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$). Die Platte wurde

geschüttelt (2500 rpm, 15 s) und nach 15 min Inkubation für 60 min bestrahlt. Zu 15 μL jeder Probe wurden 3.75 μL Ladungspuffer gegeben und 16 μL der Mischung auf das Gel geladen.

rST3Gal II: $c_{\text{L-PAL}} = 1.0 \mu\text{M}$, $c_{\text{rST3Gal II}} = 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 \mu\text{M}$

hST6Gal I: $c_{\text{L-PAL}} = 3.0 \mu\text{M}$, $c_{\text{hST6Gal I}} = 0, 0.469, 0.094, 0.188, 0.375, 0.75 \mu\text{M}$

Pd2,6ST(N) und PmST1

L-PAL wurde auf einer Corning 3540 Mikrotiterplatte vorgelegt und die Enzymlösungen der Pd2,6ST(N) und PmST1 hinzutitriert ($V_{\text{final}} = 13 \mu\text{L}$). Die Platte wurde geschüttelt (2500 rpm, 15 s) und nach 15 min Inkubation für 120 min bestrahlt. Zu jeder Probe wurden 3.25 μL Ladungspuffer gegeben und 15 μL der Mischung auf das Gel geladen.

Pd2,6ST(N): $c_{\text{L-PAL}} = 2.4 \mu\text{M}$, $c_{\text{Pd2,6ST(N)}} = 0.053, 0.106, 0.212, 0.424, 0.847, 1.54 \mu\text{M}$

PmST1: $c_{\text{L-PAL}} = 1 \mu\text{M}$, $c_{\text{PmST1}} = 0.0212, 0.0424, 0.0847, 0.169, 0.339, 0.678 \mu\text{M}$

12.4. Photomarkierung von Sialyltransferasen in einem komplexem Proteom

12.4.1. SDS-Page - Bestimmung der Beladungskapazität

Je 10 μL einer seriellen Verdünnung der hST8Sia II (1.4/4 bis 1.4/2048) und hST8Sia III sowie hST8Sia VI (1/4 bis 1/2048) wurden mit 2.5 μL des Ladungspuffers gemischt und 10 μL auf ein Gel geladen. Die Elektrophorese (Dauer 1.05 h), Coomassiefärbung und Geldokumentation erfolgte wie unter der allgemeinen Vorschrift beschrieben.

12.4.2. Photomarkierung der hST8Sia II, hST8Sia III und hST8Sia VI mit L-PAL

Zu je zwei Verdünnungen der mikrosomalen Fraktionen mit der hST8Sia II, hST8Sia III oder hST8Sia VI wurde L-PAL zugegeben ($V_{\text{final}} = 20 \mu\text{L}$). Die Platte wurde geschüttelt (2500 rpm, 15 s) und nach 30 min Inkubation für 120 min bestrahlt. Zu 15 μL jeder Probe wurden 3.75 μL Ladungspuffer gegeben und 15 μL der Mischung auf das Gel geladen (Elektrophoresedauer: Dauer 1.05 h).

hST8Sia II: 1/16 und 1/64, hST8Sia III: 1/8 und 1/32, hST8Sia VI: 1/8 und 1/64;
 $c_{L-PAL} = 1.0$ oder $10.0 \mu\text{M}$

12.4.3. Spezifität der Photomarkierung von hST8Sia II

Zu einer Verdünnung der mikrosomalen Fraktion mit der hST8Sia II (finale Verdünnung im Assay 1/64) wurde Harnstoff (finale Assaykonzentration 6 M, für PmST1 $3.9 \mu\text{M}$), SDS (finale Assaykonzentration 1 %) oder Pufferlösung gegeben und die SDS-haltige Probe wurde für 5 min auf 95°C erhitzt. Es wurde **L-PAL** (finale Assaykonzentration $1 \mu\text{M}$) zugegeben und zu einer Probe mit Puffer **Flu-L-Bpa** ($V_{\text{final}} = 20 \mu\text{L}$). Die Platte wurde geschüttelt (2500 rpm, 15 s) und nach 30 min Inkubation für 120 min bestrahlt. Zu $15 \mu\text{L}$ jeder Probe wurden $3.75 \mu\text{L}$ Ladungspuffer gegeben und $15 \mu\text{L}$ der Mischung auf das Gel geladen (Elektrophoresedauer: Dauer 1.15 h).

12.4.4. hST8Sia II, hST8Sia III und hST8Sia VI - Kontrolle mit Flu-L/D-Bpa Verbindungen

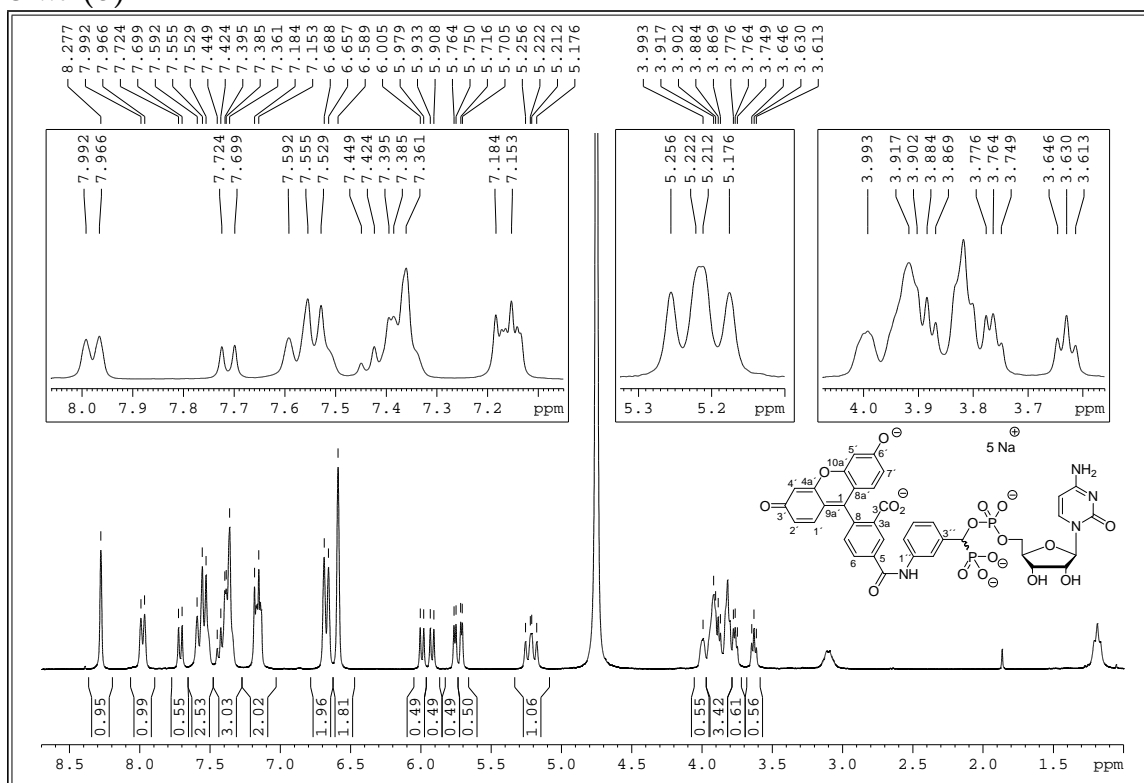
Zu einer Verdünnung der mikrosomalen Fraktionen mit der hST8Sia II, hST8Sia III oder hST8Sia VI (finale Verdünnung im Assay 1/64) wurden **L-PAL**, **D-PAL**, **GABA-L-PAL**, **Flu-L-Bpa**, **Flu-D-Bpa** oder **Flu-L-Bpa-GABA** (finale Assaykonzentration $1 \mu\text{M}$) zugegeben ($V_{\text{final}} = 20 \mu\text{L}$). Die Platte wurde geschüttelt (2500 rpm, 15 s) und nach 30 min Inkubation für 16 h bestrahlt. Zu $15 \mu\text{L}$ jeder Probe wurden $3.75 \mu\text{L}$ Ladungspuffer gegeben und $15 \mu\text{L}$ der Mischung auf das Gel geladen.

A. Anhang

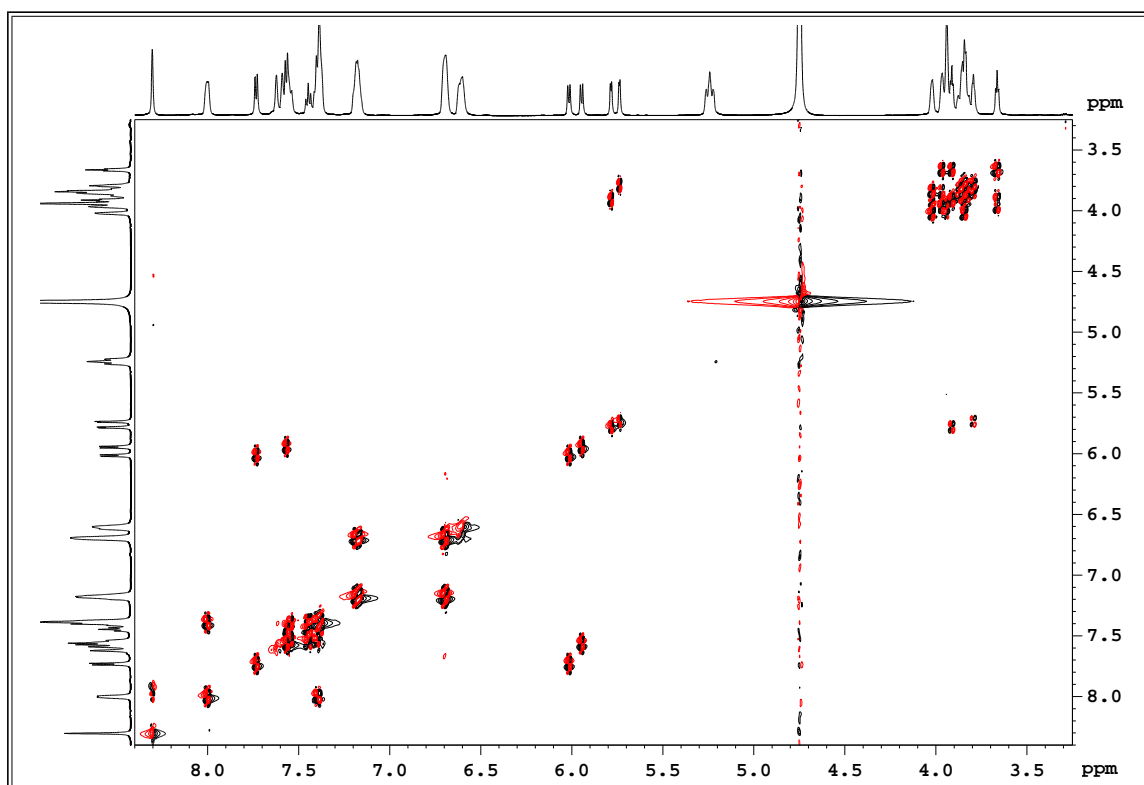
A.1. Spektren

A.1.1. NMR- und MS-Spektren

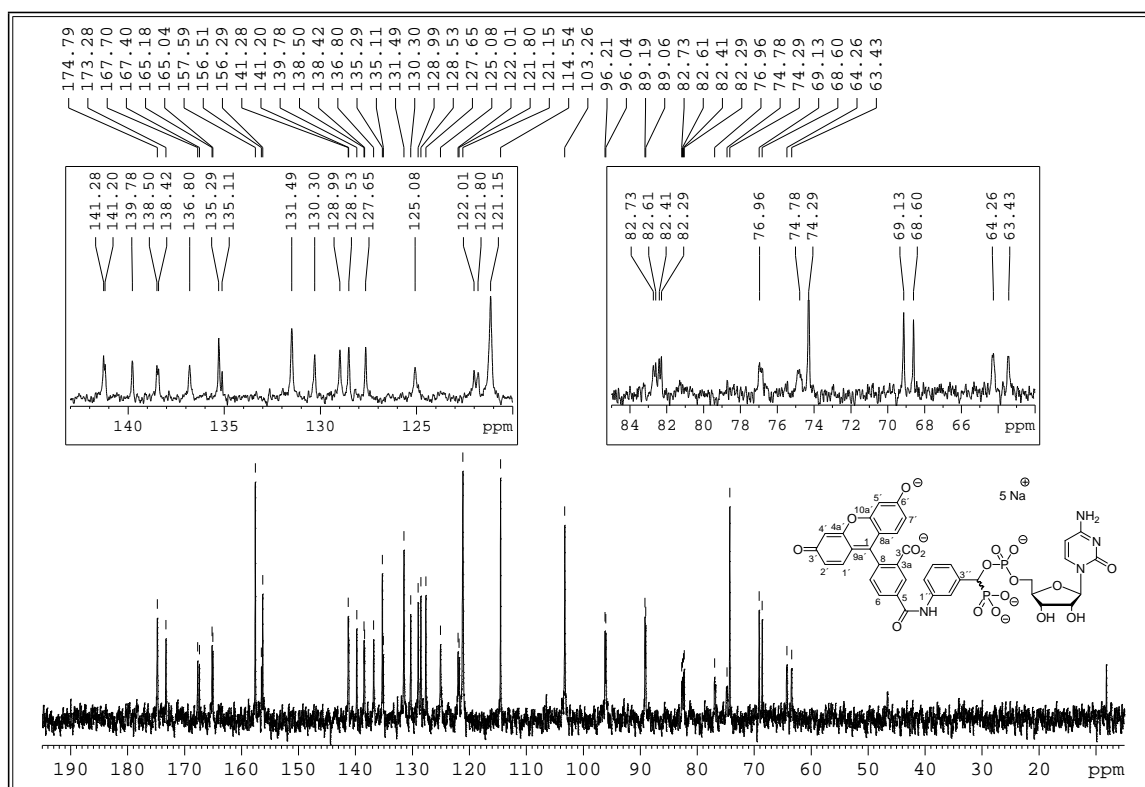
8-m-(5)



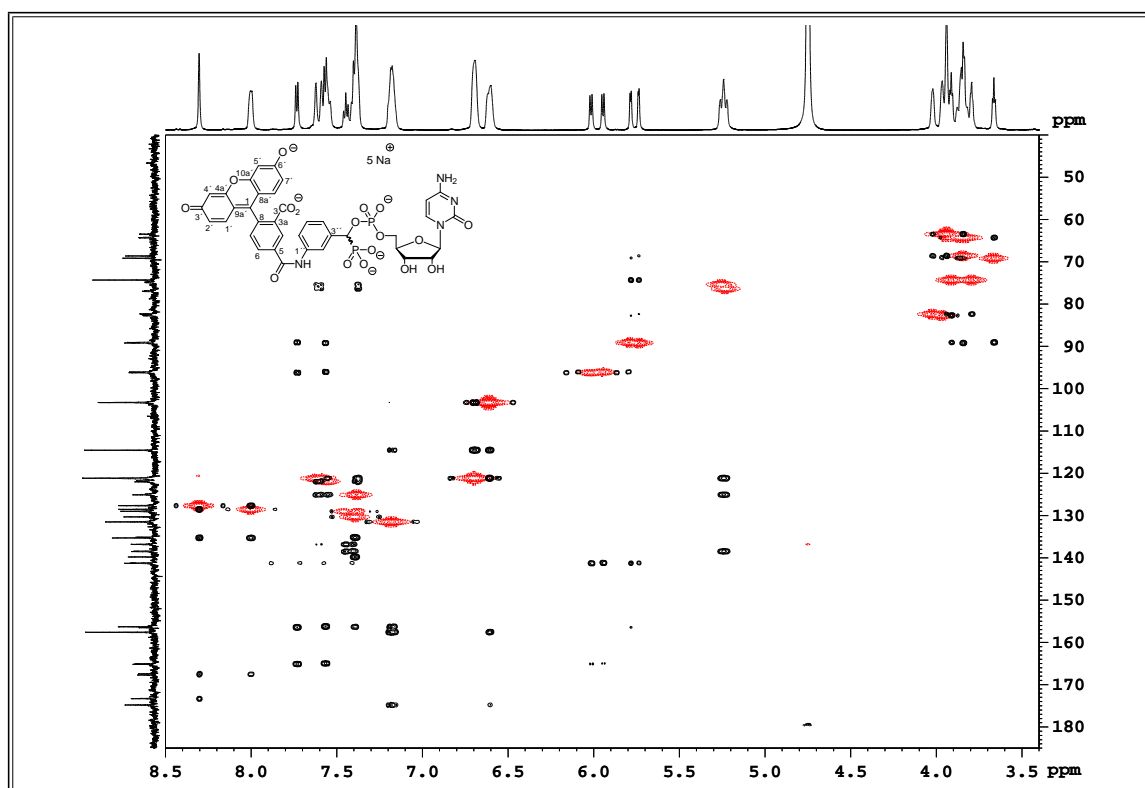
¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 8-m-(5) (300 MHz, D₂O)



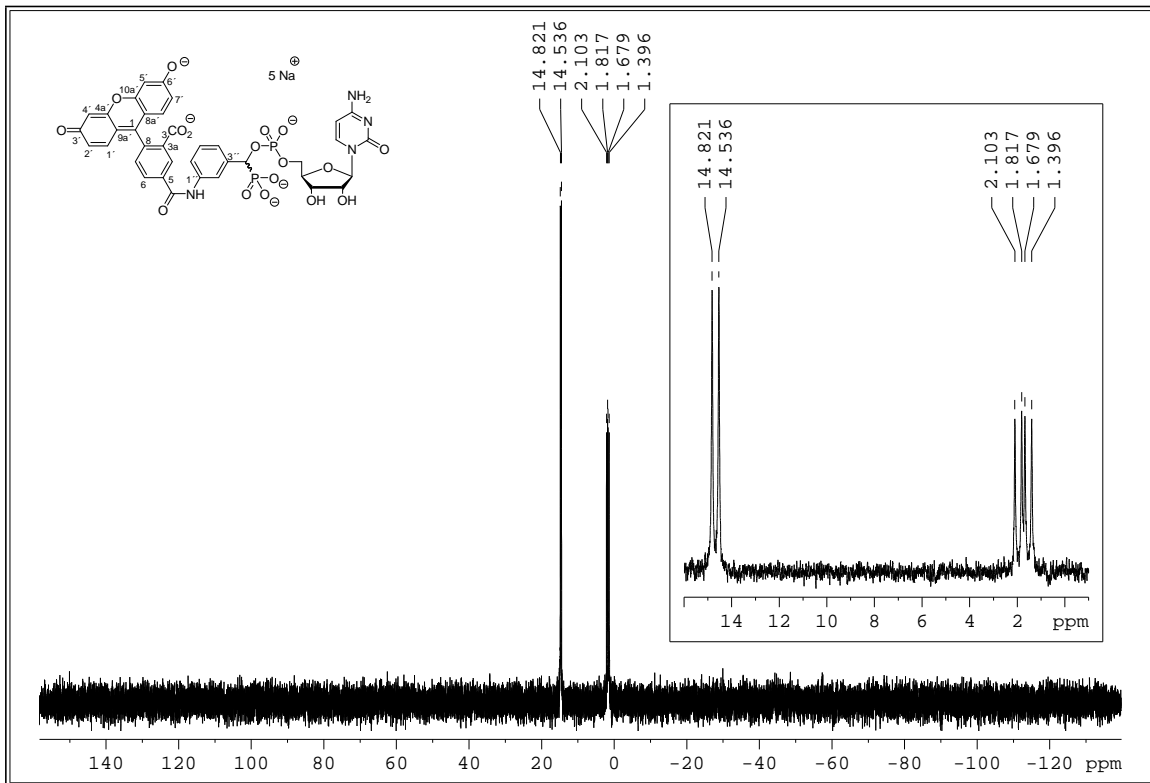
DQF-COSY-Spektrum der Verbindung 8-m-(5) (600 MHz, D₂O)



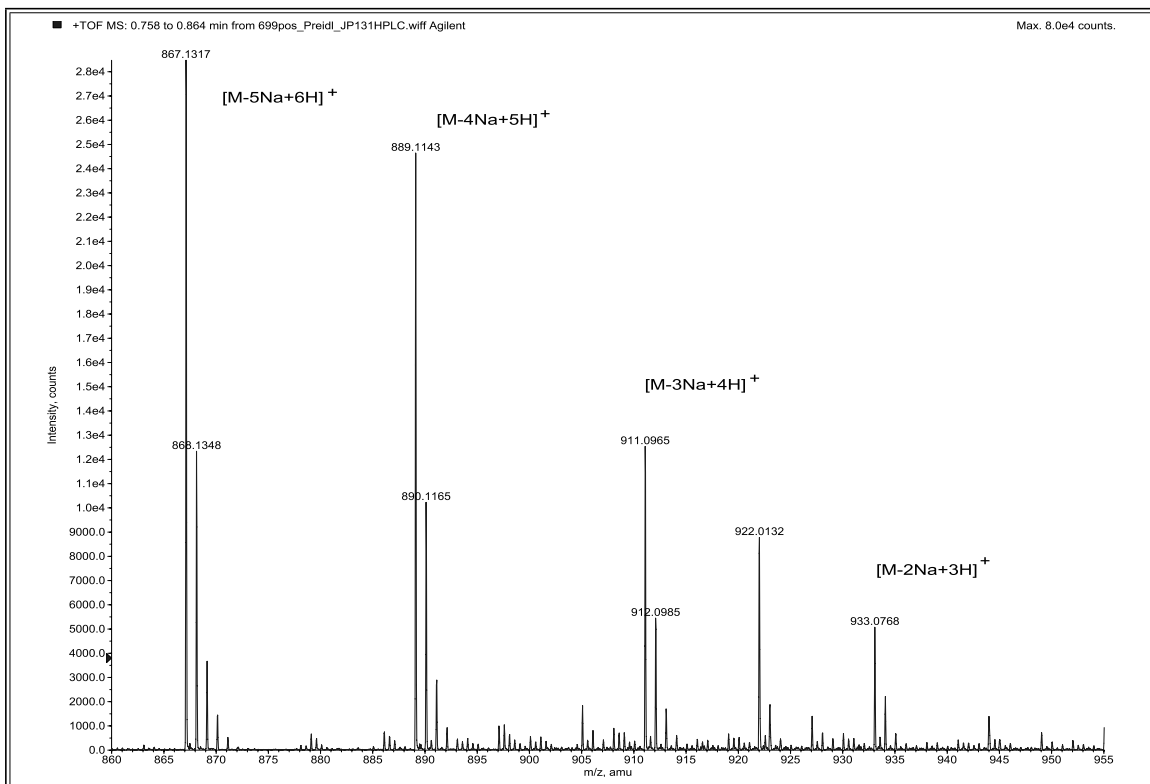
¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung **8-*m*-(5)** (76 MHz, D₂O)



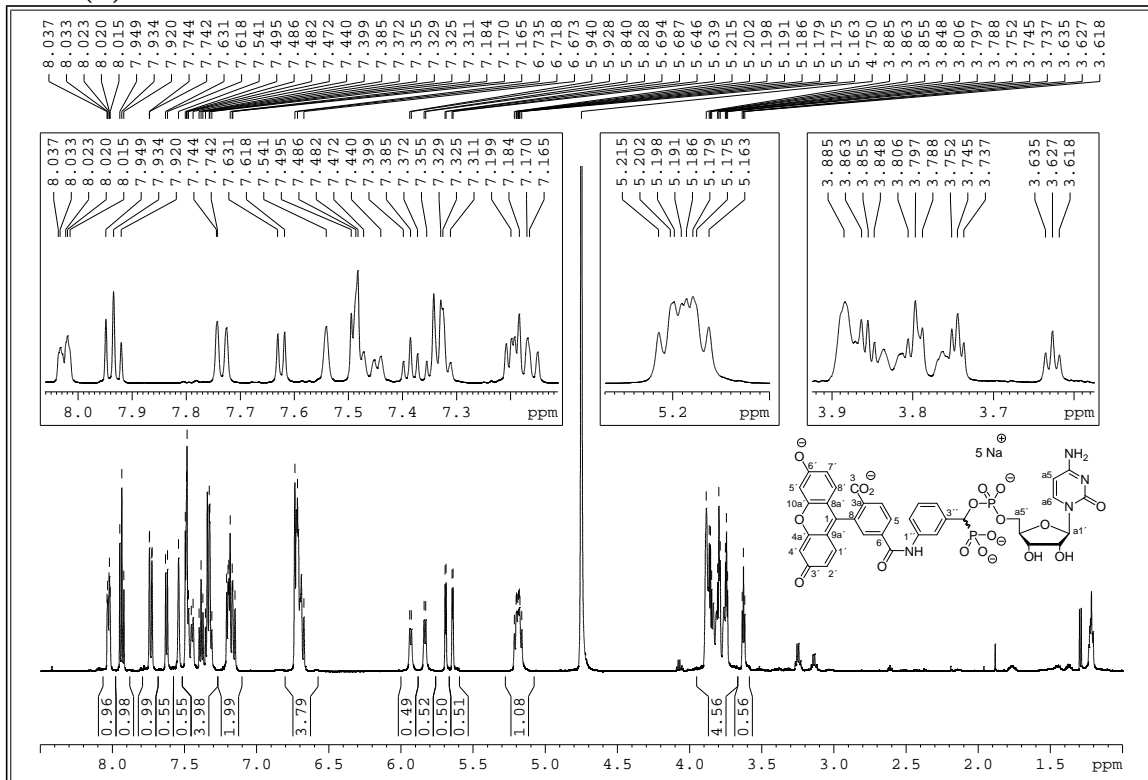
HMBC- (rot) und HMQC-Spektren (schwarz) der Verbindung **8-*m*-(5)** (¹H: 600 MHz; ¹³C: 151 MHz, D₂O)



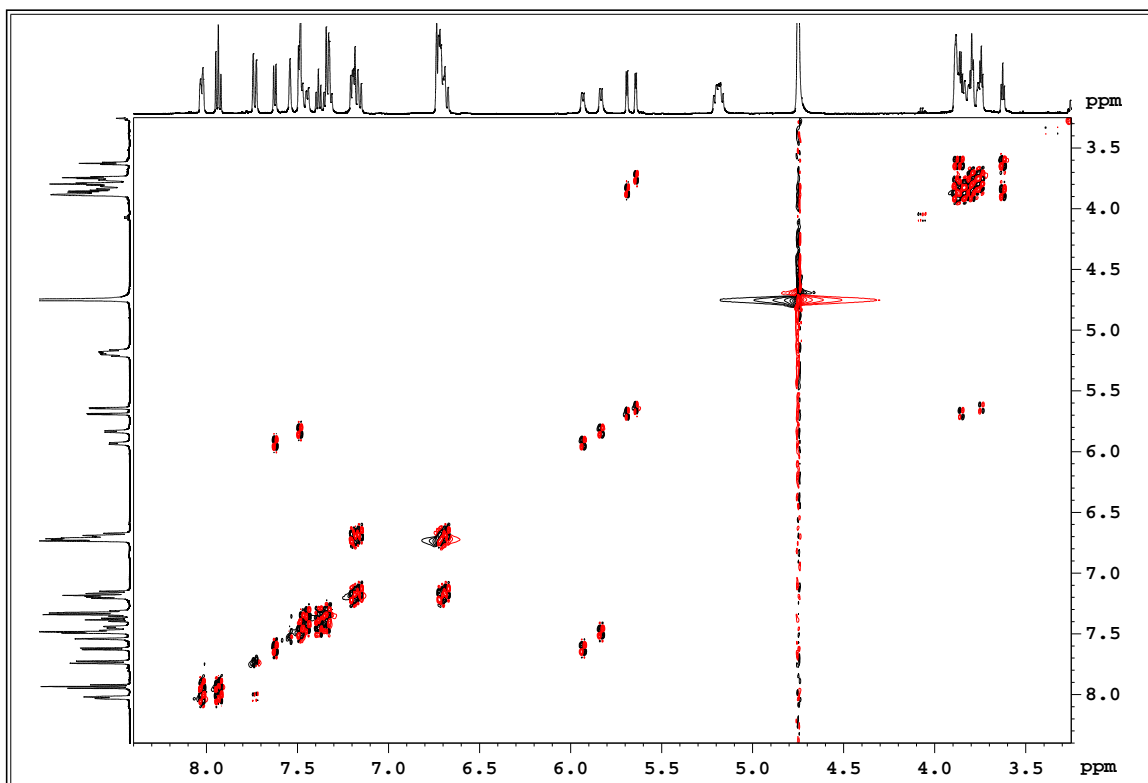
³¹P-NMR-Spektrum der Verbindung **8-m-(5)** (122 MHz, D₂O)



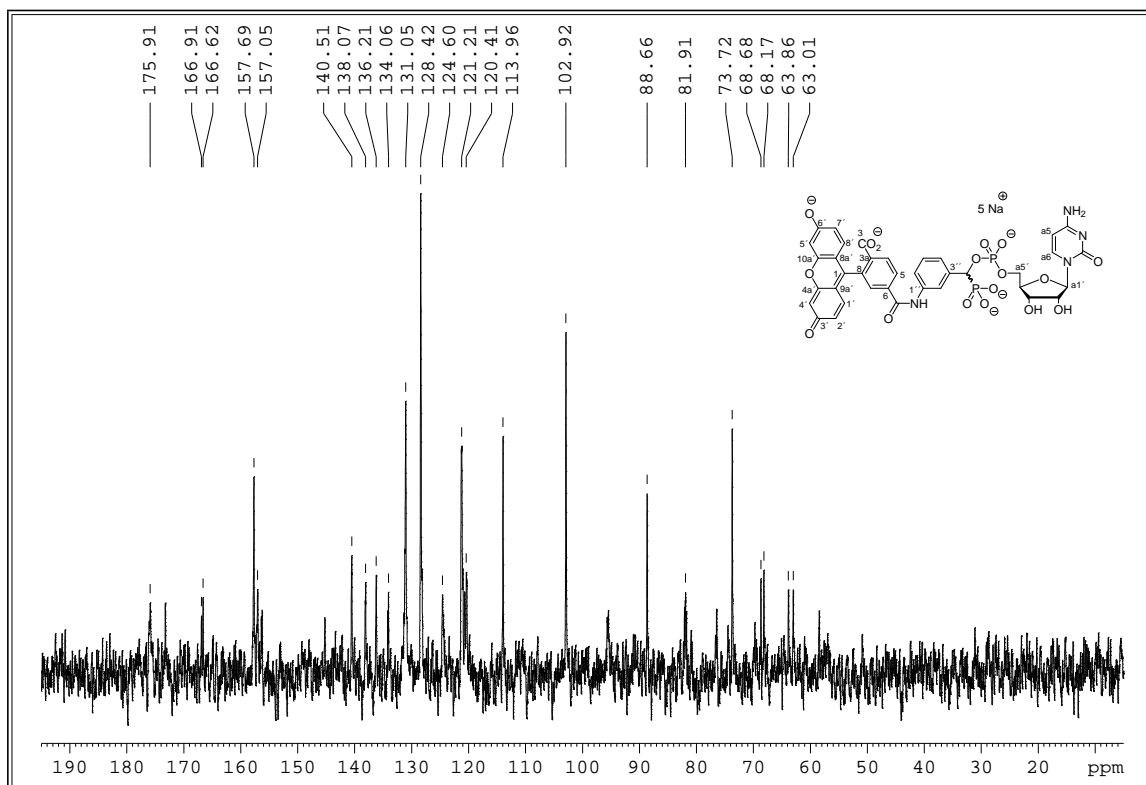
ESI-TOF-MS Spektrum der Verbindung **8-m-(5)** (pos. Modus)

8-*m*-(6)

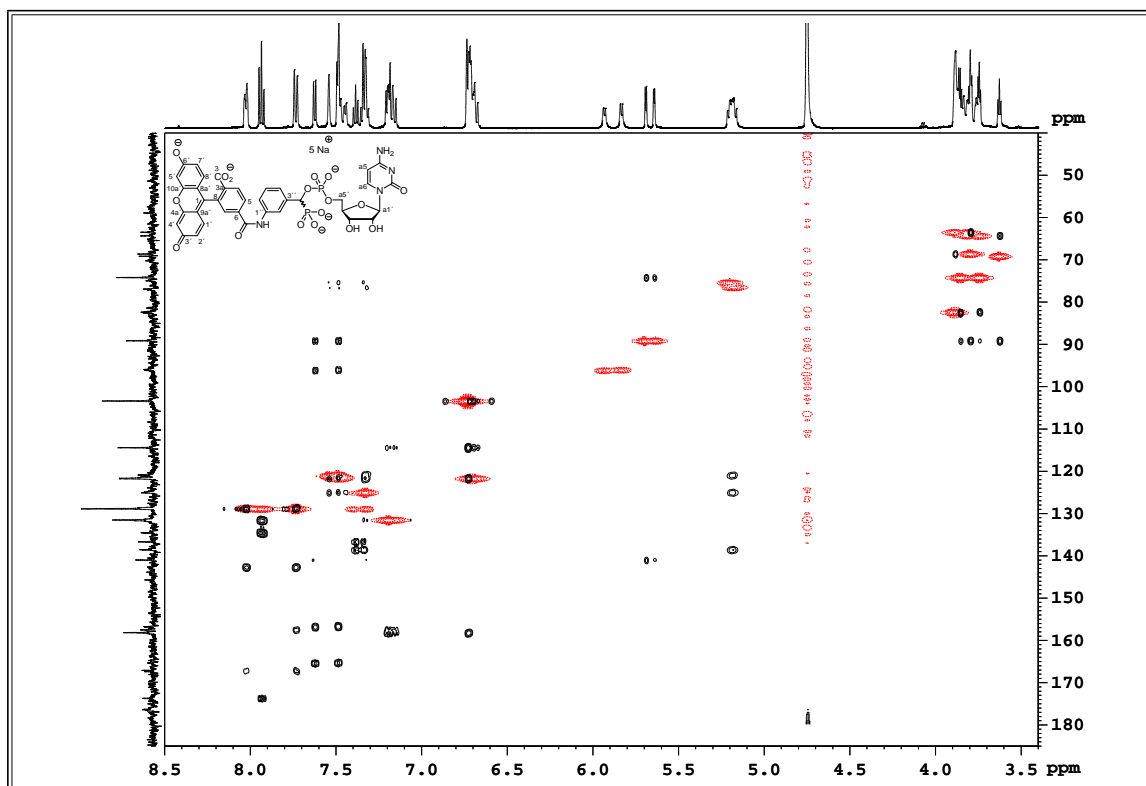
¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 8-*m*-(6) (600 MHz, D₂O)



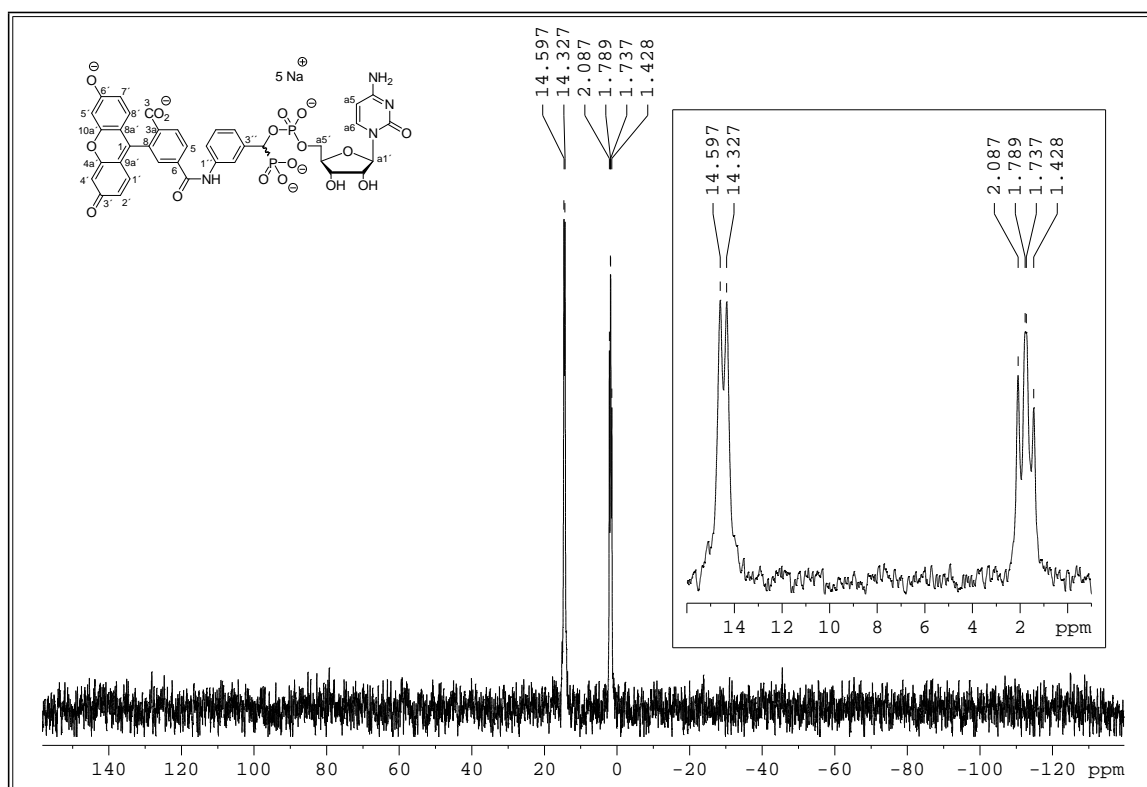
DQF-COSY-Spektrum der Verbindung 8-*m*-(6) (600 MHz, D₂O)



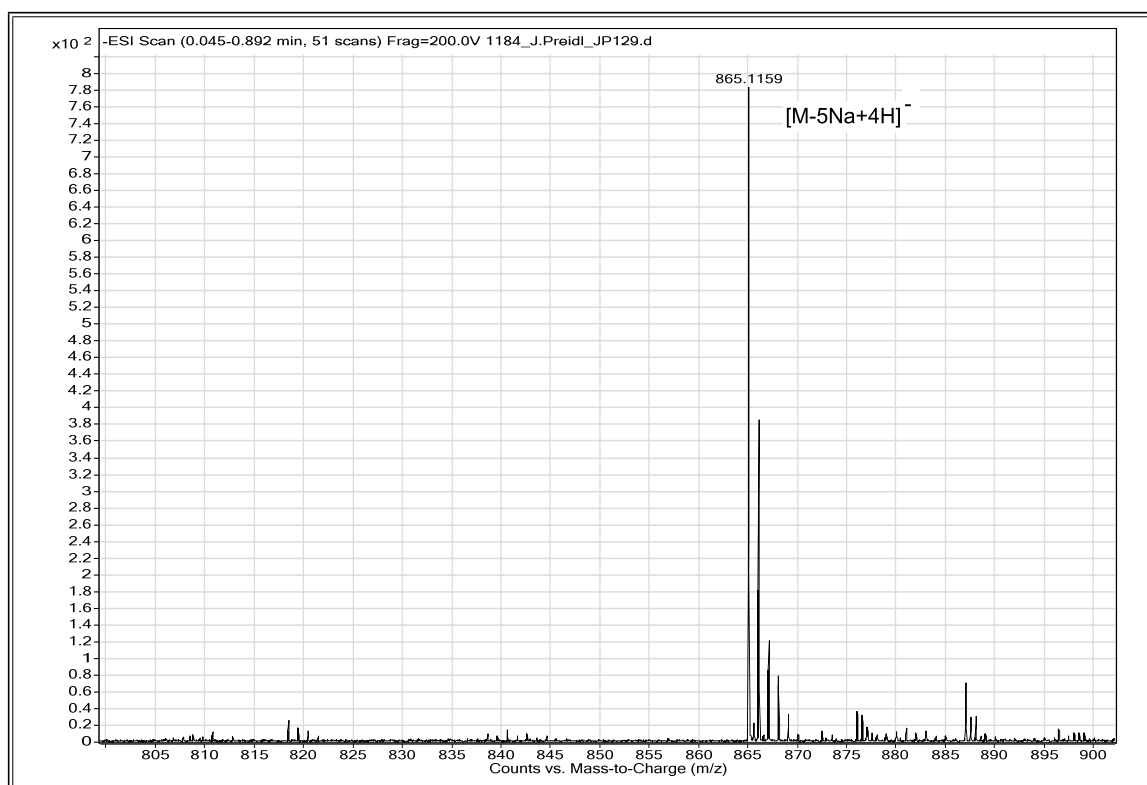
^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **8-*m*-(6)** (76 MHz, D_2O)



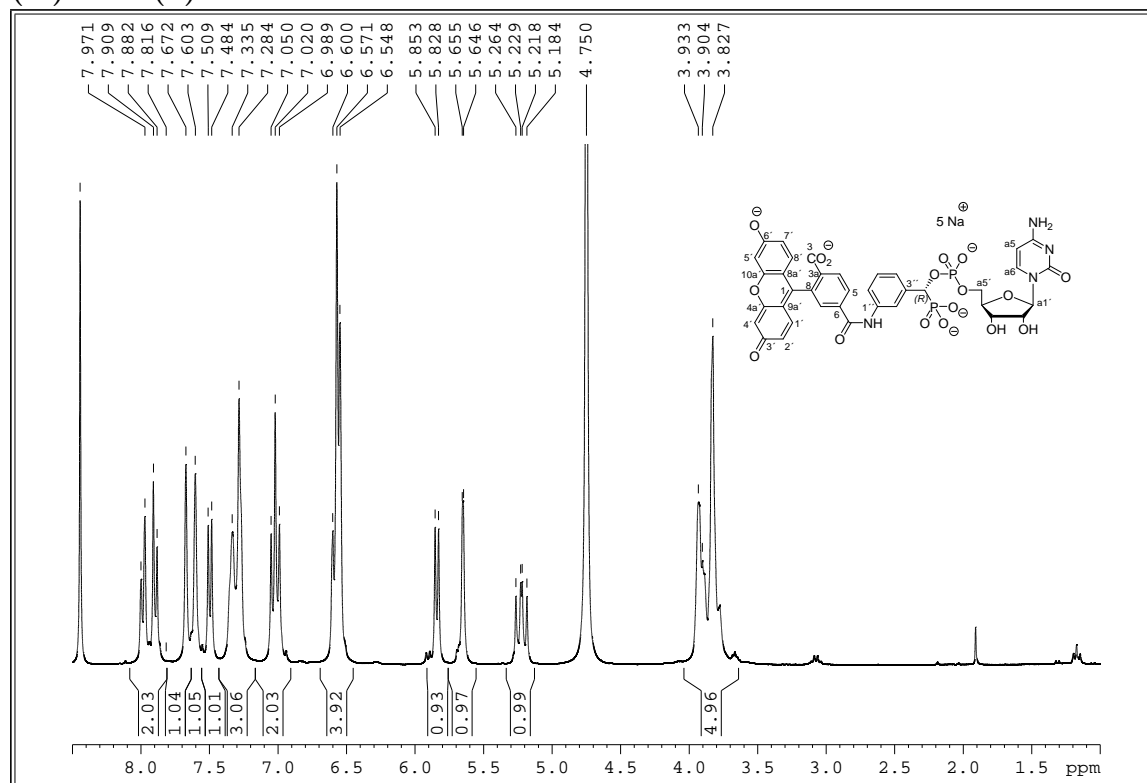
HMQC- (rot) und HMBC-Spektren (schwarz) der Verbindung **8-*m*-(6)** (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 151 MHz, D_2O)



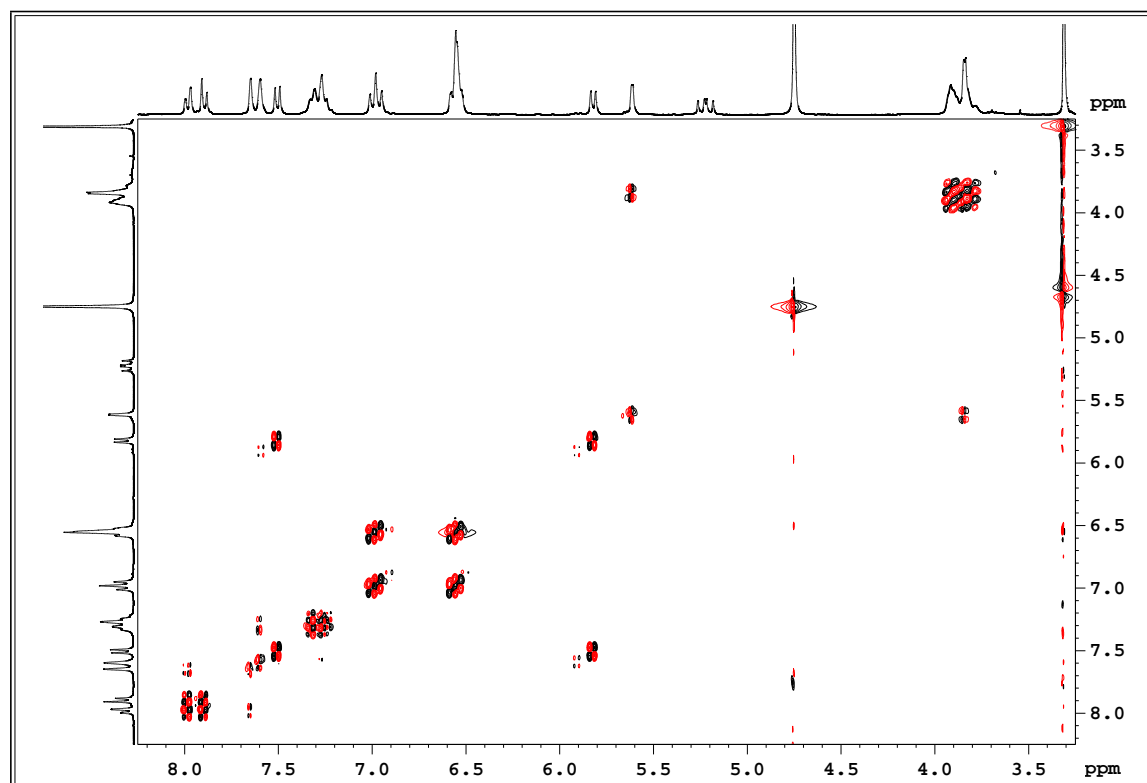
^{31}P -NMR-Spektrum der Verbindung **8-m-(6)** (122 MHz, D_2O)



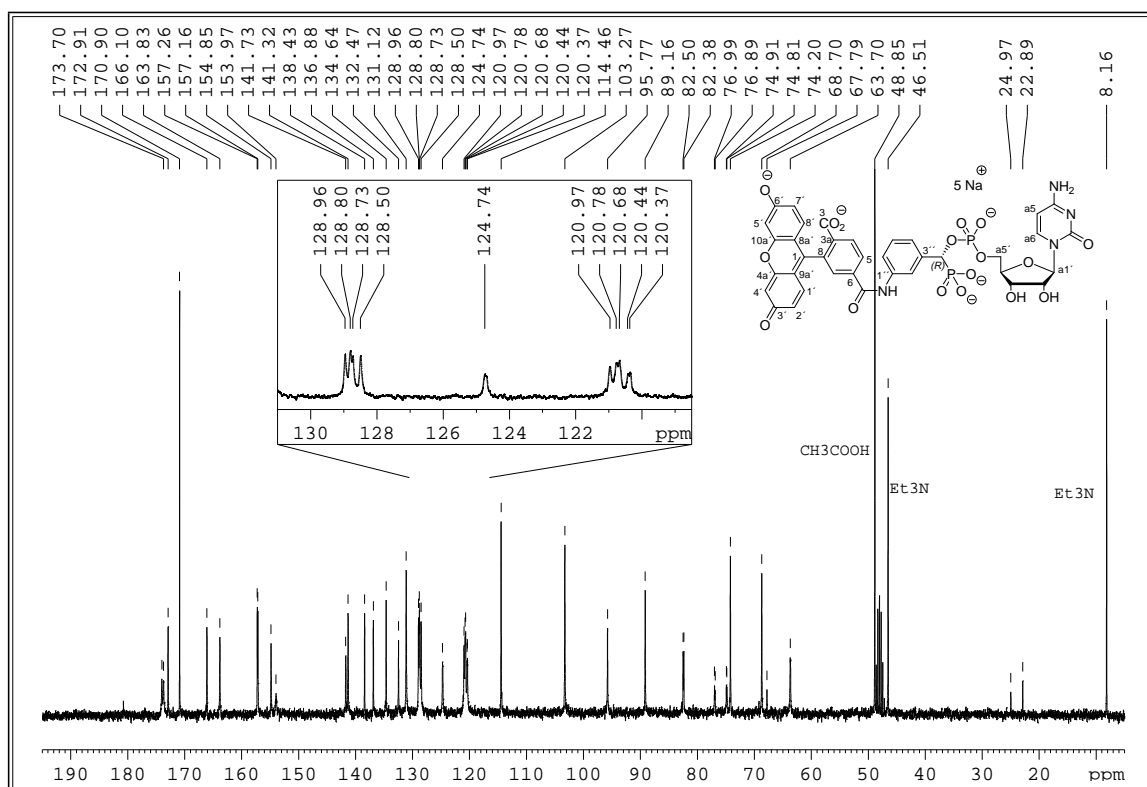
ESI-TOF-MS Spektrum der Verbindung **8-m-(6)** (neg. Modus)

(R)-8-m-(6)

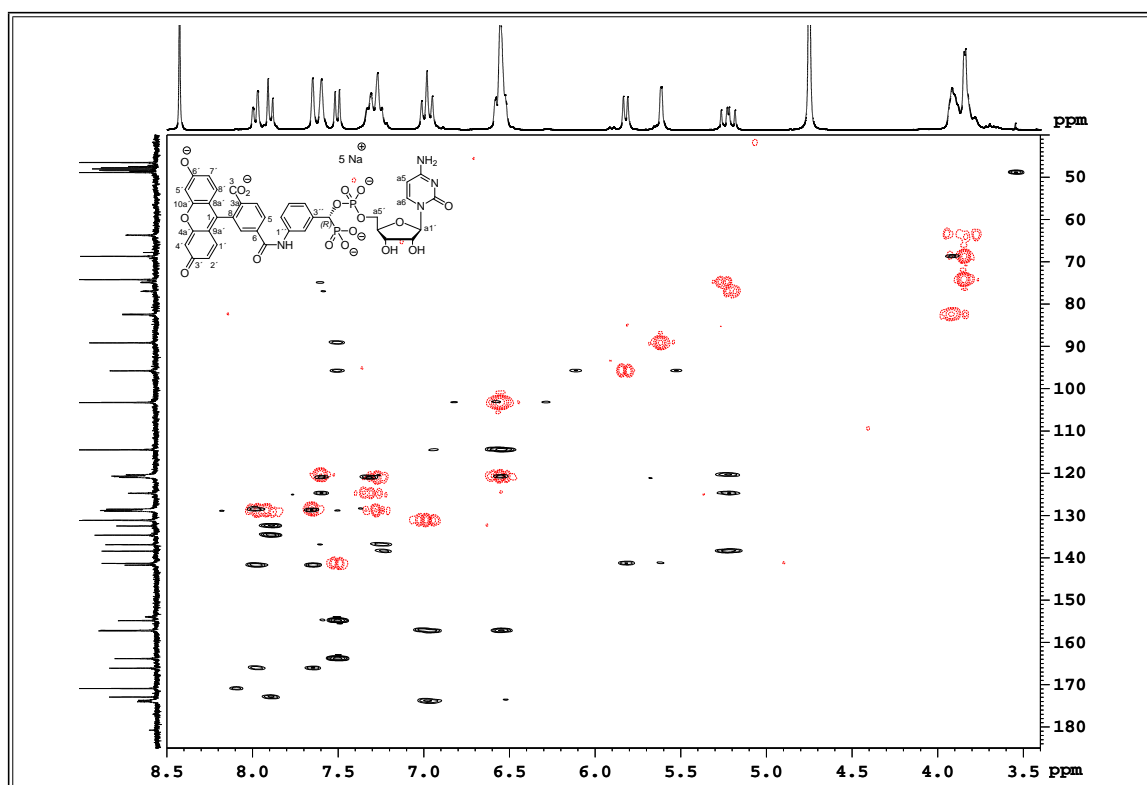
¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **(R)-8-m-(6)** (300 MHz, D₂O)



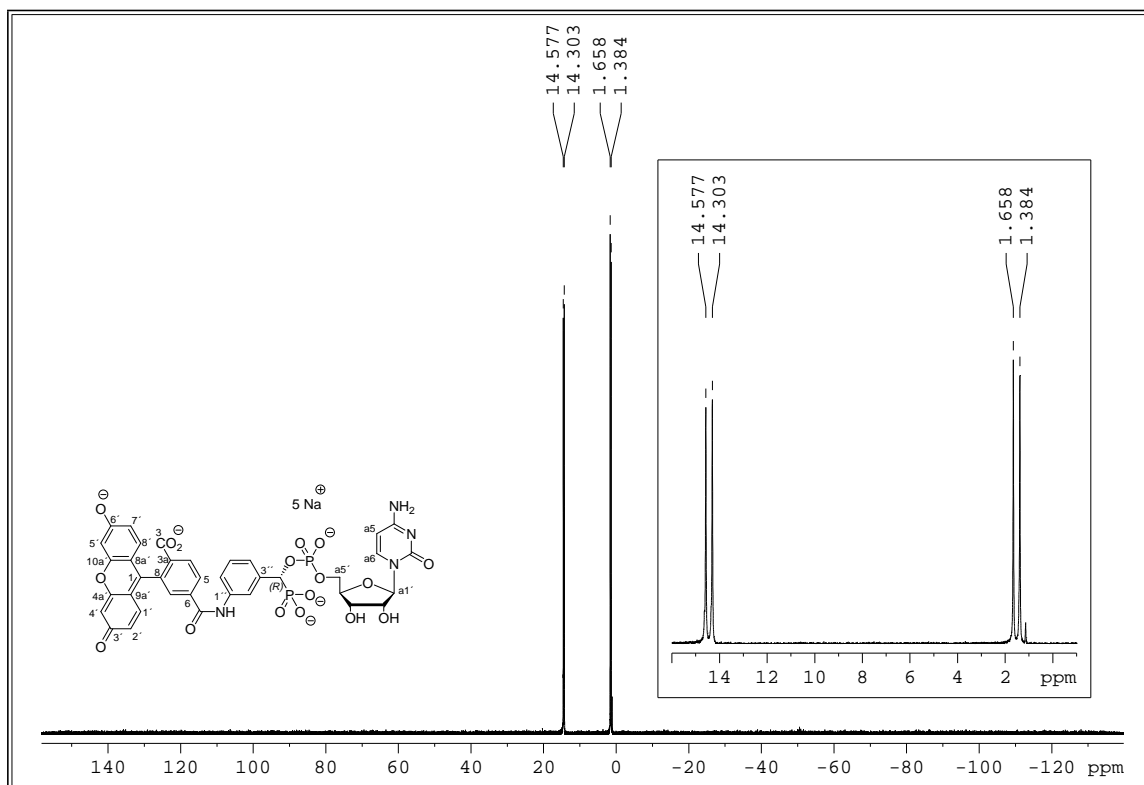
DQF-COSY-Spektrum der Verbindung **(R)-8-m-(6)** (300 MHz, D₂O)



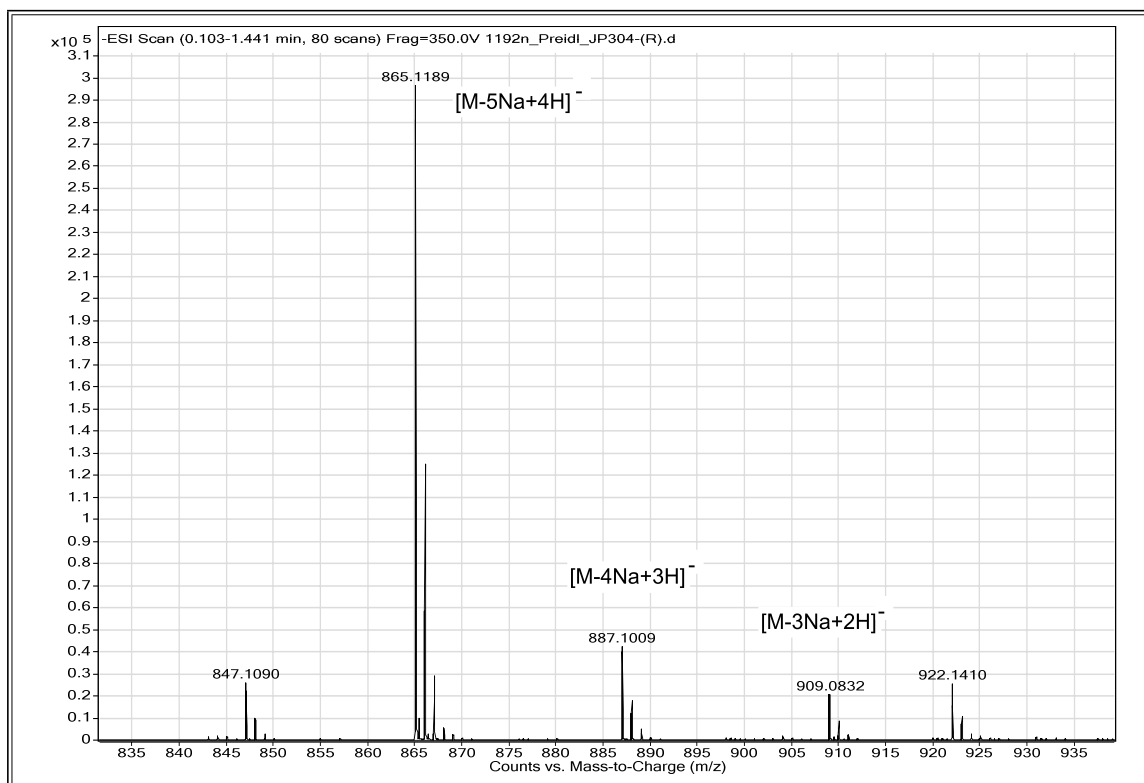
^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung (*R*)-8-*m*-(6) (76 MHz, D_2O)



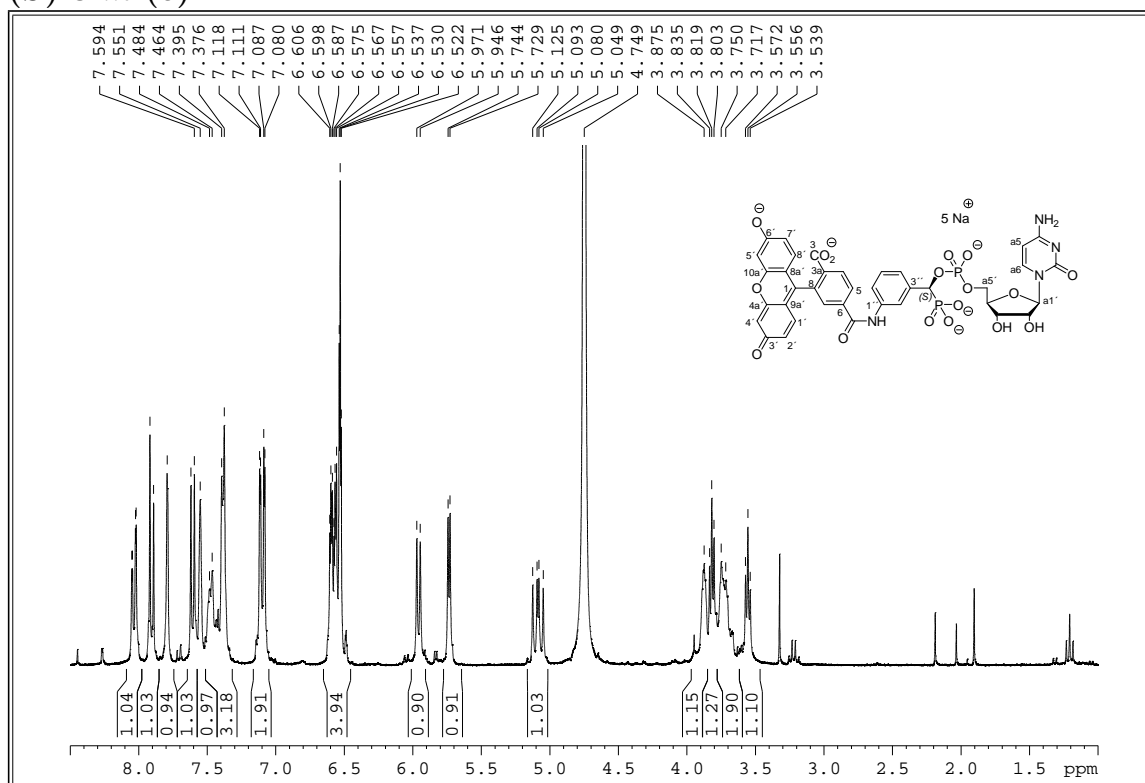
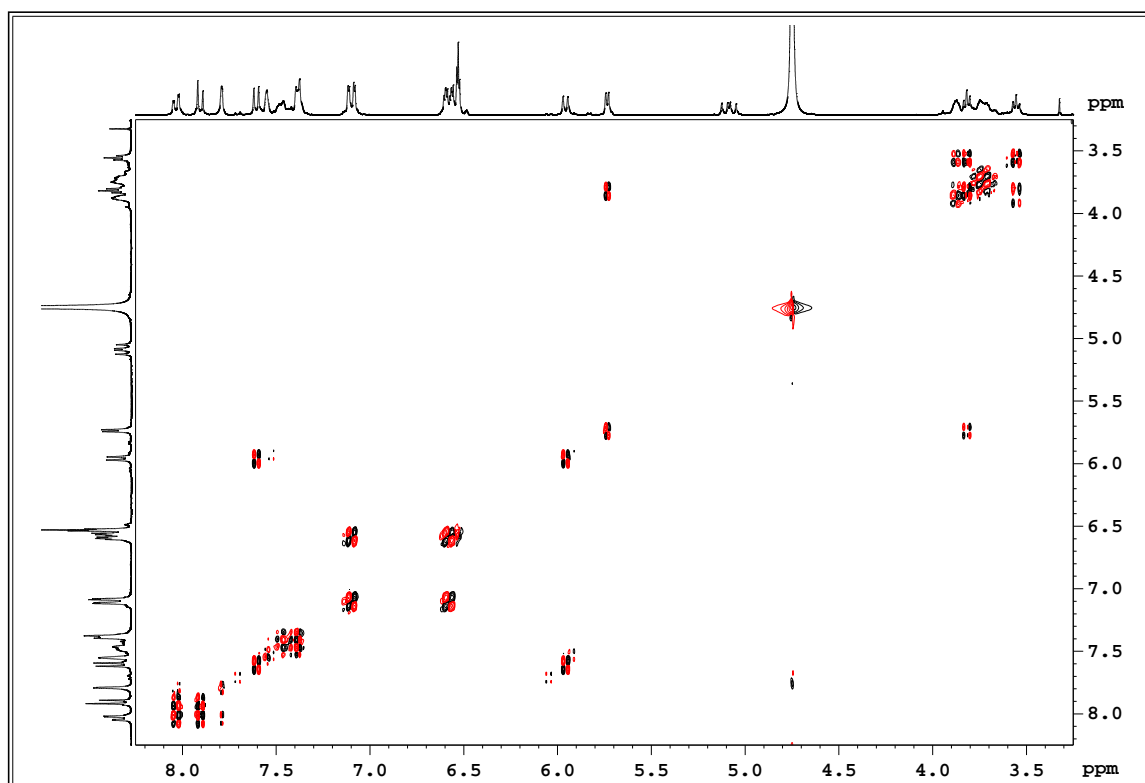
HMBC- (rot) und HMQC-Spektren (schwarz) der Verbindung (*R*)-8-*m*-(6) (^1H : 300 Mhz; ^{13}C : 76 MHz, D_2O)

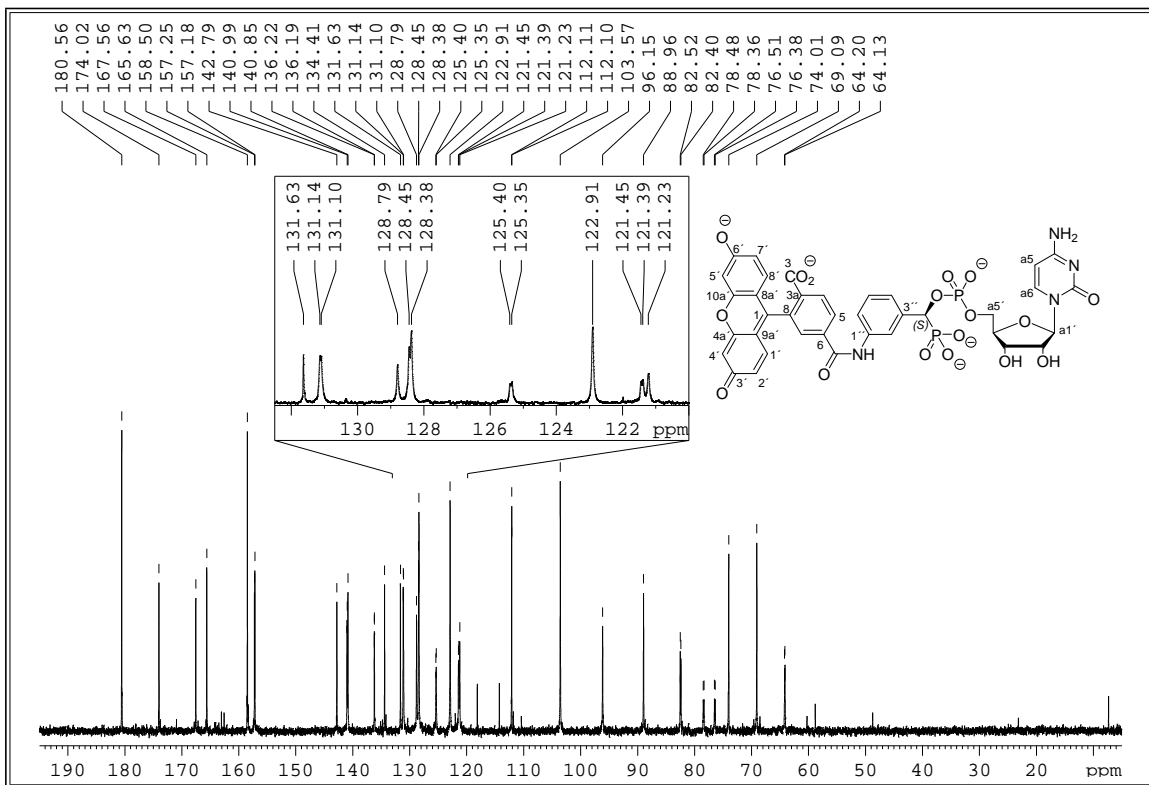


³¹P-NMR-Spektrum der Verbindung **(R)-8-m-(6)** (122 MHz, D₂O)

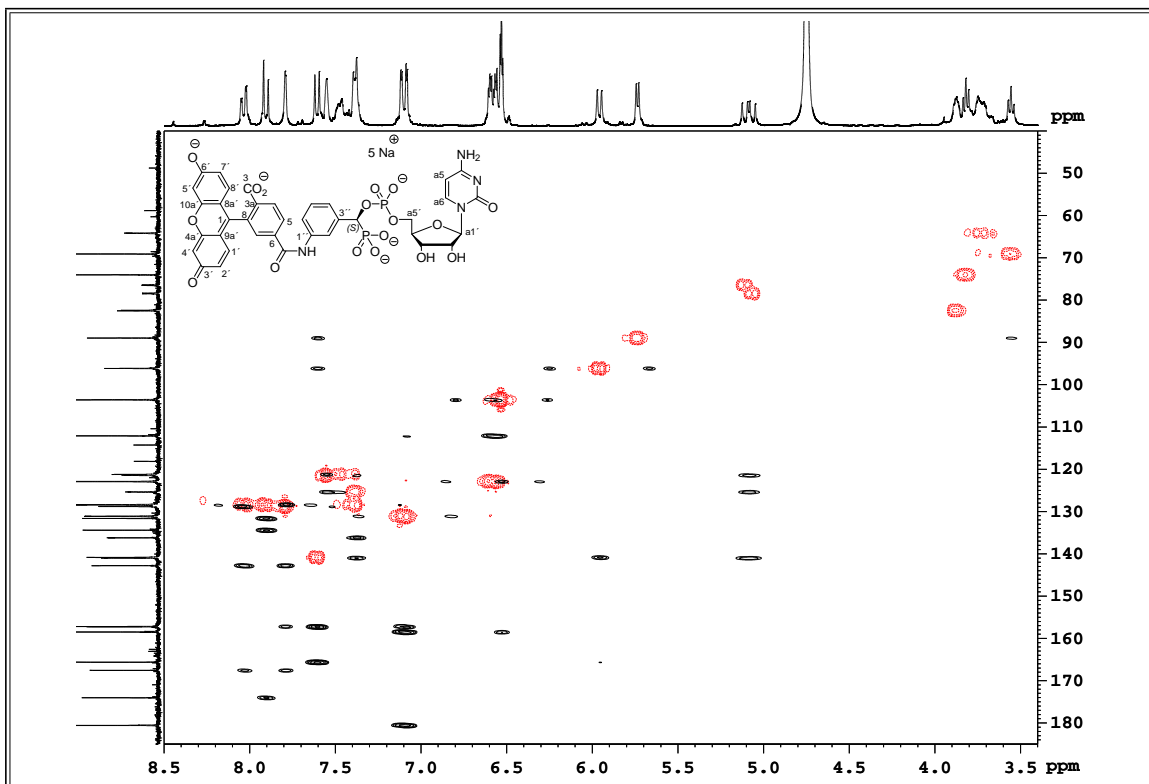


ESI-TOF-MS Spektrum der Verbindung **(R)-8-m-(6)** (neg. Modus)

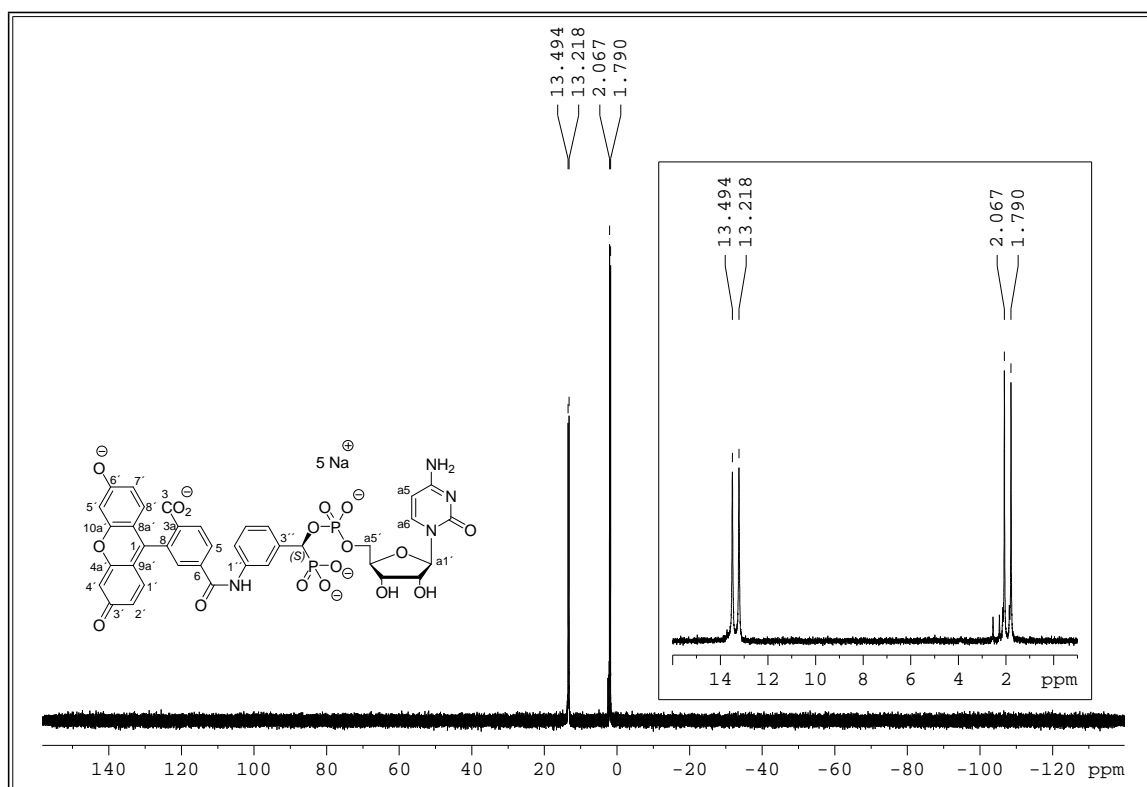
(S)-8-m-(6)¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **(S)-8-m-(6)** (300 MHz, D₂O)DQF-COSY-Spektrum der Verbindung **(S)-8-m-(6)** (300 MHz, D₂O)



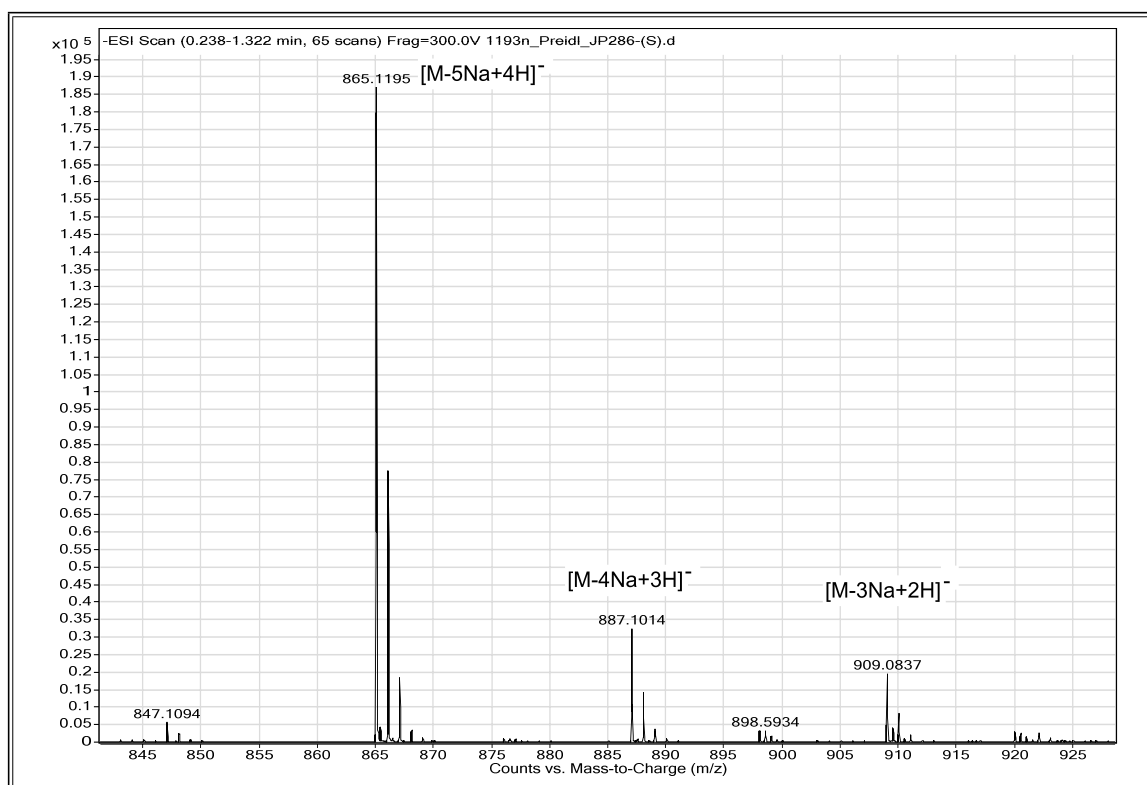
¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung (*S*)-8-*m*-(6) (76 MHz, D₂O)



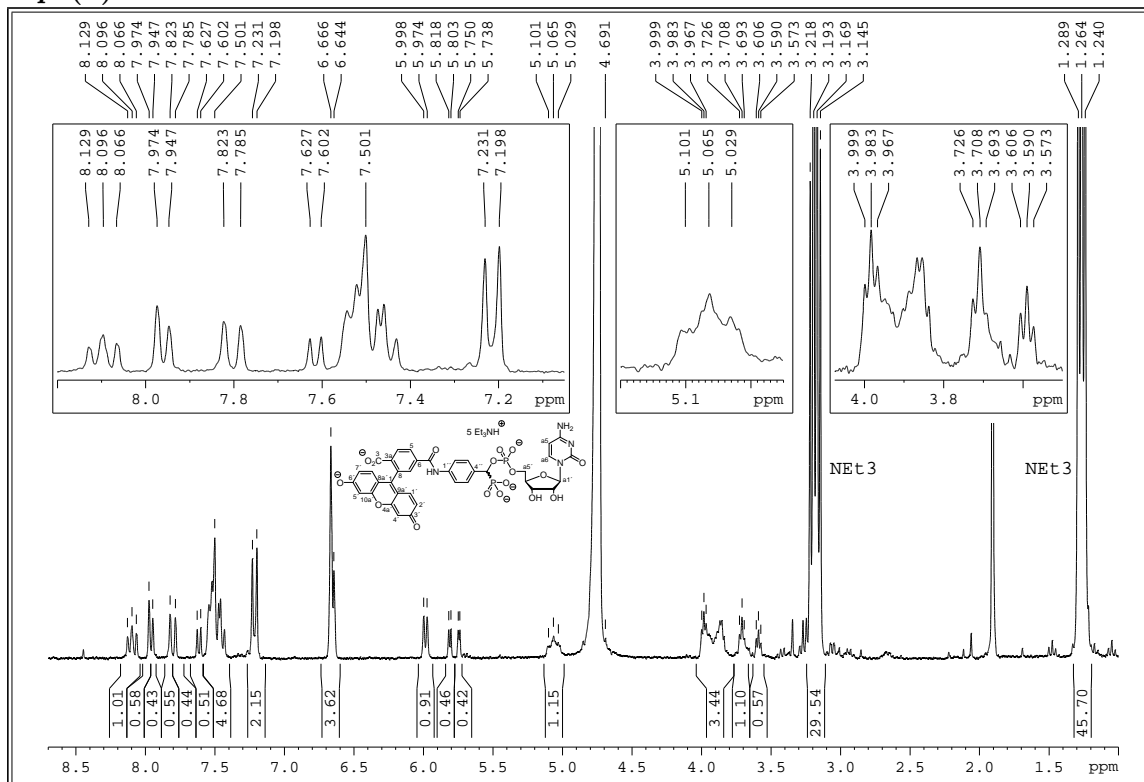
HMBC- (rot) und HMQC-Spektren (schwarz) der Verbindung (*S*)-8-*m*-(6) (¹H: 300 MHz; ¹³C: 76 MHz, D₂O)



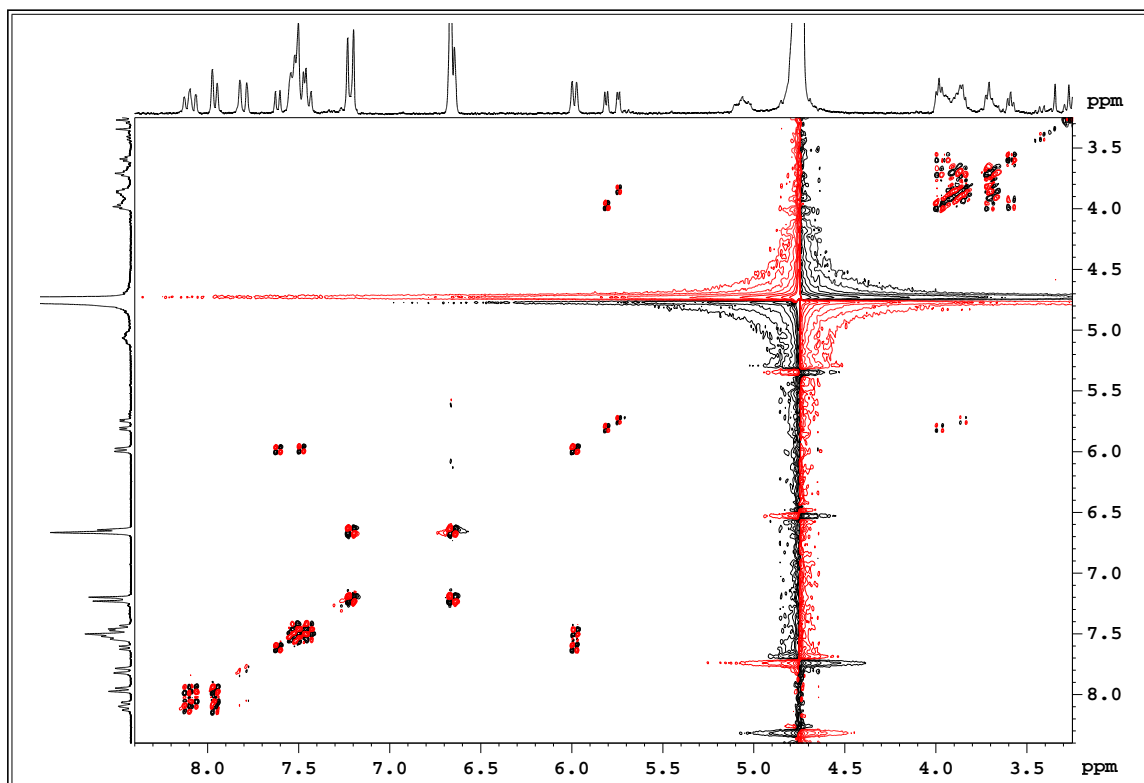
^{31}P -NMR-Spektrum der Verbindung (S) -8-*m*-(6) (122 MHz, D_2O)



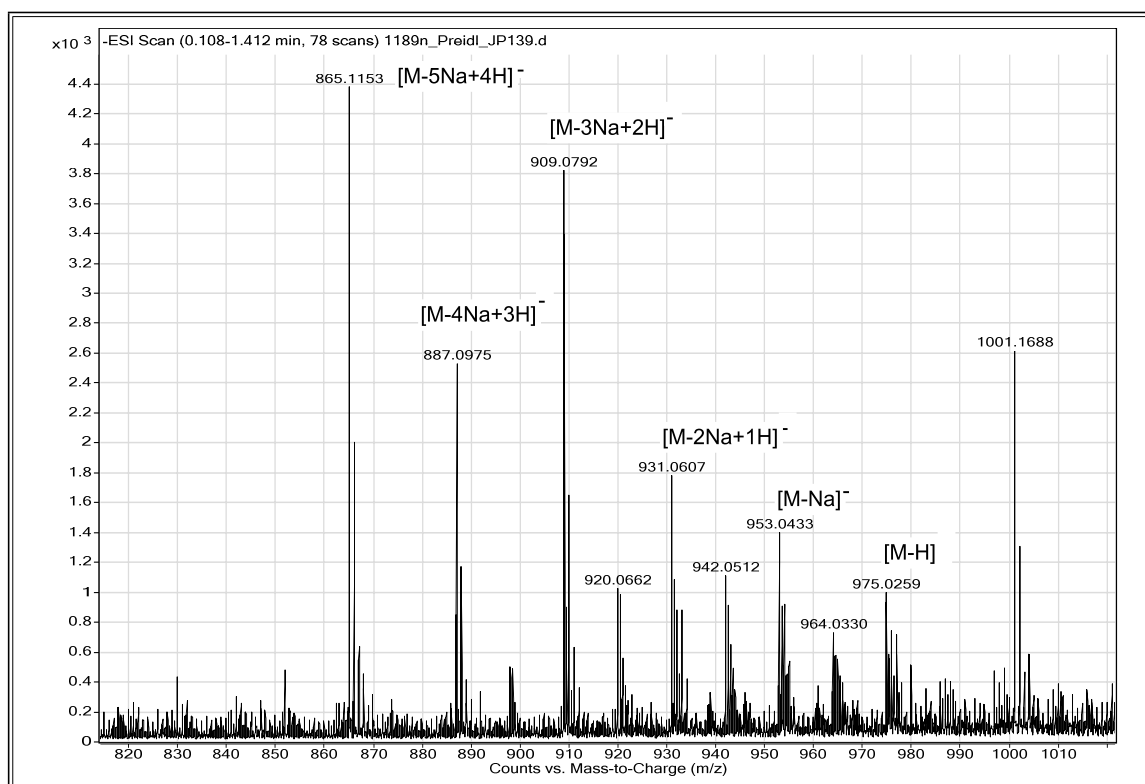
ESI-TOF-MS Spektrum der Verbindung (S) -8-*m*-(6) (neg. Modus)

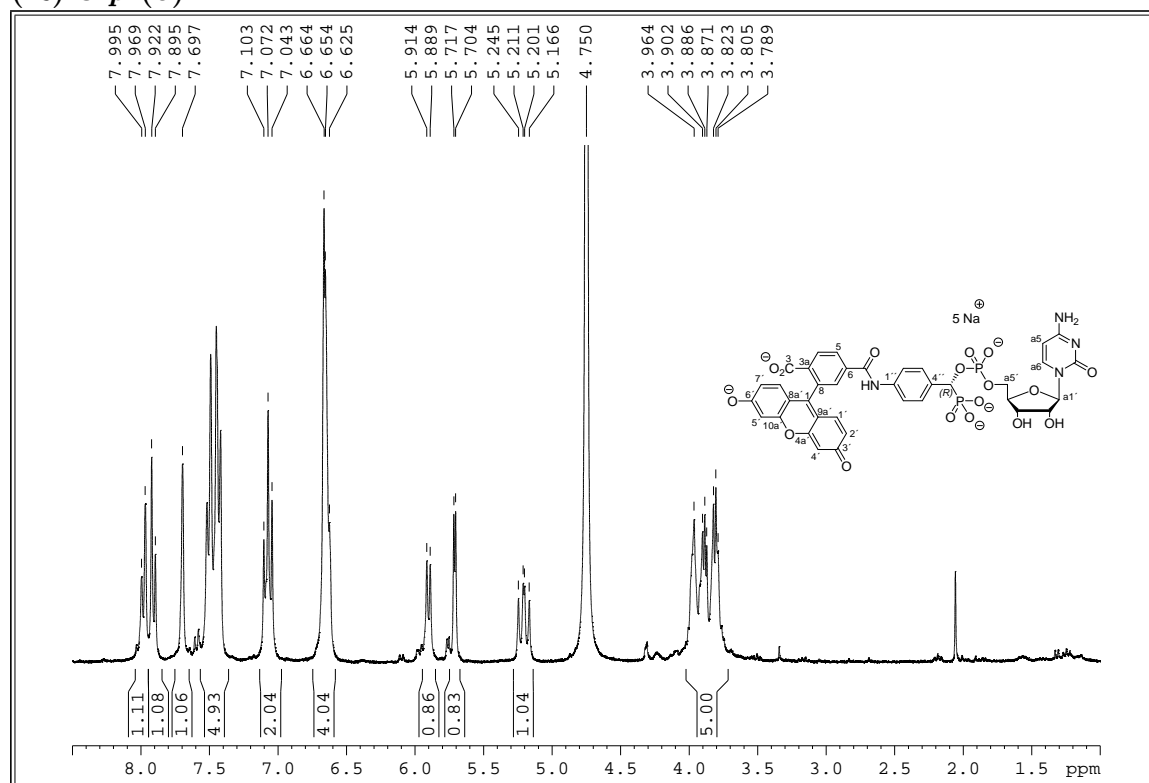
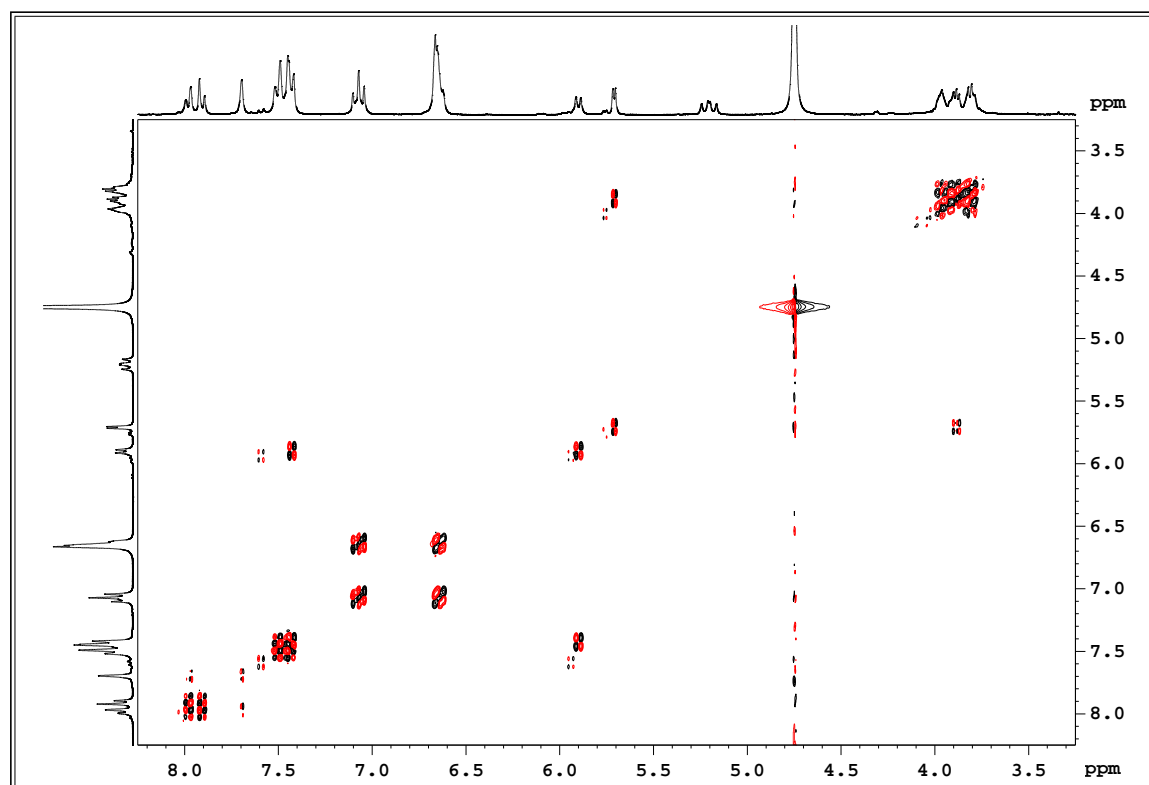
8-*p*-(6)

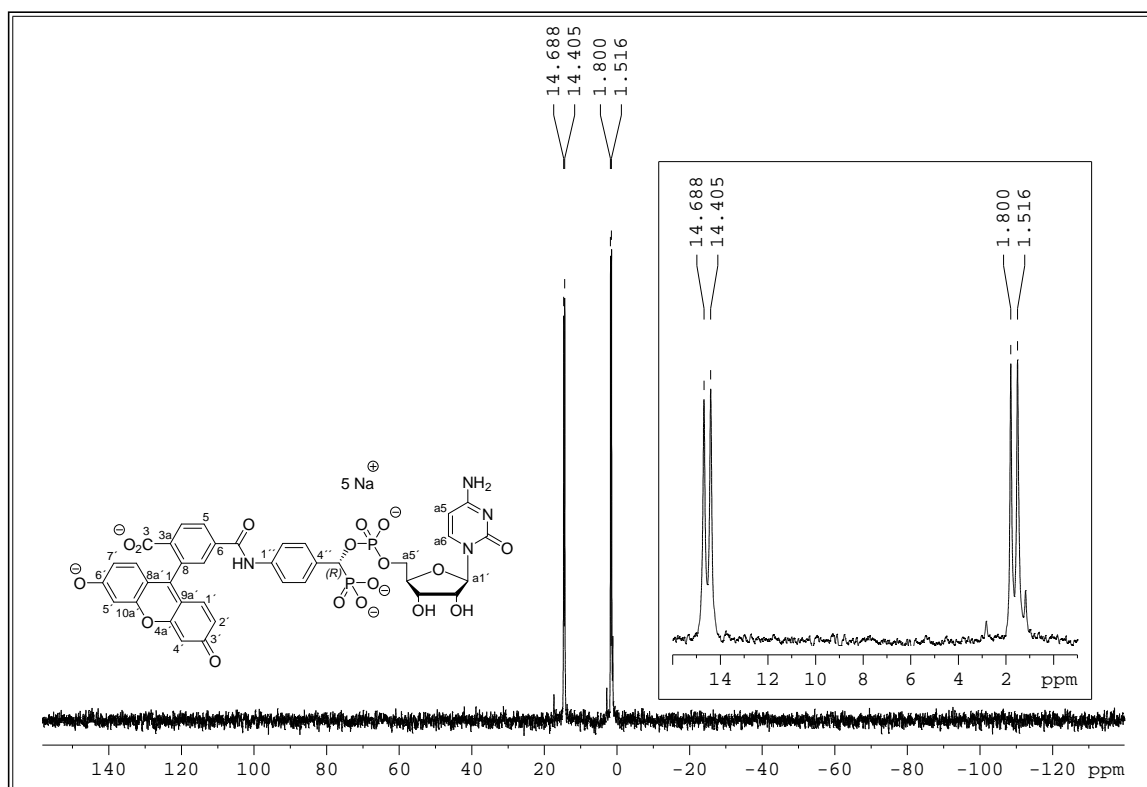
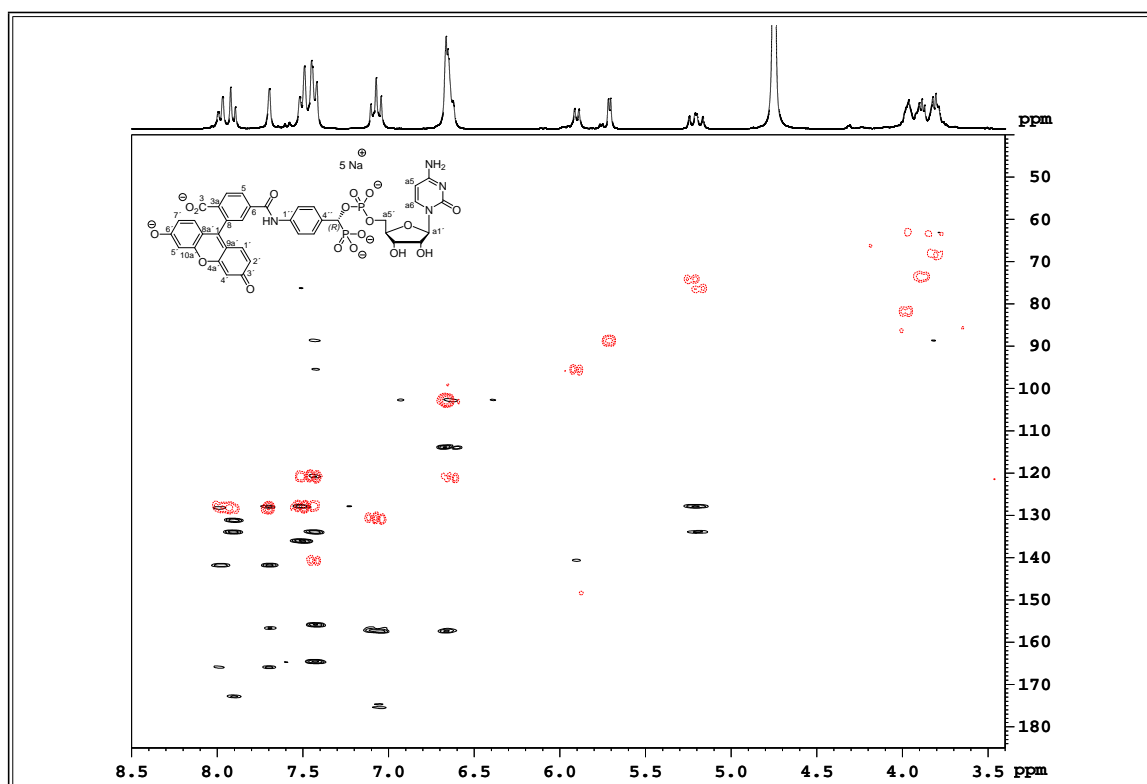
¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **8-*p*-(6)** (300 MHz, D₂O)

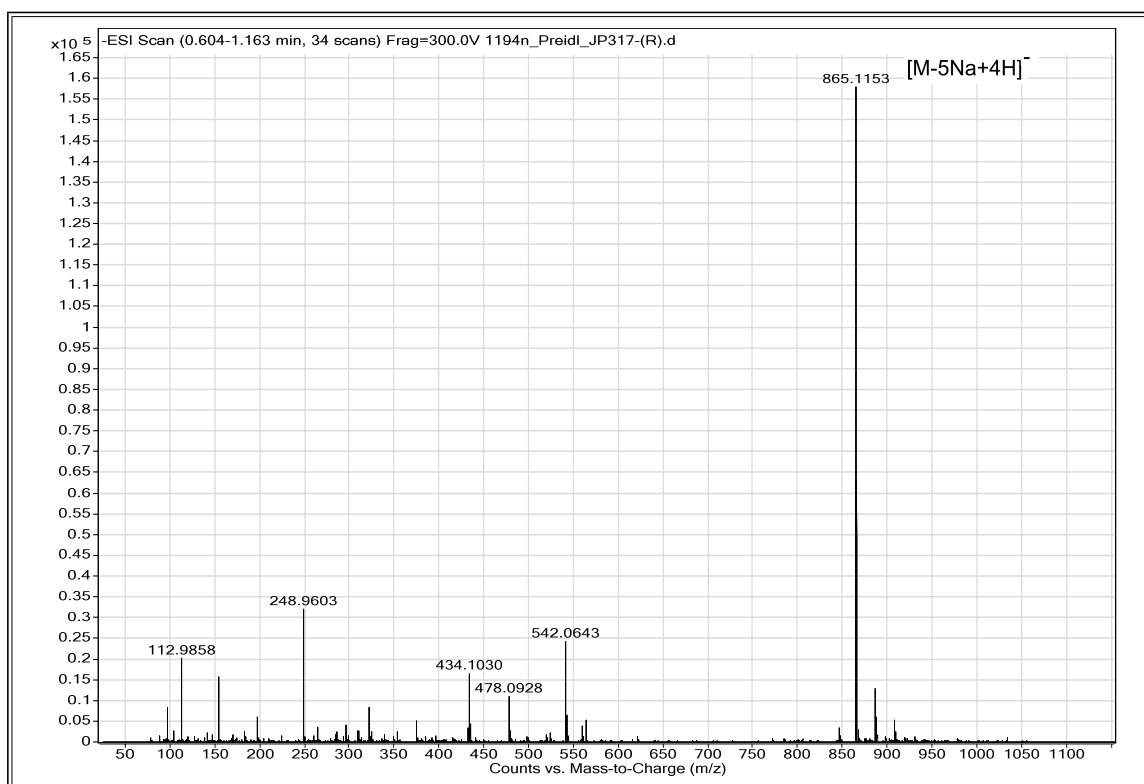


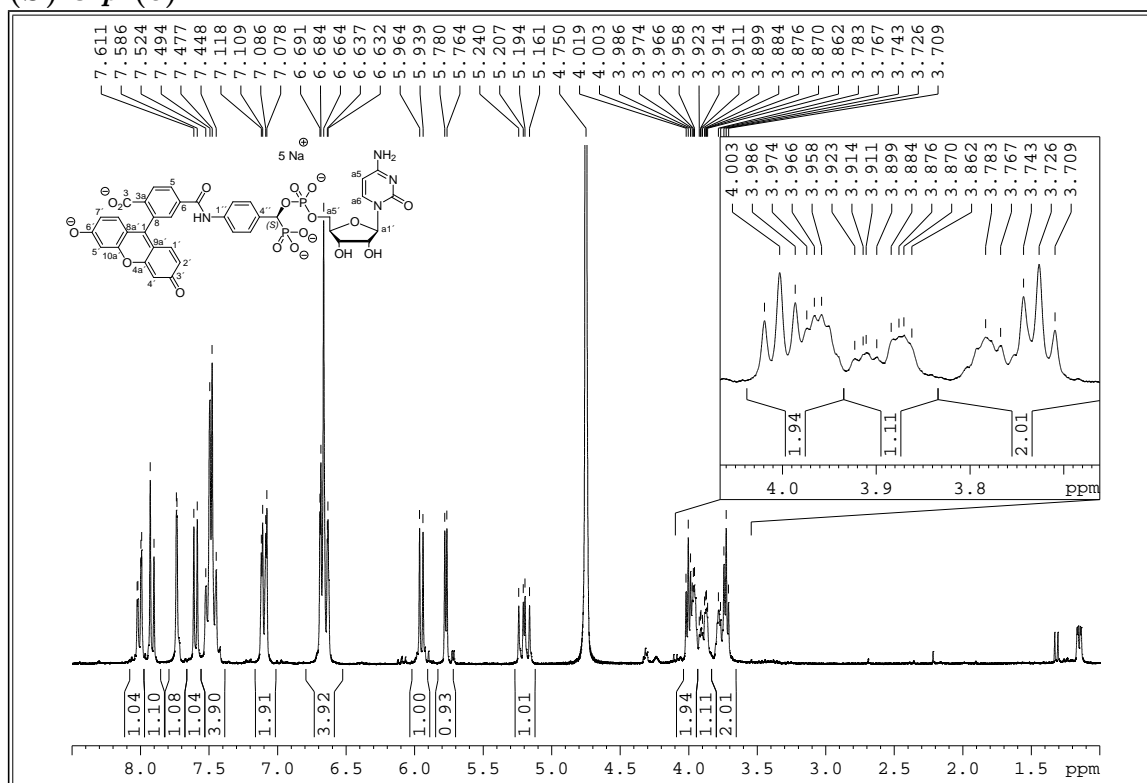
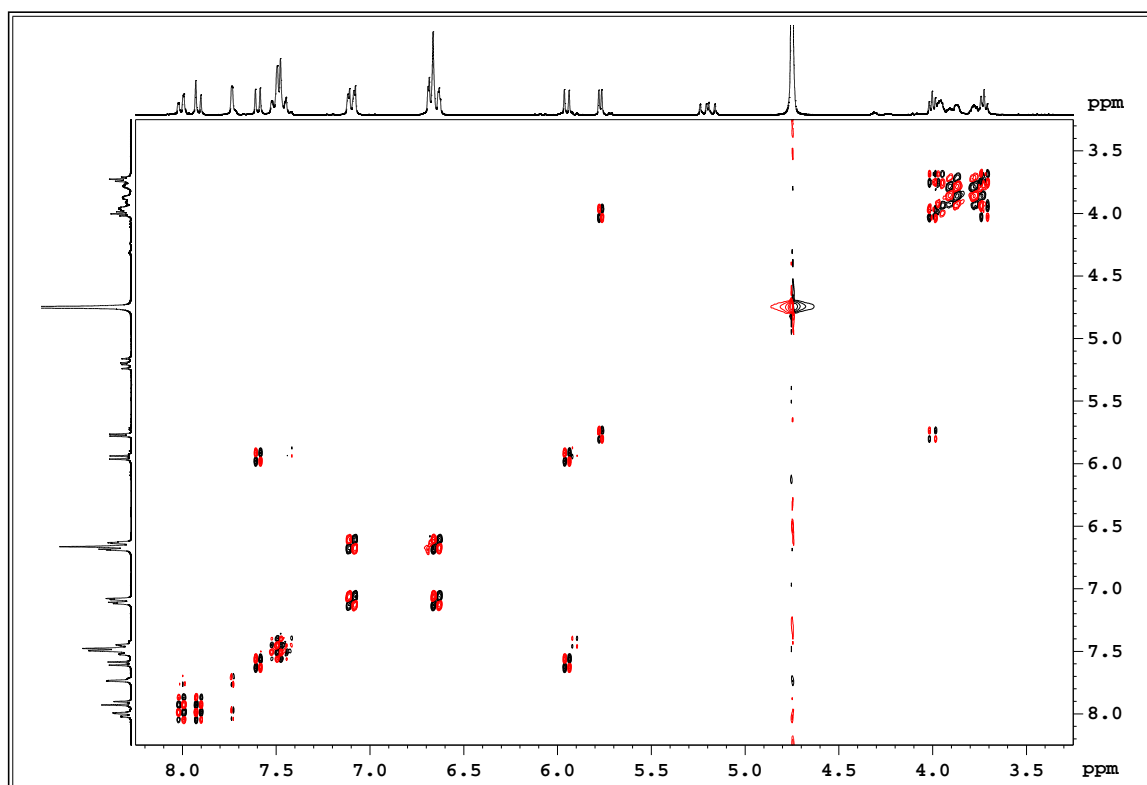
DQF-COSY-Spektrum der Verbindung **8-*p*-(6)** (300 MHz, D₂O)

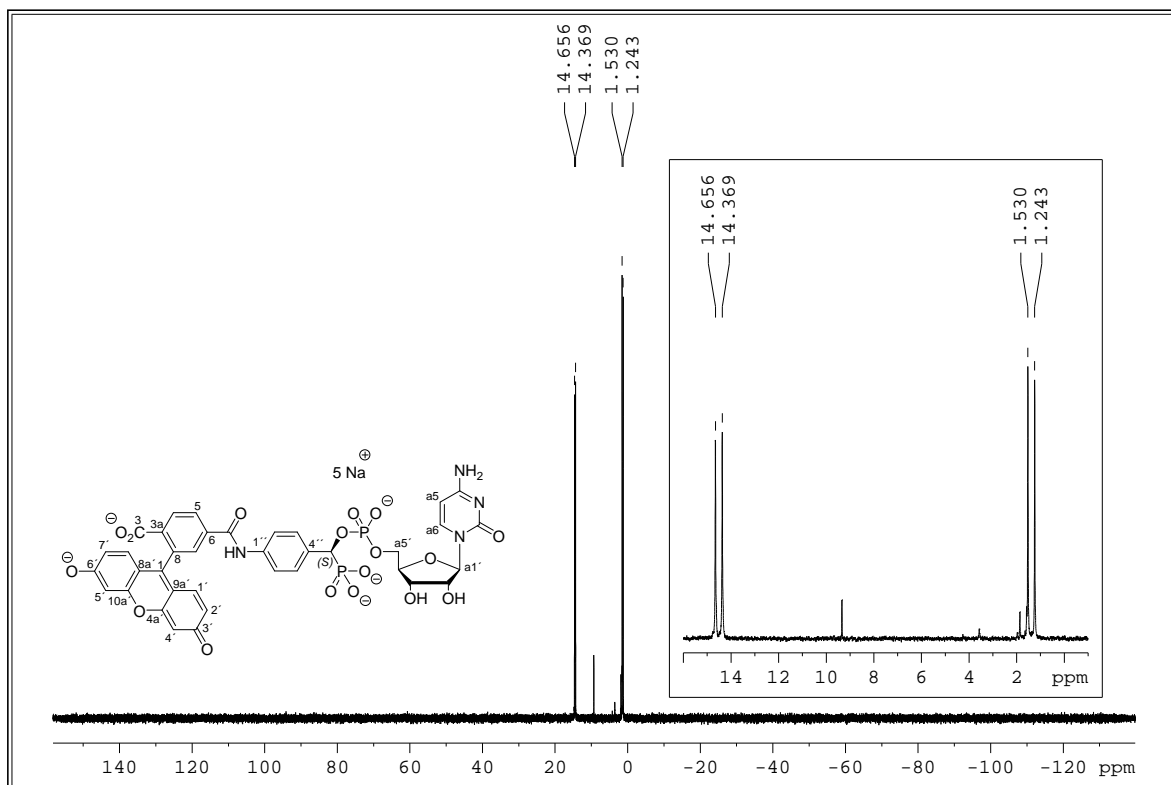
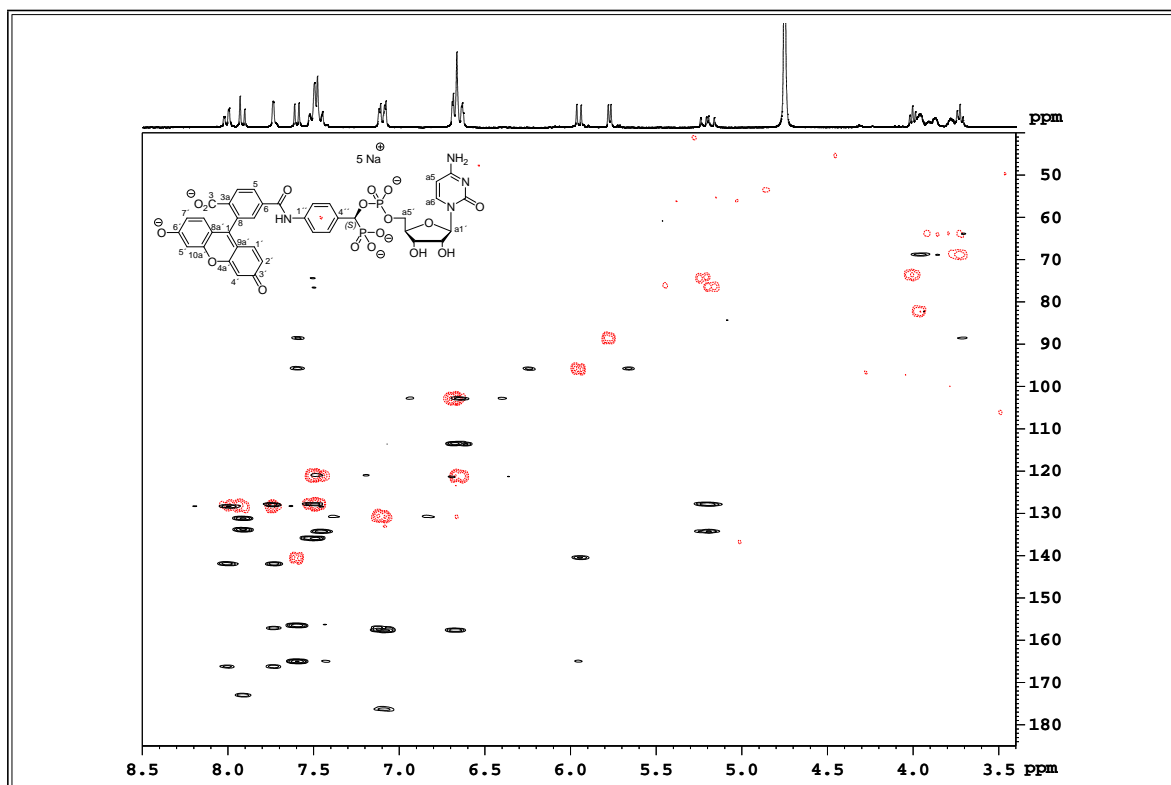
ESI-TOF-MS Spektrum der Verbindung **8-*p*-(6)** (neg. Modus)

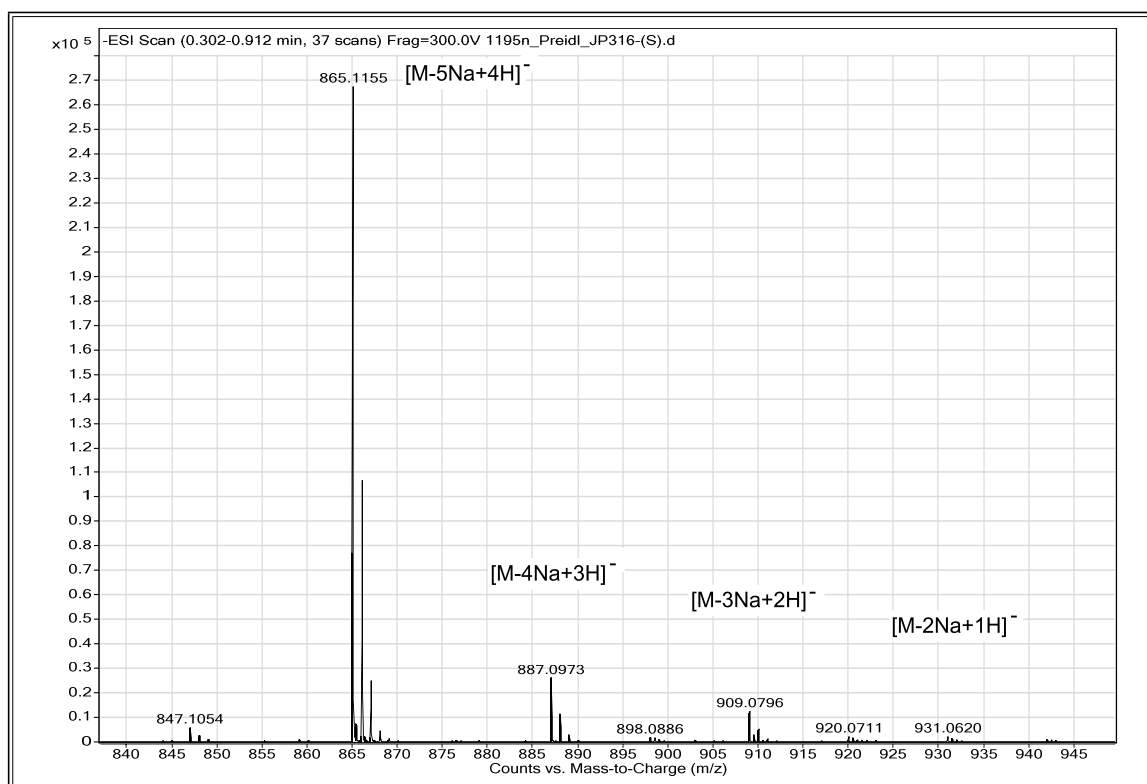
(R)-8-p-(6) $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **(R)-8-p-(6)** (300 MHz, D_2O)DQF-COSY-Spektrum der Verbindung **(R)-8-p-(6)** (300 MHz, D_2O)



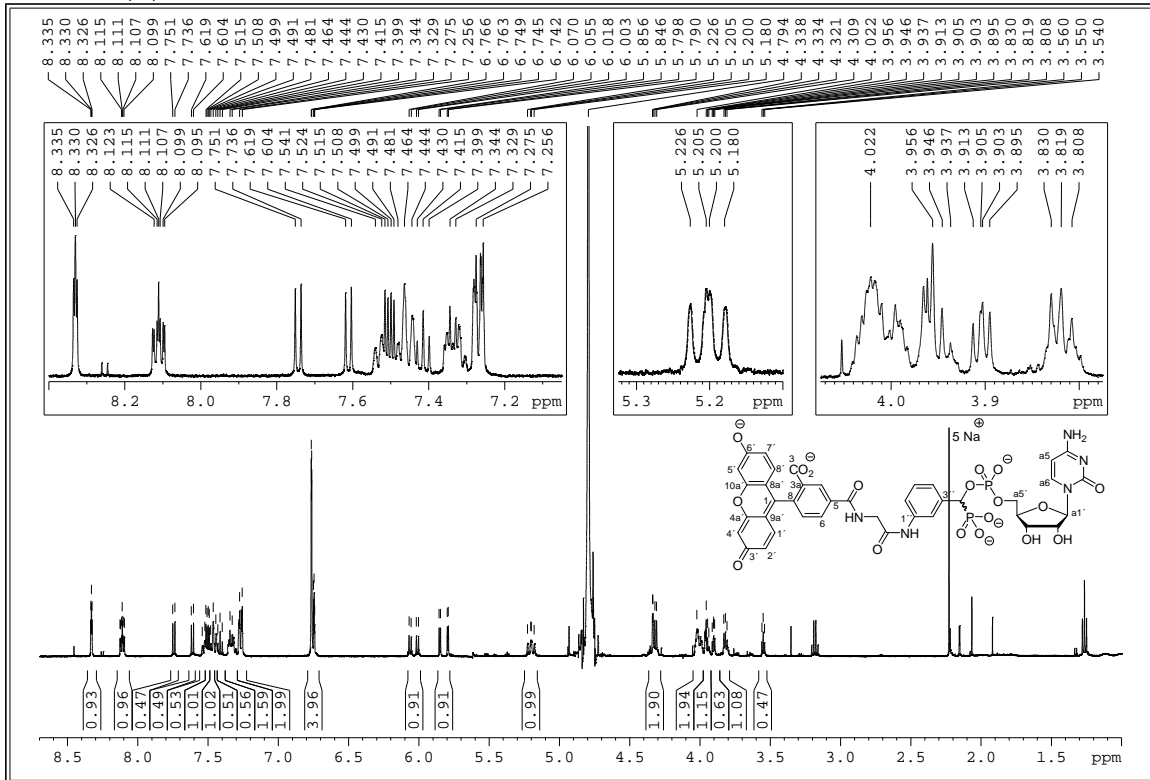
ESI-TOF-MS Spektrum der Verbindung (**R**)-**8-p**-(**6**) (neg. Modus)

(S)-8-p-(6)¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **(S)-8-p-(6)** (300 MHz, D₂O)DQF-COSY-Spektrum der Verbindung **(S)-8-p-(6)** (300 MHz, D₂O)

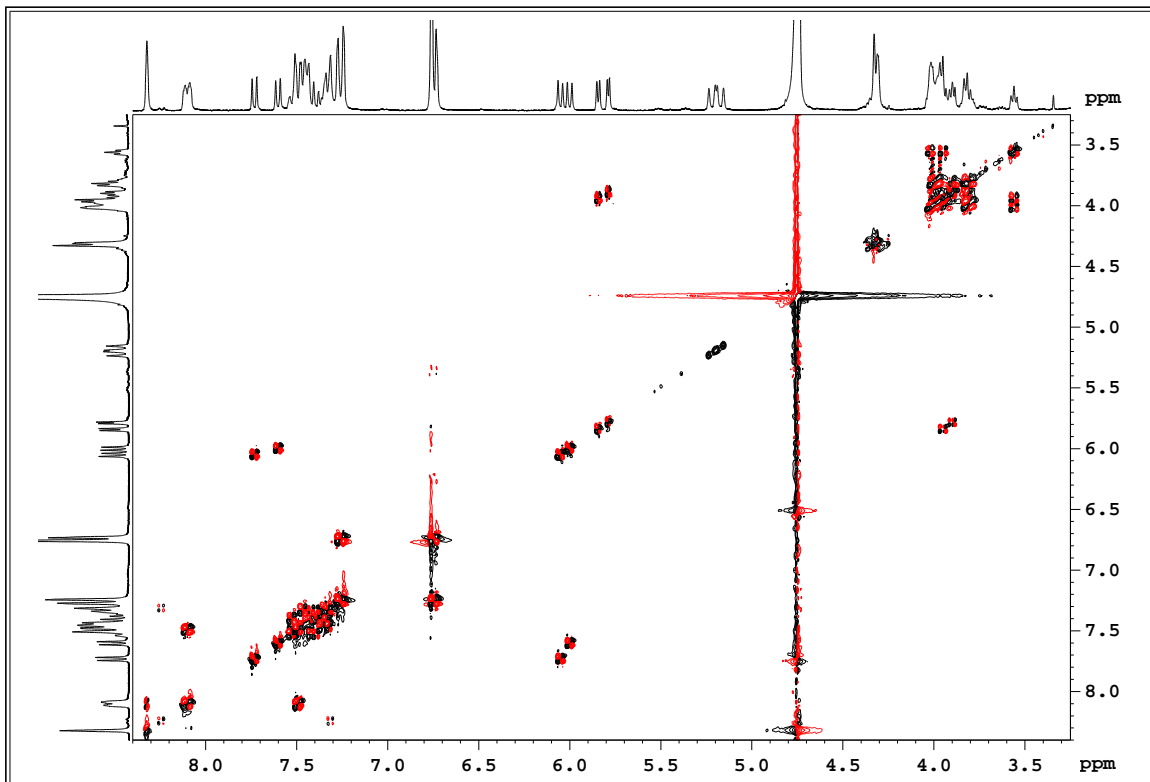


ESI-TOF-MS Spektrum der Verbindung (*S*)-8-*p*-(6) (neg. Modus)

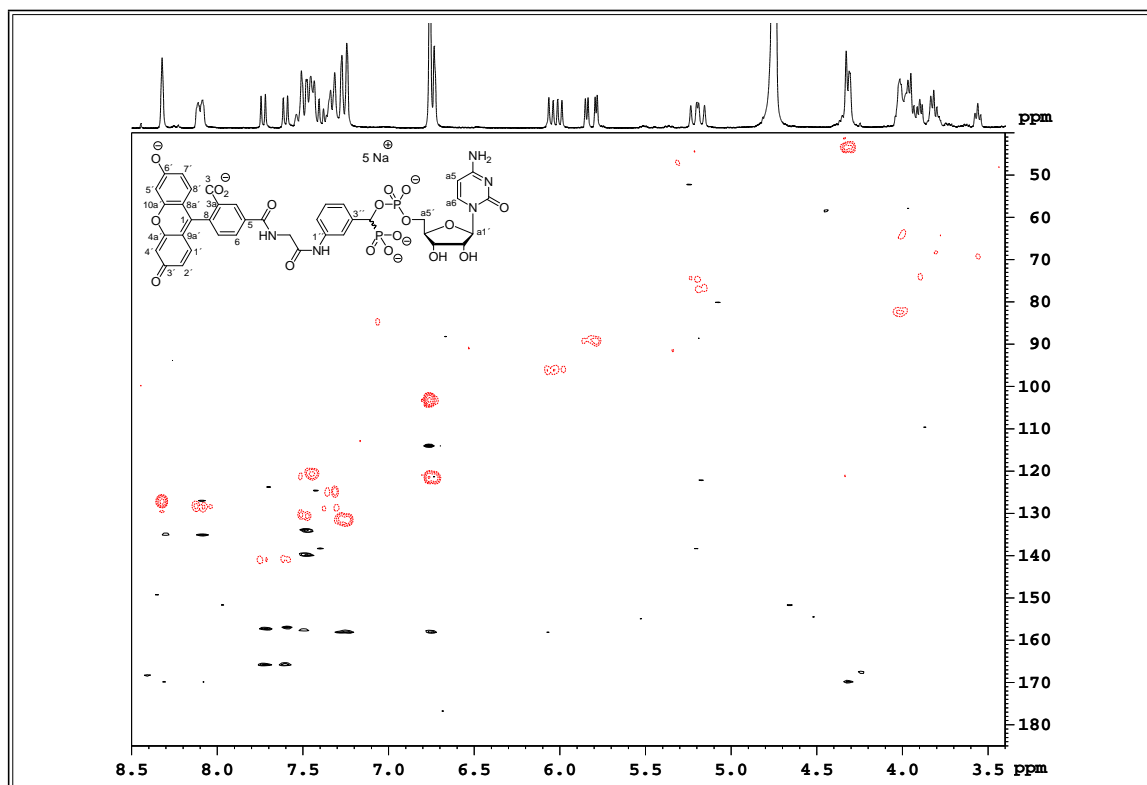
8-m-G-(5)



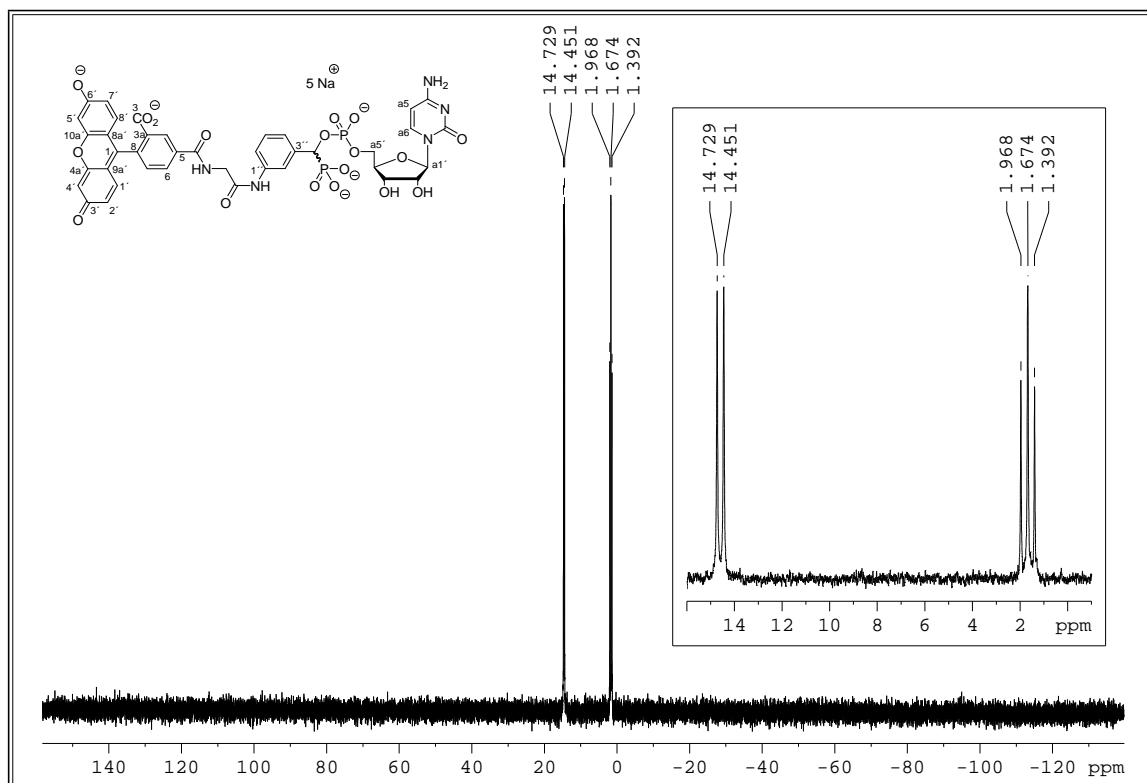
¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 8-m-G-(5) (500 MHz, D₂O)



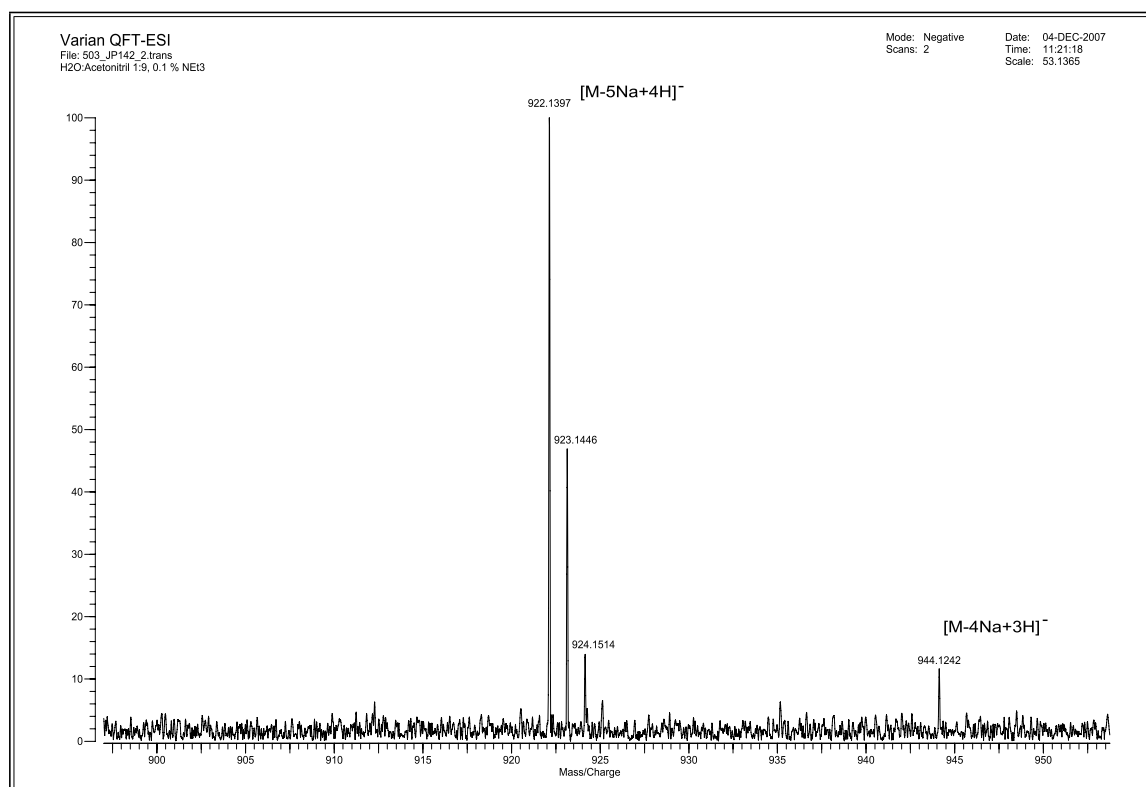
DQF-COSY-Spektrum der Verbindung 8-m-G-(5) (300 MHz, D₂O)

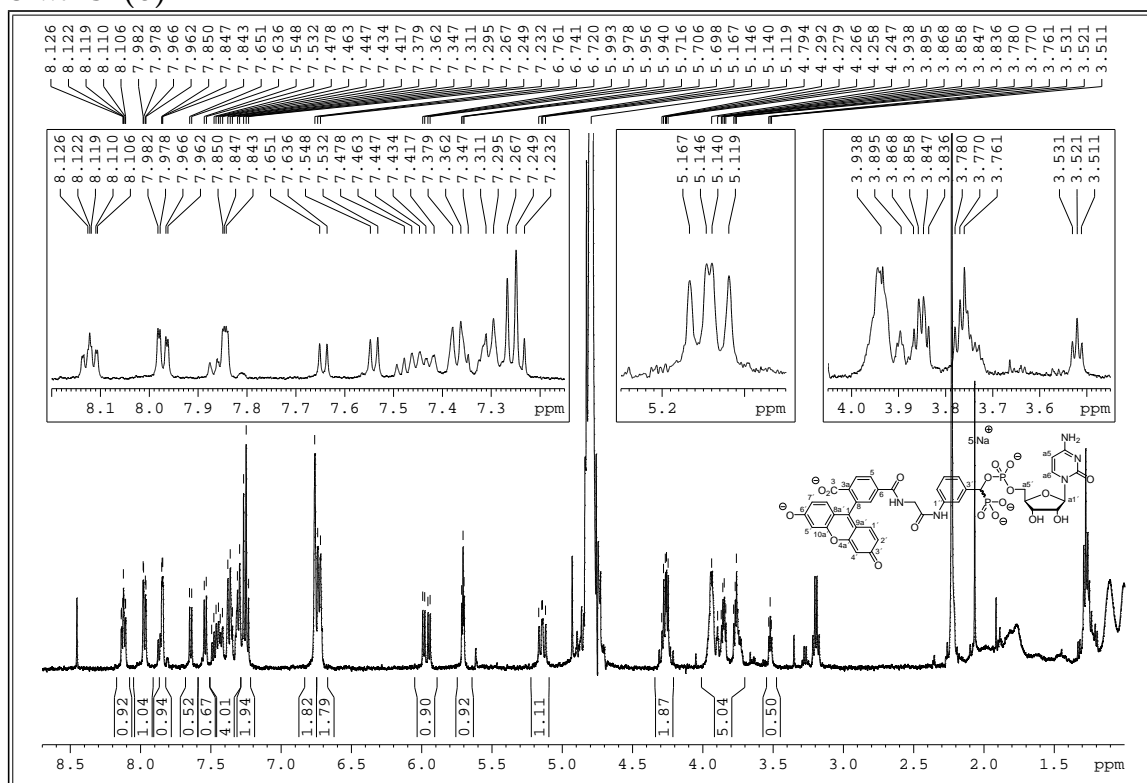
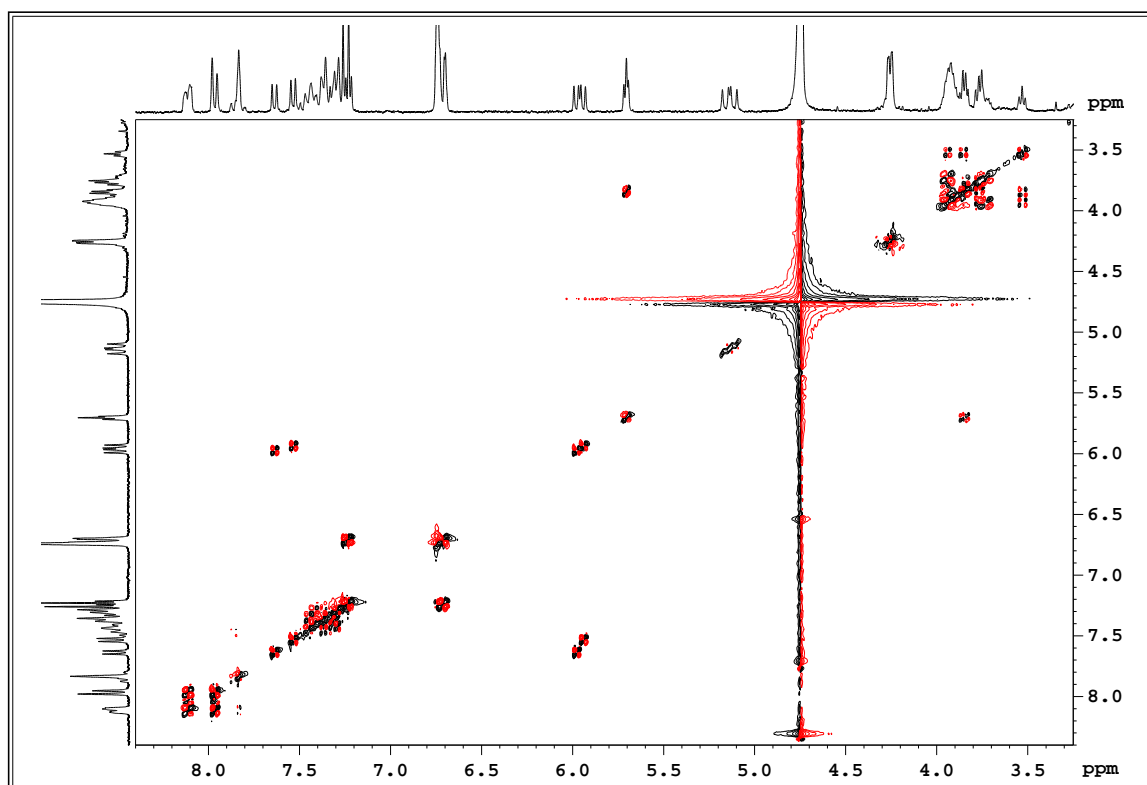


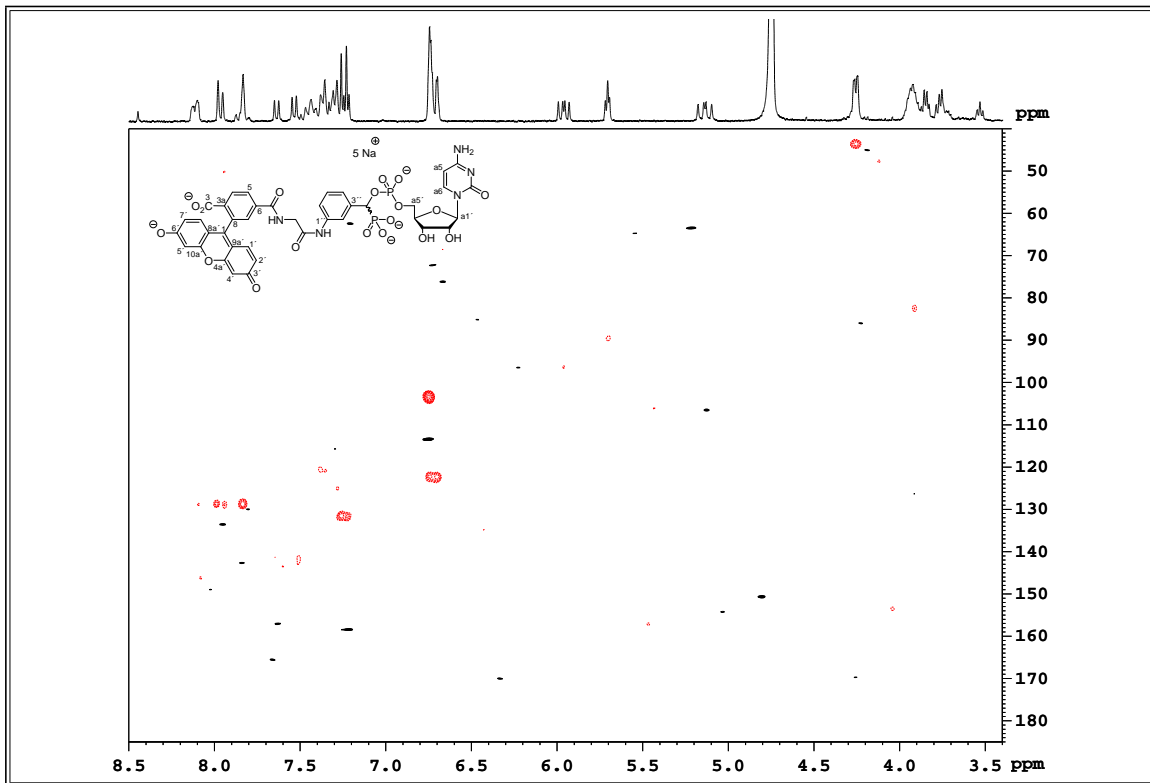
HMBC- (rot) und HMQC-Spektren (schwarz) der Verbindung **8-m-G-(5)** (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 76 MHz, D_2O)



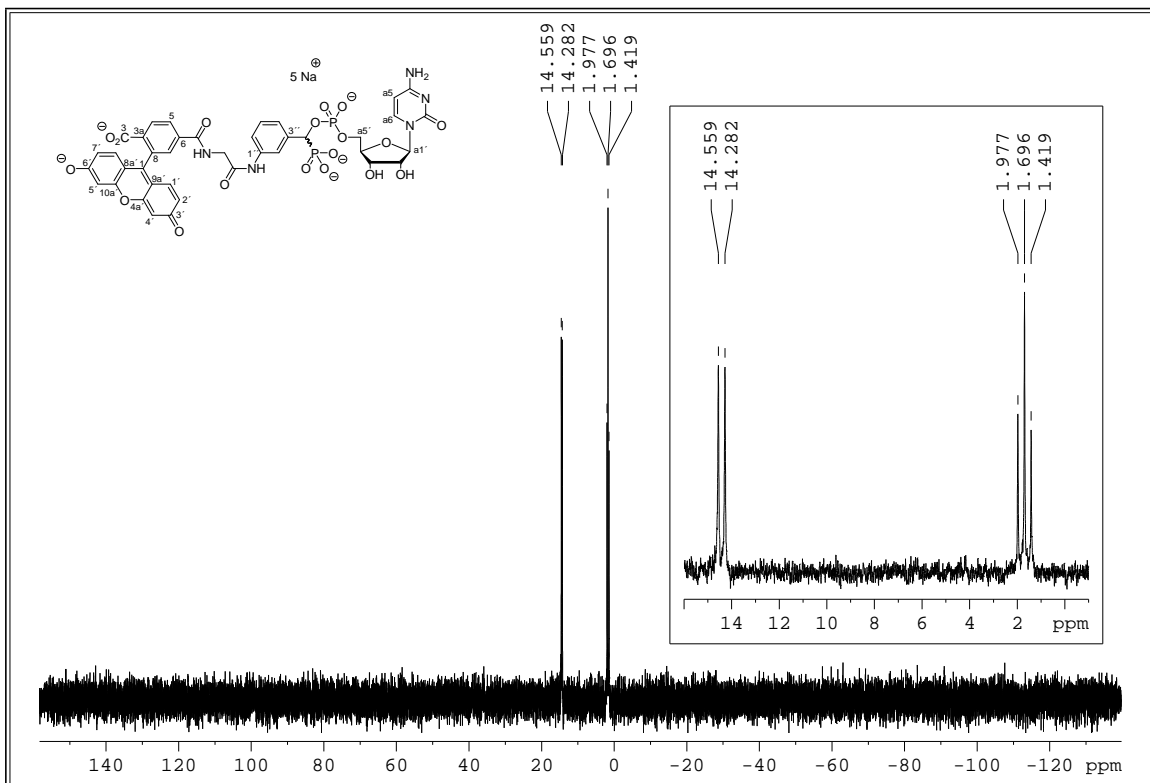
^{31}P -NMR-Spektrum der Verbindung **8-m-G-(5)** (122 MHz, D_2O)

ESI-FTICR-MS Spektrum der Verbindung **8-*m*-G-(5)** (neg. Modus)

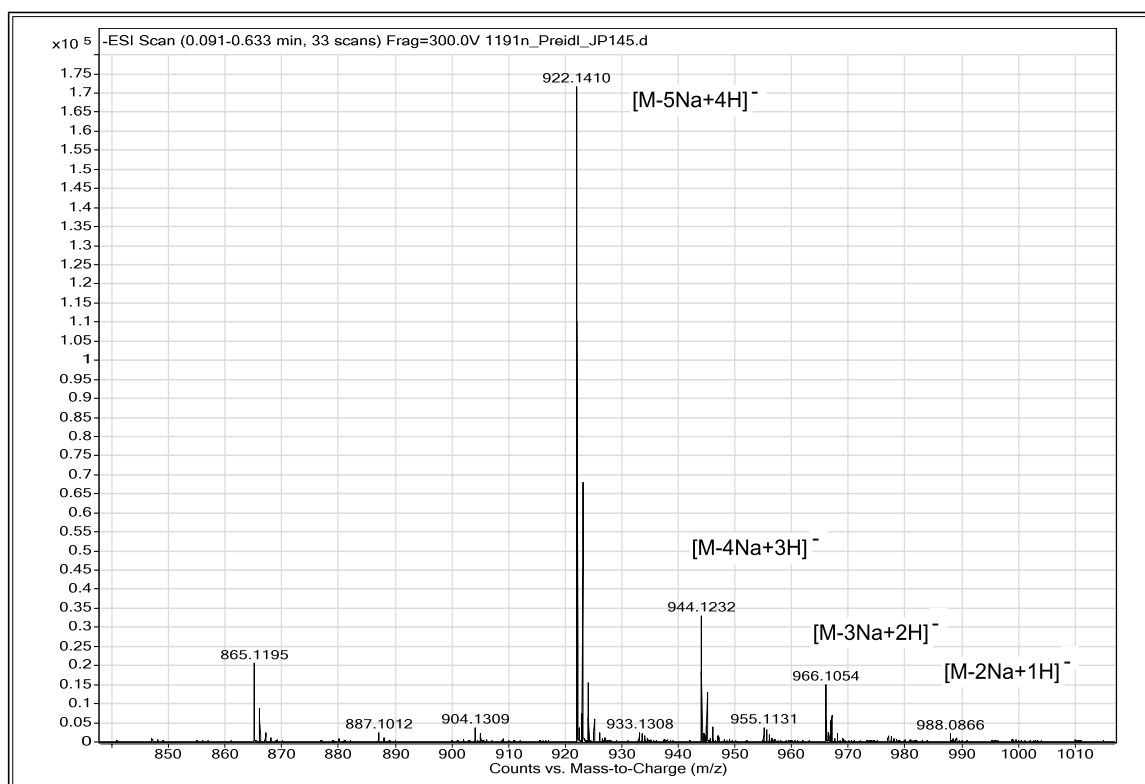
8-*m*-G-(6) $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 8-*m*-G-(6) (500 MHz, D_2O)DQF-COSY-Spektrum der Verbindung 8-*m*-G-(6) (300 MHz, D_2O)



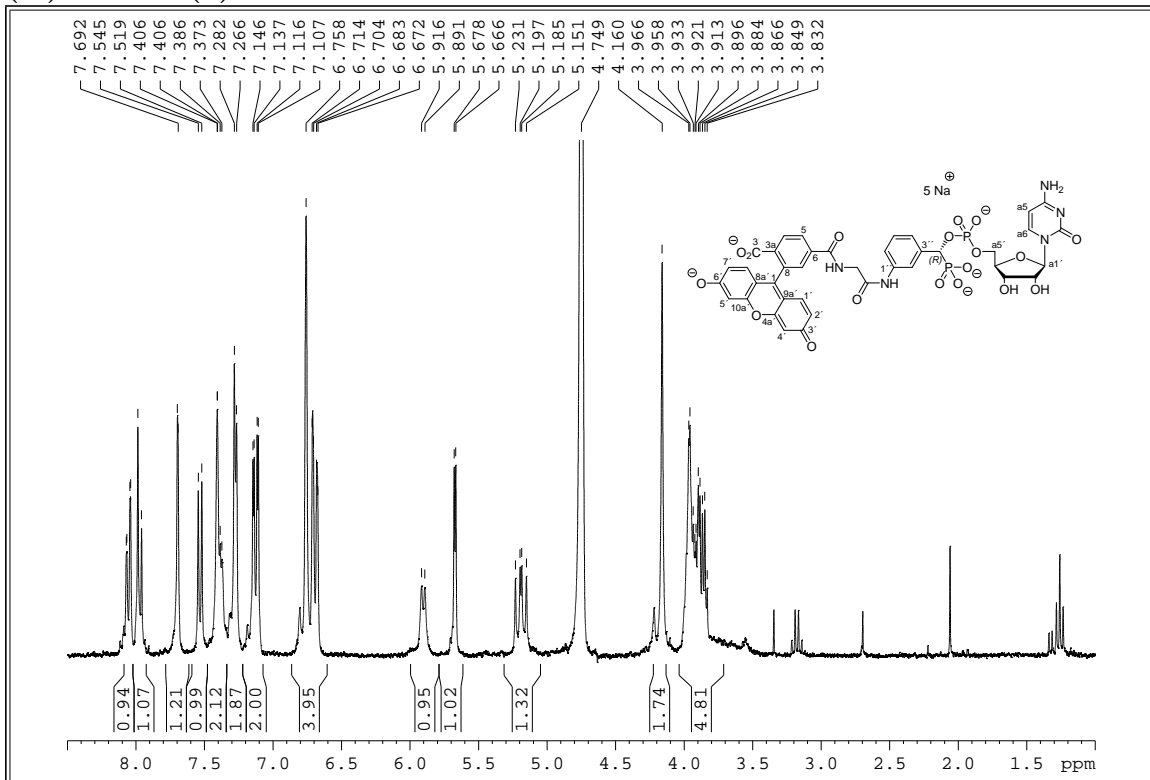
HMQC- (rot) und HMBC-Spektren (schwarz) der Verbindung **8-m-G(6)** (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 76 MHz, D_2O)



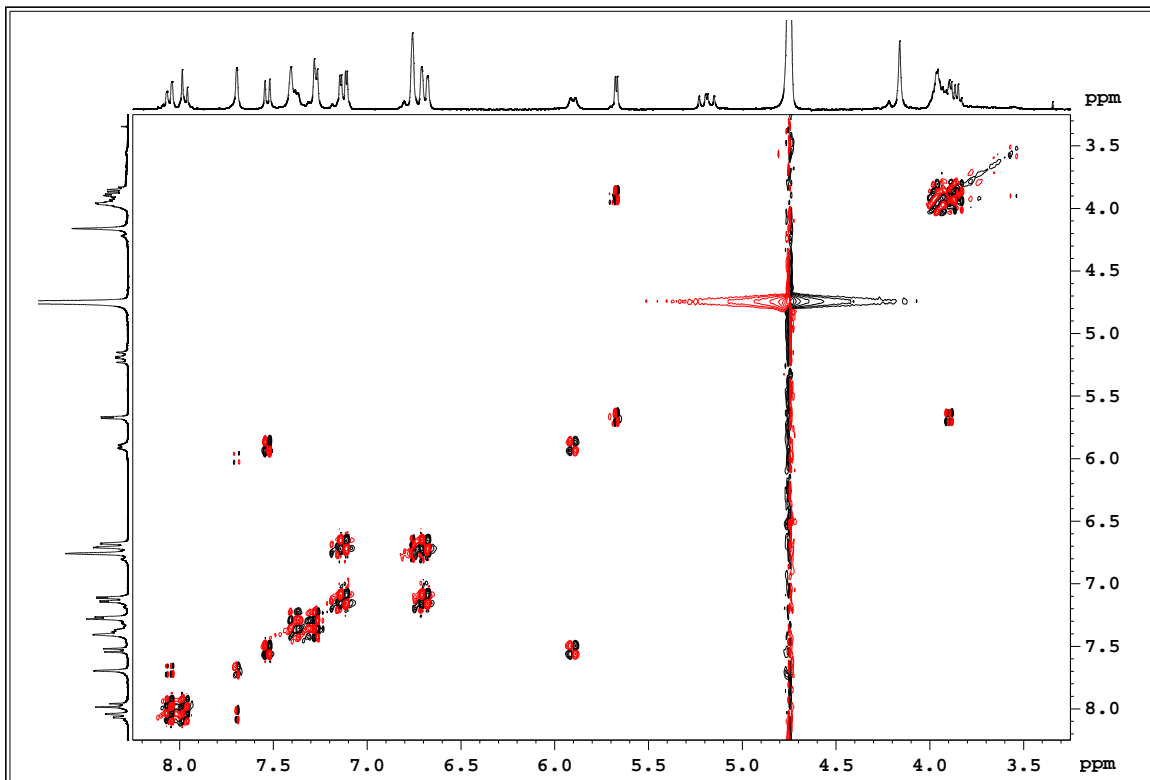
^{31}P -NMR-Spektrum der Verbindung **m-8-G(5)** (122 MHz, D_2O)

ESI-TOF-MS Spektrum der Verbindung **8-*m*-G-(6)** (neg. Modus)

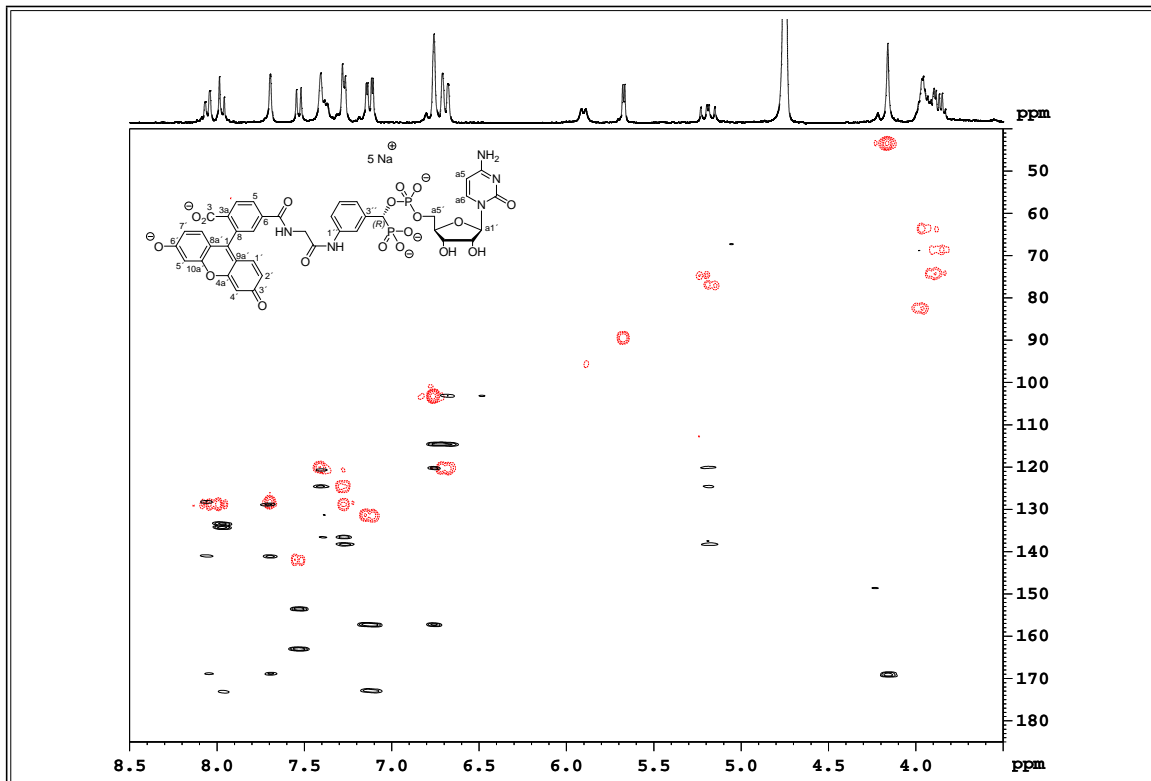
(R)-8-m-G-(6)



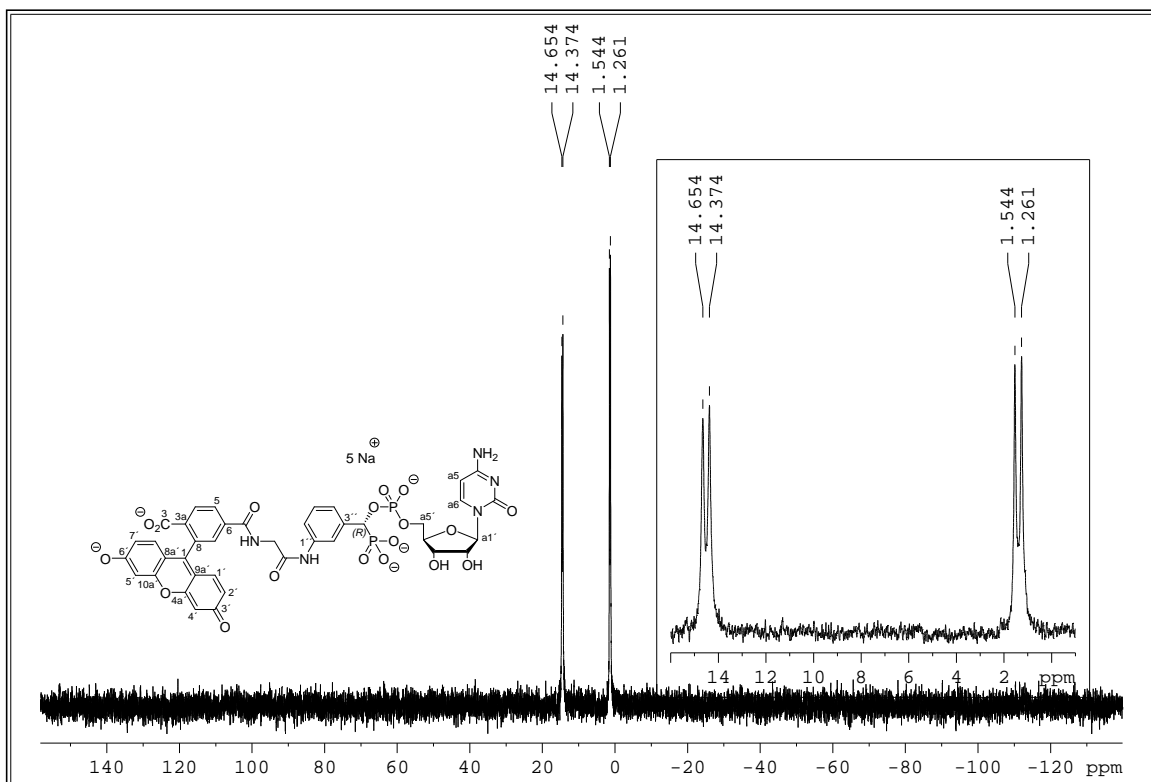
¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **(R)-8-m-G-(6)** (300 MHz, D₂O)



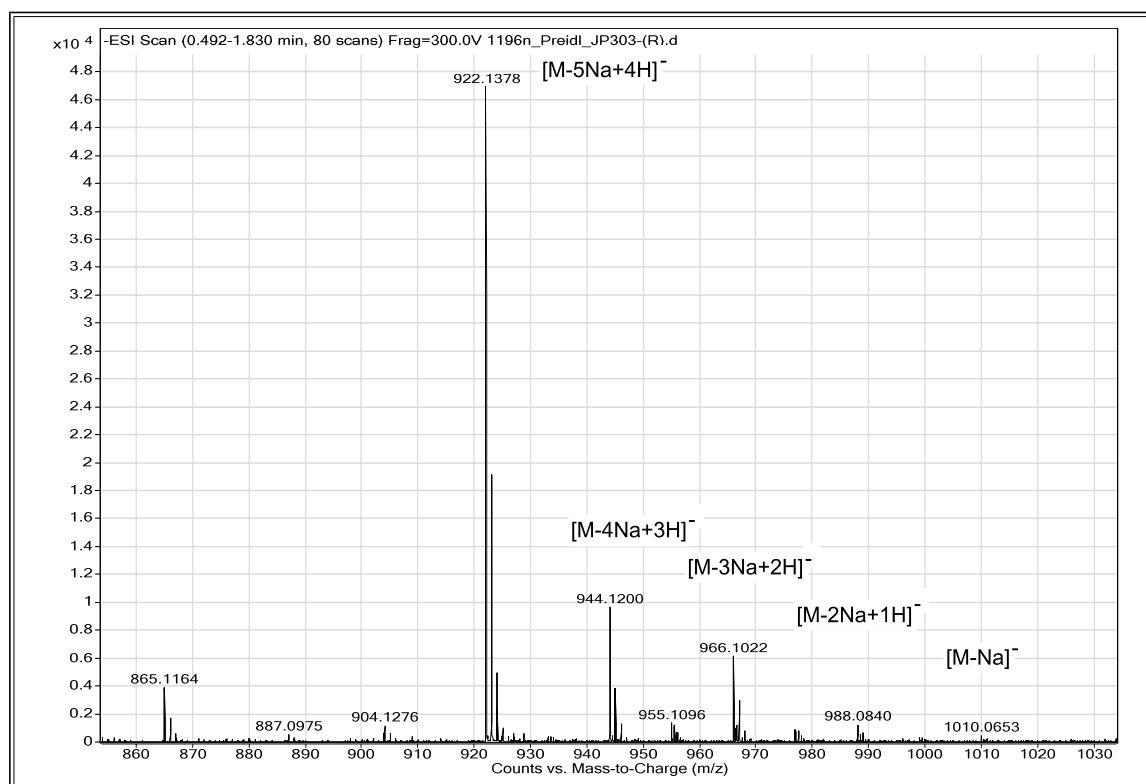
DQF-COSY-Spektrum der Verbindung **(R)-8-m-G-(6)** (300 MHz, D₂O)

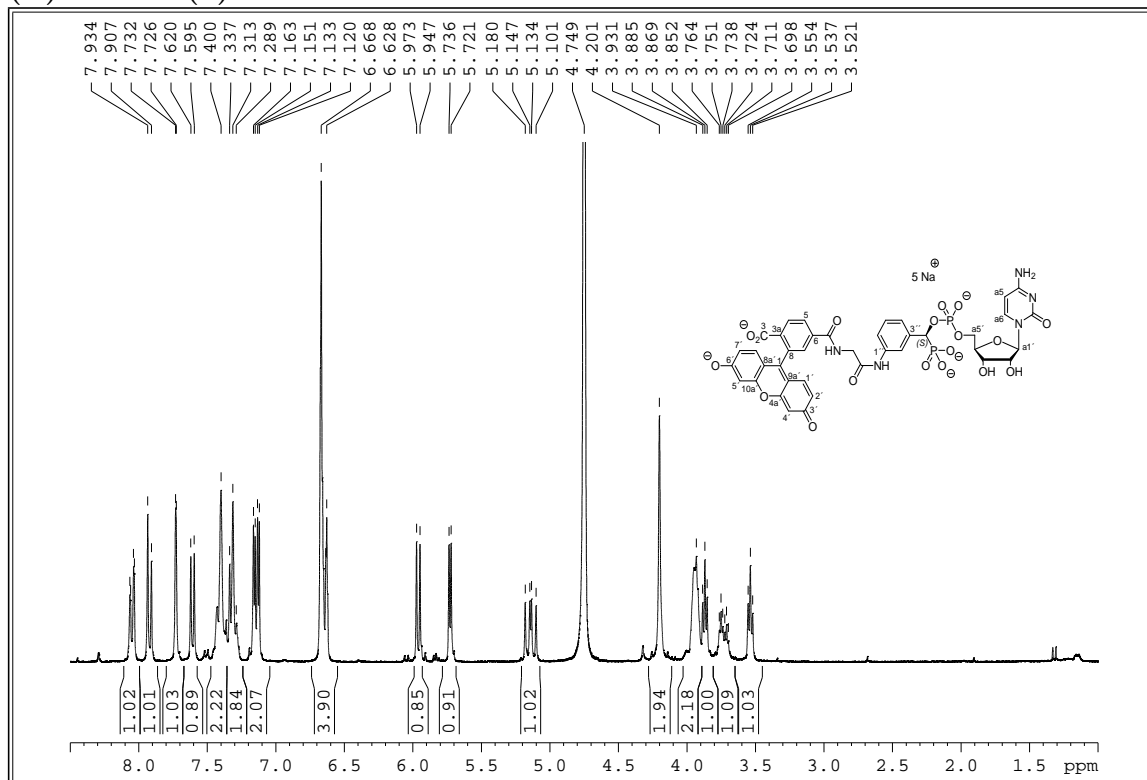
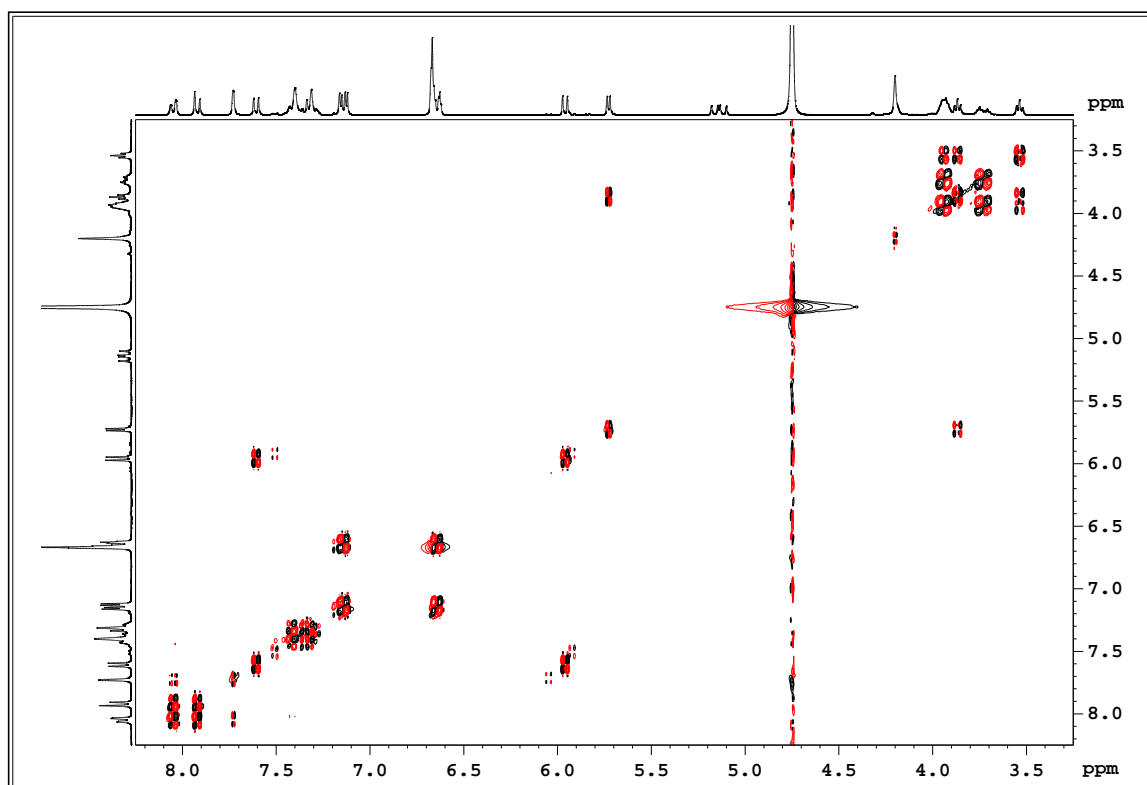


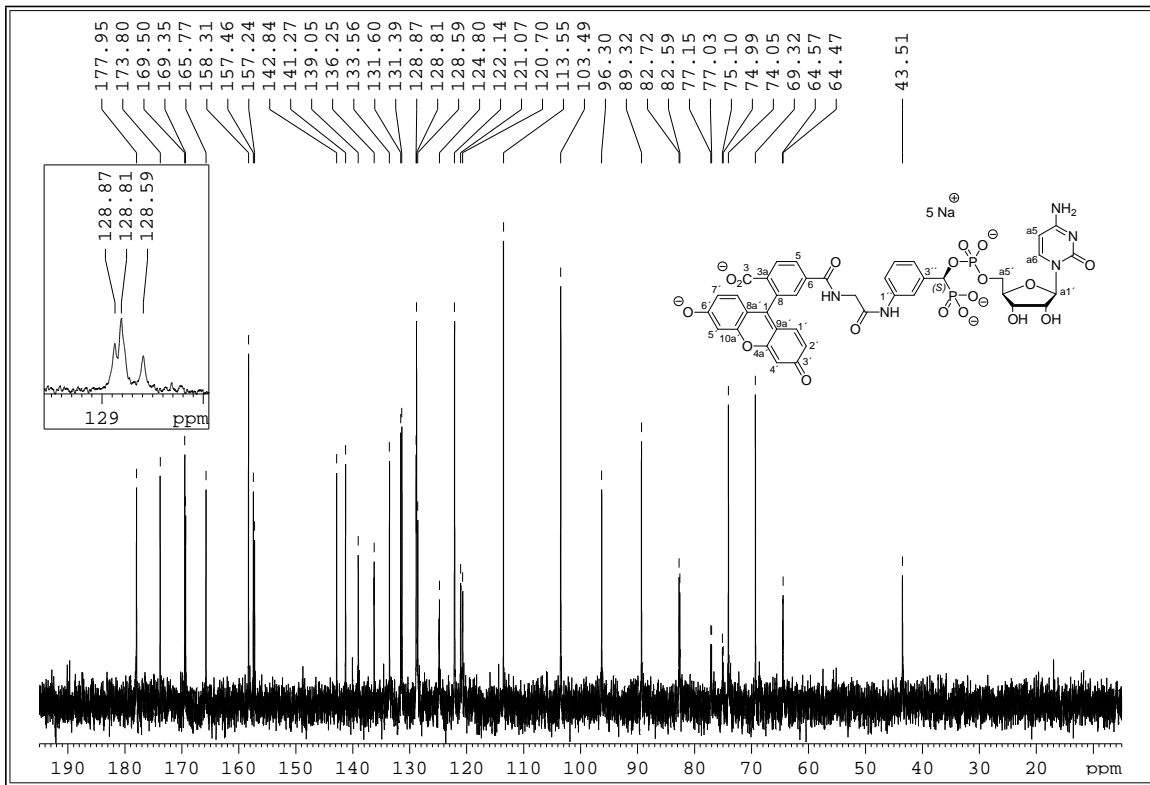
HMBC- (rot) und HMBC-Spektren (schwarz) der Verbindung (*R*)-8-*m*-G-(6) (^1H : 300 Mhz; ^{13}C : 76 MHz, D_2O)



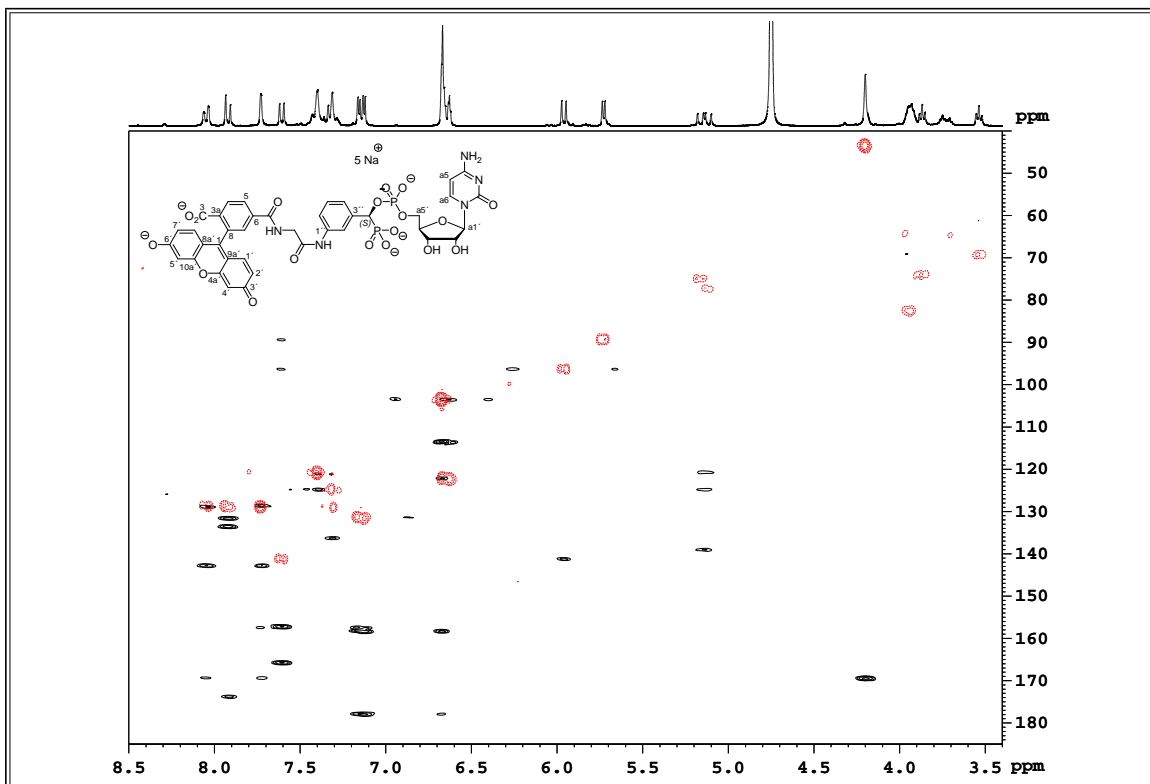
^{31}P -NMR-Spektrum der Verbindung (*R*)-8-*m*-G-(6) (122 MHz, D_2O)

ESI-TOF-MS Spektrum der Verbindung (*R*)-8-*m*-G-(6) (neg. Modus)

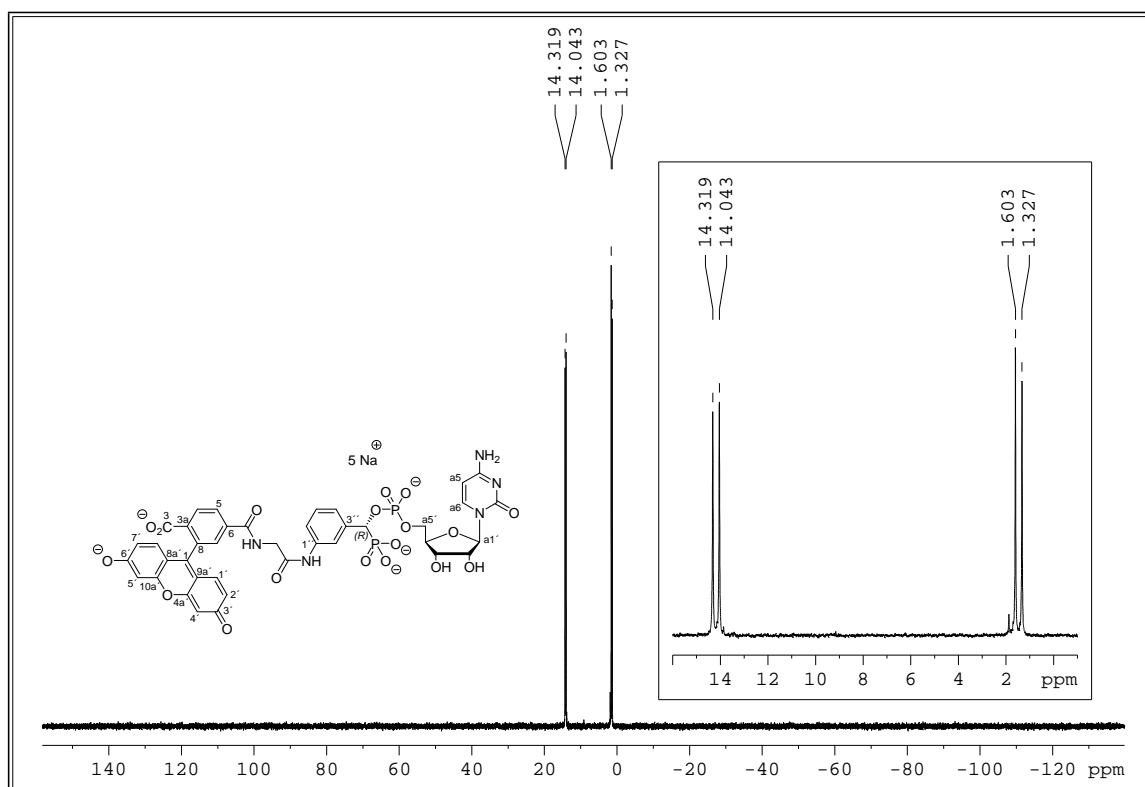
(S)-8-m-G-(6)¹H-NMR-Spektrum der Verbindung (S)-8-m-G-(6) (300 MHz, D₂O)DQF-COSY-Spektrum der Verbindung (S)-8-m-G-(6) (300 MHz, D₂O)



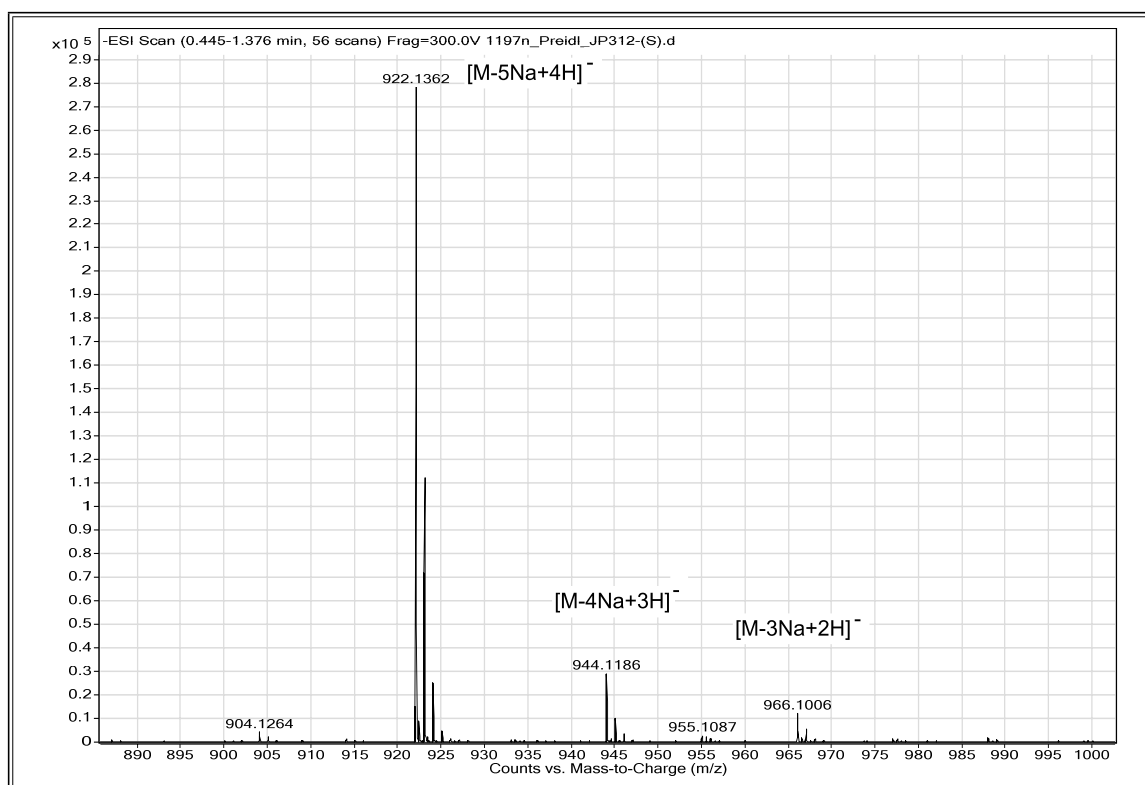
^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung (*S*)-8-*m*-G-(6) (76 MHz, D_2O)



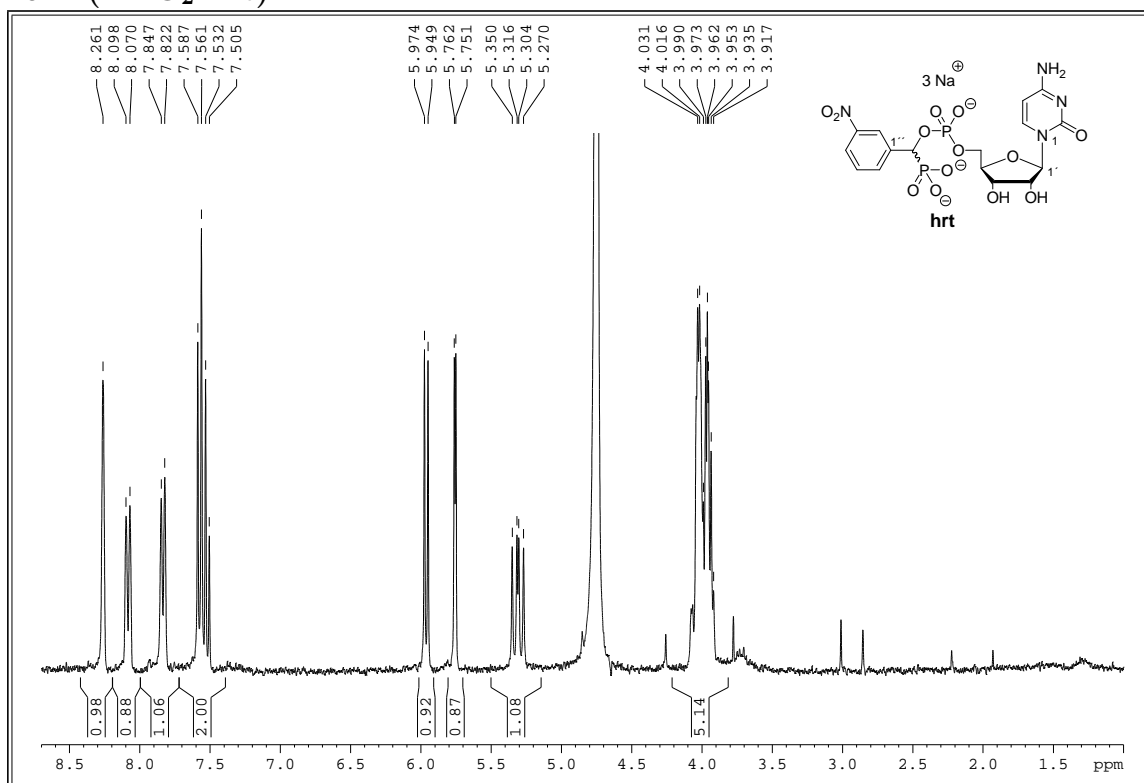
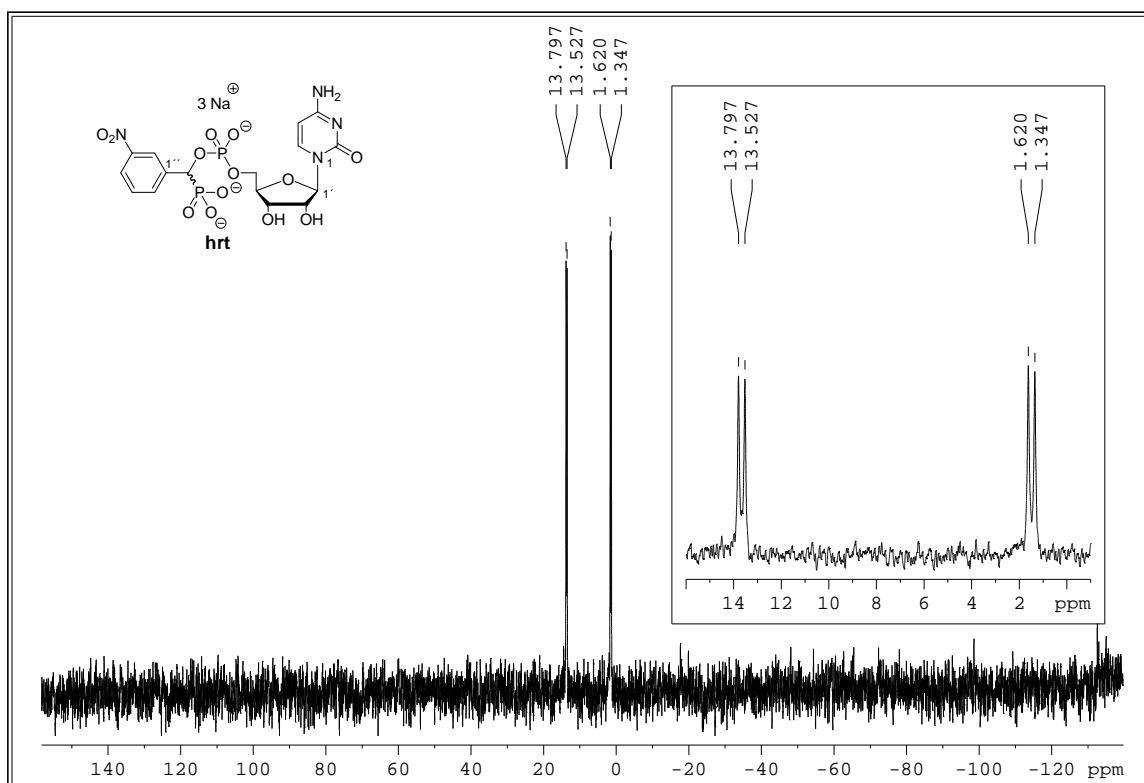
HMQC- (rot) und HMBC-Spektren (schwarz) der Verbindung (*S*)-8-*m*-G-(6) (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 76 MHz, D_2O)

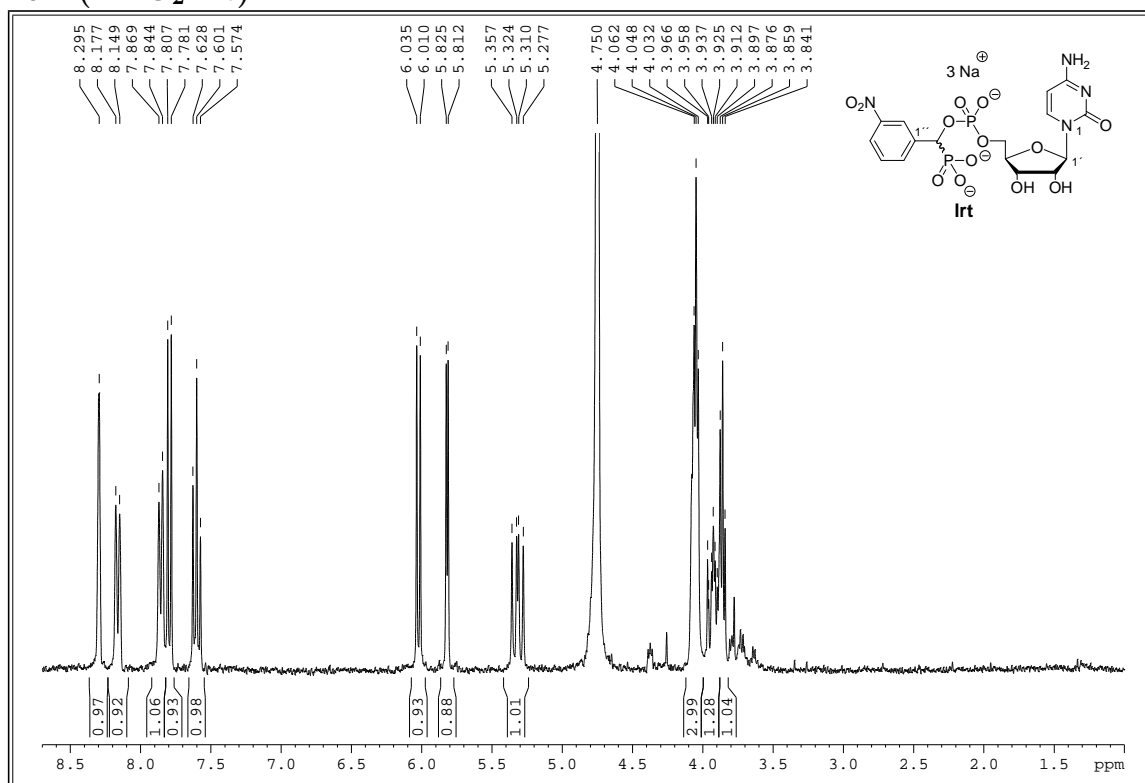
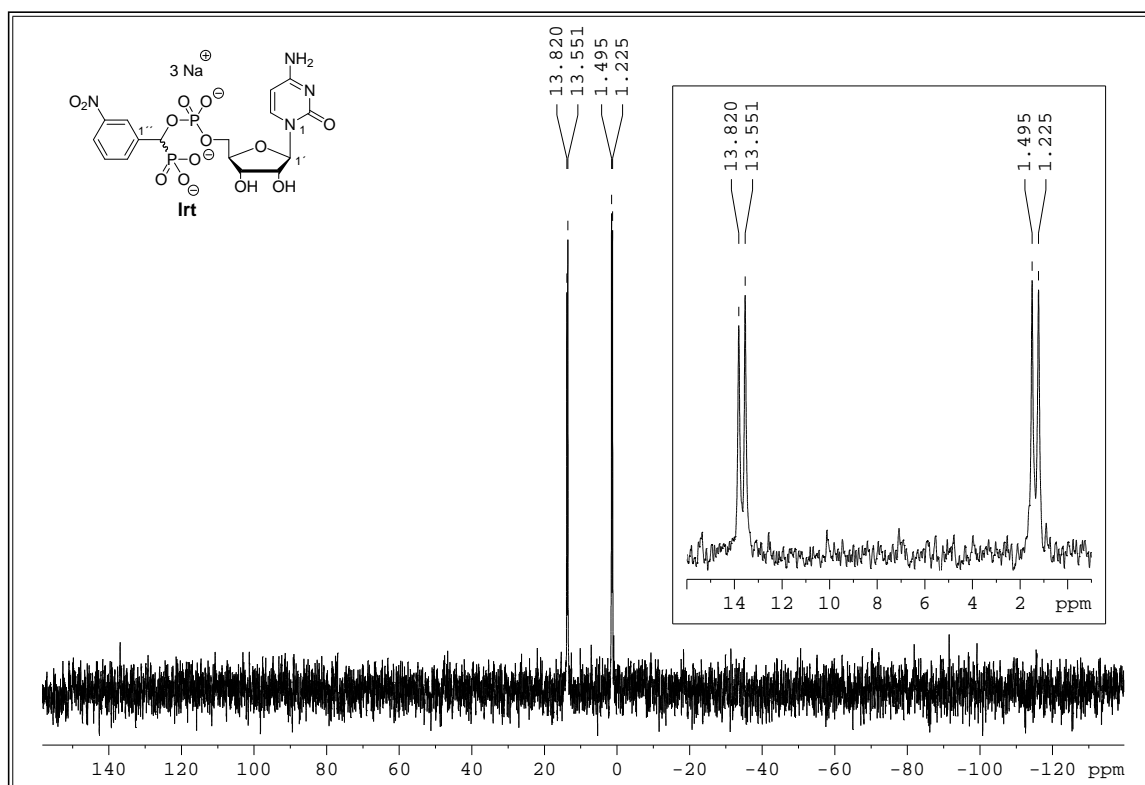


^{31}P -NMR-Spektrum der Verbindung (S) -8-*m*-G-(6) (122 MHz, D_2O)

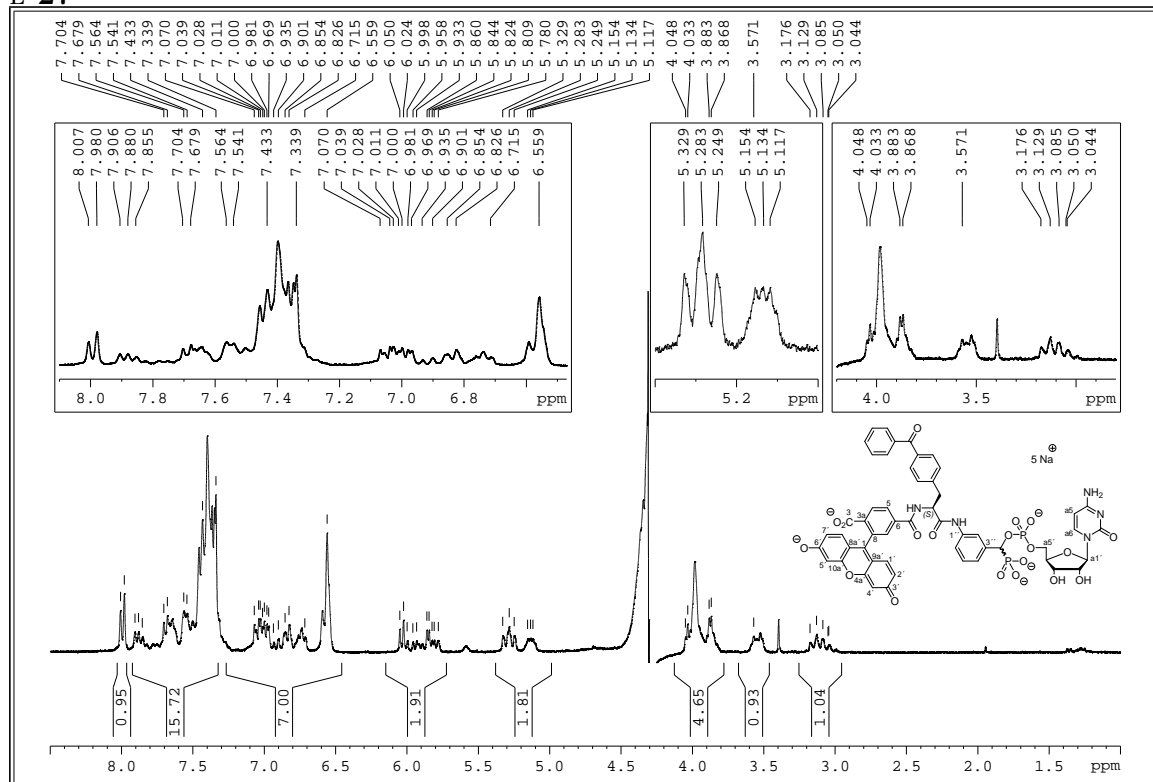


ESI-TOF-MS Spektrum der Verbindung (S) -8-*m*-G-(6) (neg. Modus)

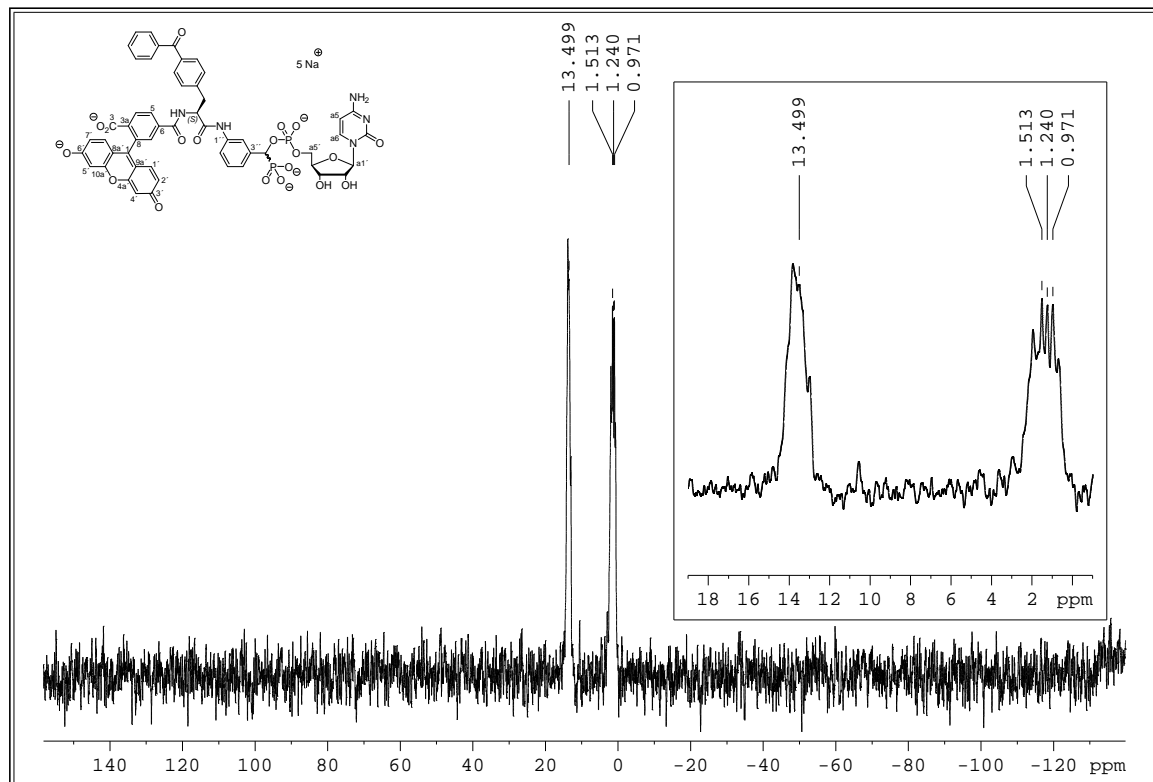
19-h (I-NO₂-hrt)¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **19-h** (300 MHz, D₂O)³¹P-NMR-Spektrum der Verbindung **19-h** (122 MHz, D₂O)

19-1 (I-NO₂-lrt)¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **19-1** (300 MHz, D₂O)³¹P-NMR-Spektrum der Verbindung **19-1** (122 MHz, D₂O)

L-27

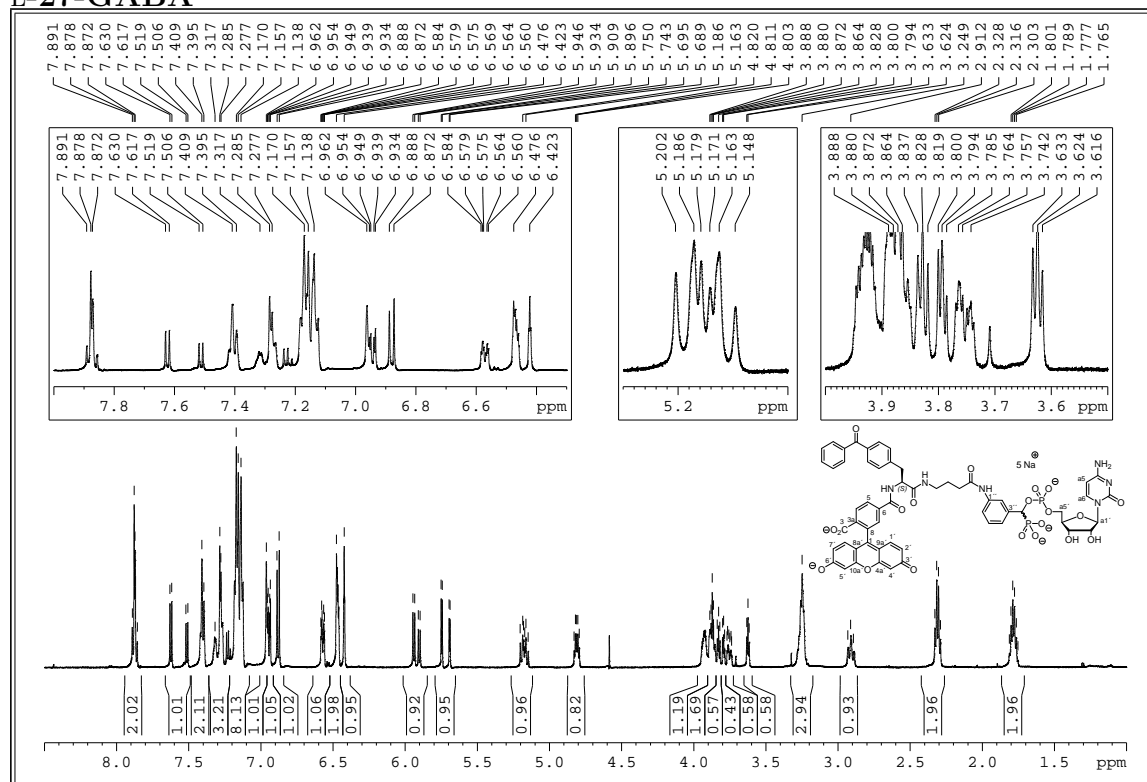


¹H-NMR-Spektrum der Verbindung L-27 (300 MHz, D₂O, presat)

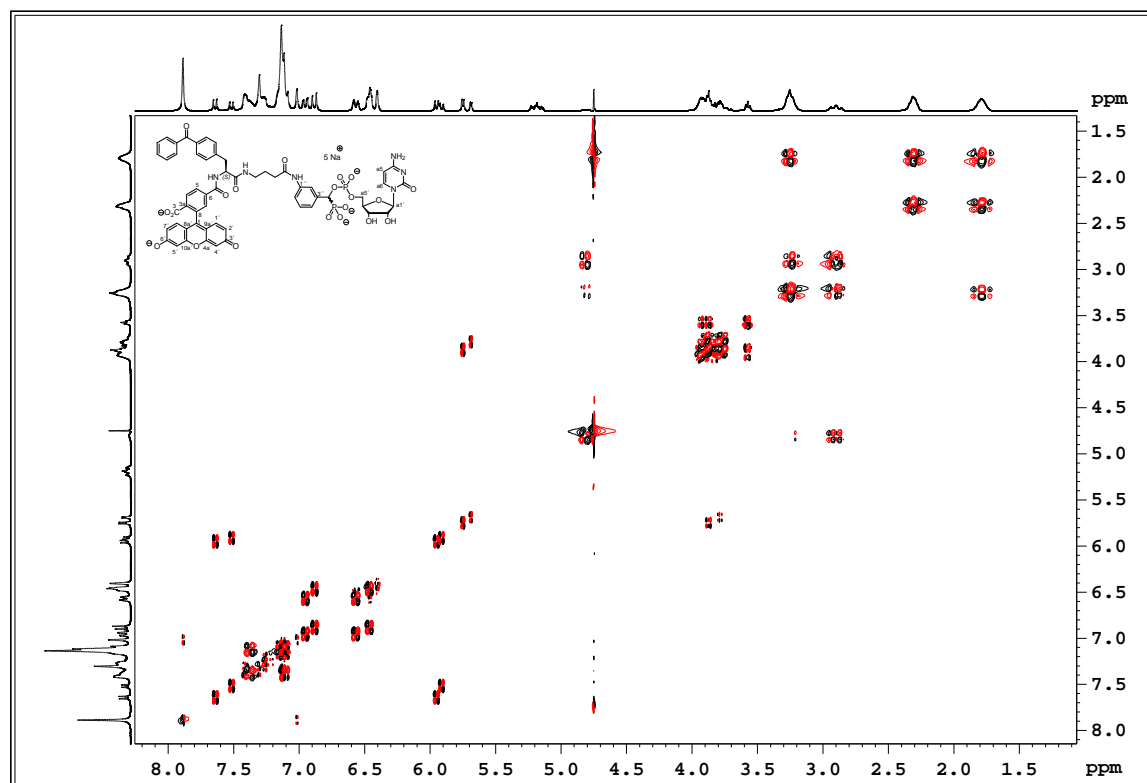


³¹P-NMR-Spektrum der Verbindung L-27 (122 MHz, D₂O, 340 K)

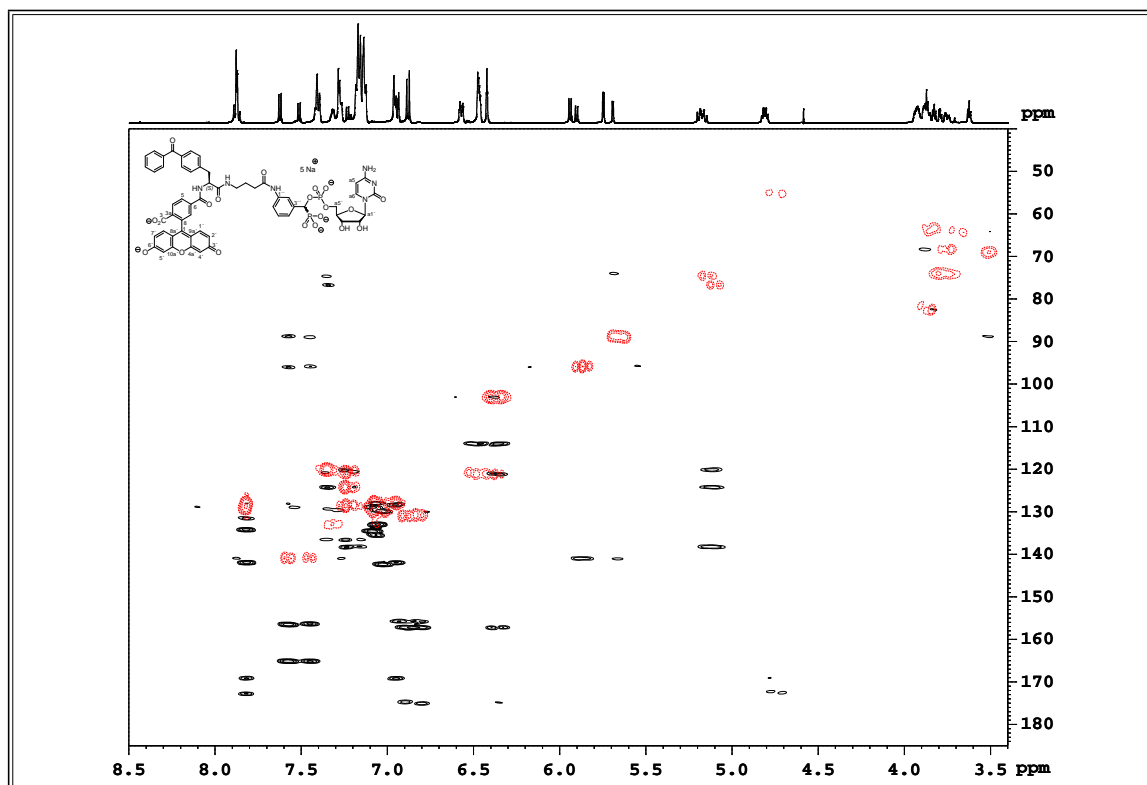
L-27-GABA



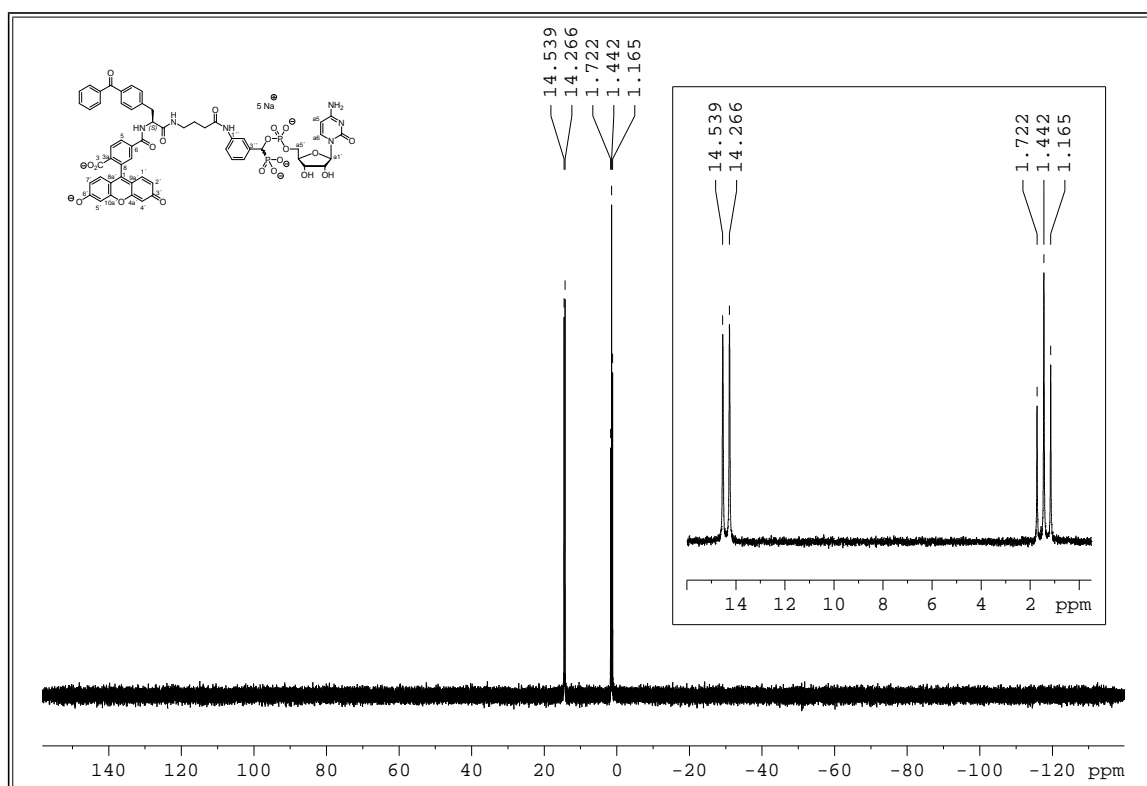
¹H-NMR-Spektrum der Verbindung L-27-GABA (600 MHz, D₂O, presat)



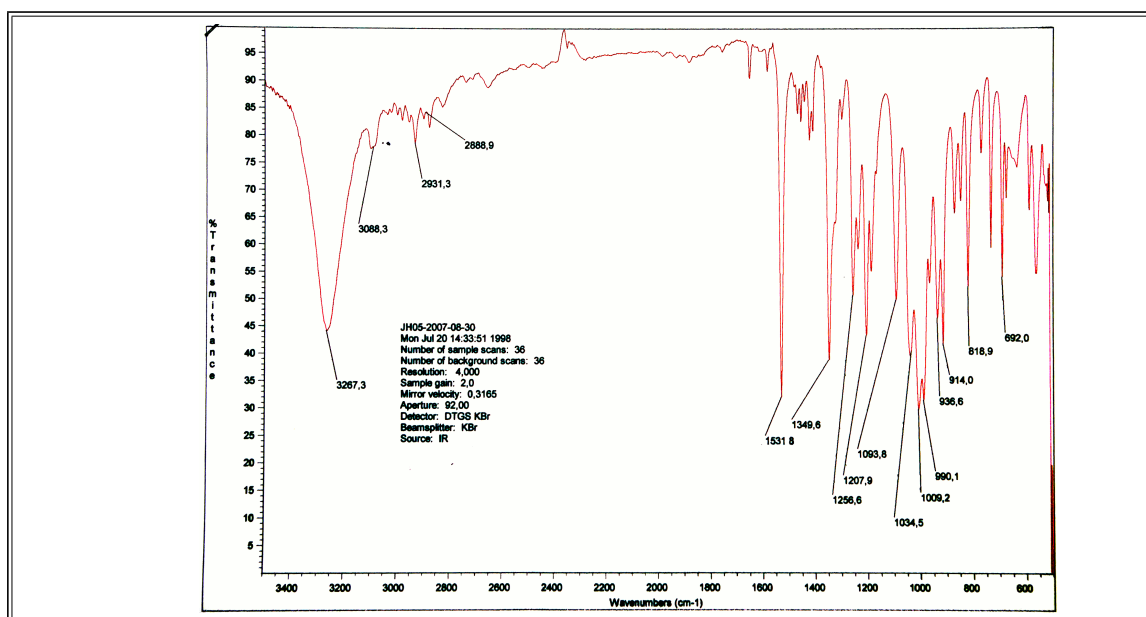
DQF-COSY-Spektrum der Verbindung L-27-GABA (300 MHz, D₂O)



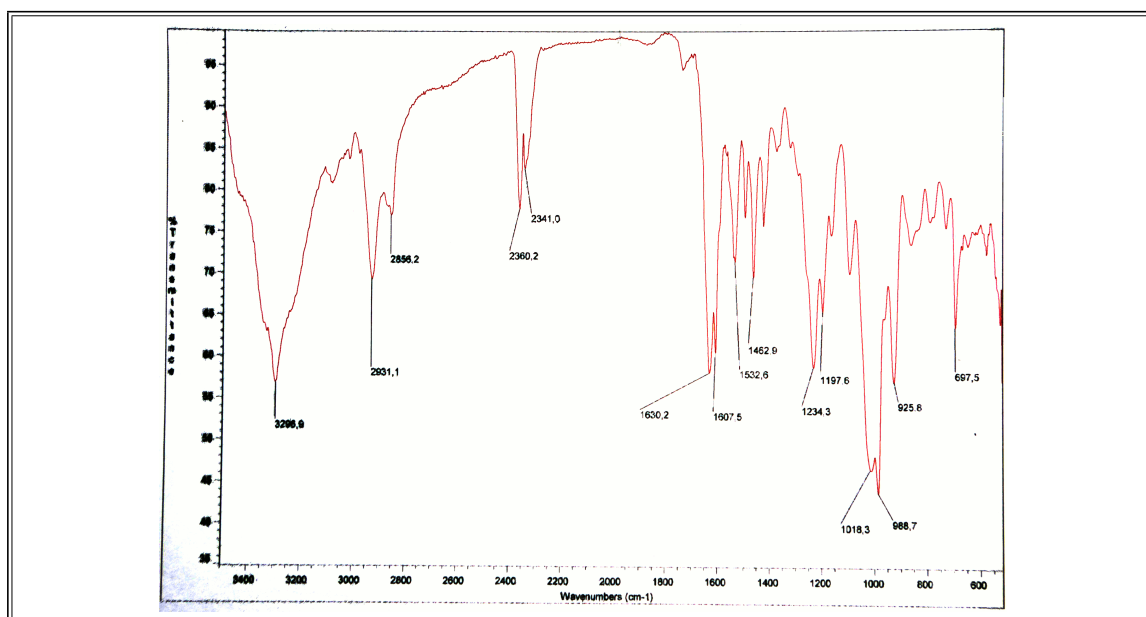
HMQC- (rot) und HMBC-Spektren (schwarz) der Verbindung L-27-GABA

 ^{31}P -NMR-Spektrum der Verbindung L-27-GABA (122 MHz, D_2O)

A.1.2. IR-Spektren



ATR-IR Spektrum der Verbindung **14-m**



ATR-IR Spektrum der Verbindung **16-m**

A.2. Formeln für die K_i -Berechnung

Die Berechnung der K_i -Werte für die Inhibitoren erfolgte nach der Methode von COLESKA und WANG unter der Verwendung folgender Formeln^[202,259]:

$$K_i = \frac{[I]_{50}}{\left(\frac{[L]_{50}}{K_D} + \frac{[P]_0}{K_D} + 1\right)} \quad (\text{A.1})$$

$$[I]_{50} = IC_{50} - [P_0] + [PL_{50}] \left(1 + \frac{K_D}{[L]_{50}}\right) \quad (\text{A.2})$$

$$P_0 = \frac{-(K_D + [L]_T - [P]_T) + \sqrt{(K_D + [L]_T - [P]_T)^2 + 4 \cdot [P]_T \cdot K_D}}{2} \quad (\text{A.3})$$

$$[PL]_0 = [P]_T - [P_0] \quad (\text{A.4})$$

$$[PL]_{50} = [PL_0]/2 \quad (\text{A.5})$$

$$[L]_0 = [L]_T - [PL_0] \quad (\text{A.6})$$

$$[L]_{50} = [L]_T - [PL_{50}] \quad (\text{A.7})$$

Mit:

K_D	Dissoziationskonstante des Protein-Sonden-Komplexes
$[L]_T$	Gesamtkonzentration der Sonde
$[P]_T$	Gesamtkonzentration des Proteins
IC_{50}	Gesamtkonzentration des Inhibitors bei 50 % Inhibition
$[I]_{50}$	Konzentration des freien Inhibitors bei 50 % Inhibition
$[L]_{50}$	Konzentration der freien Sonde bei 50 % Inhibition
$[PL]_{50}$	Konzentration des Protein-Sonden-Komplexes bei 50 % Inhibition
$[P]_0$	Konzentration des freien Proteins bei 0 % Inhibition
$[PL]_0$	Konzentration des Protein-Sonden-Komplexes bei 0 % Inhibition

A.3. Screening

A.3.1. Primärhits

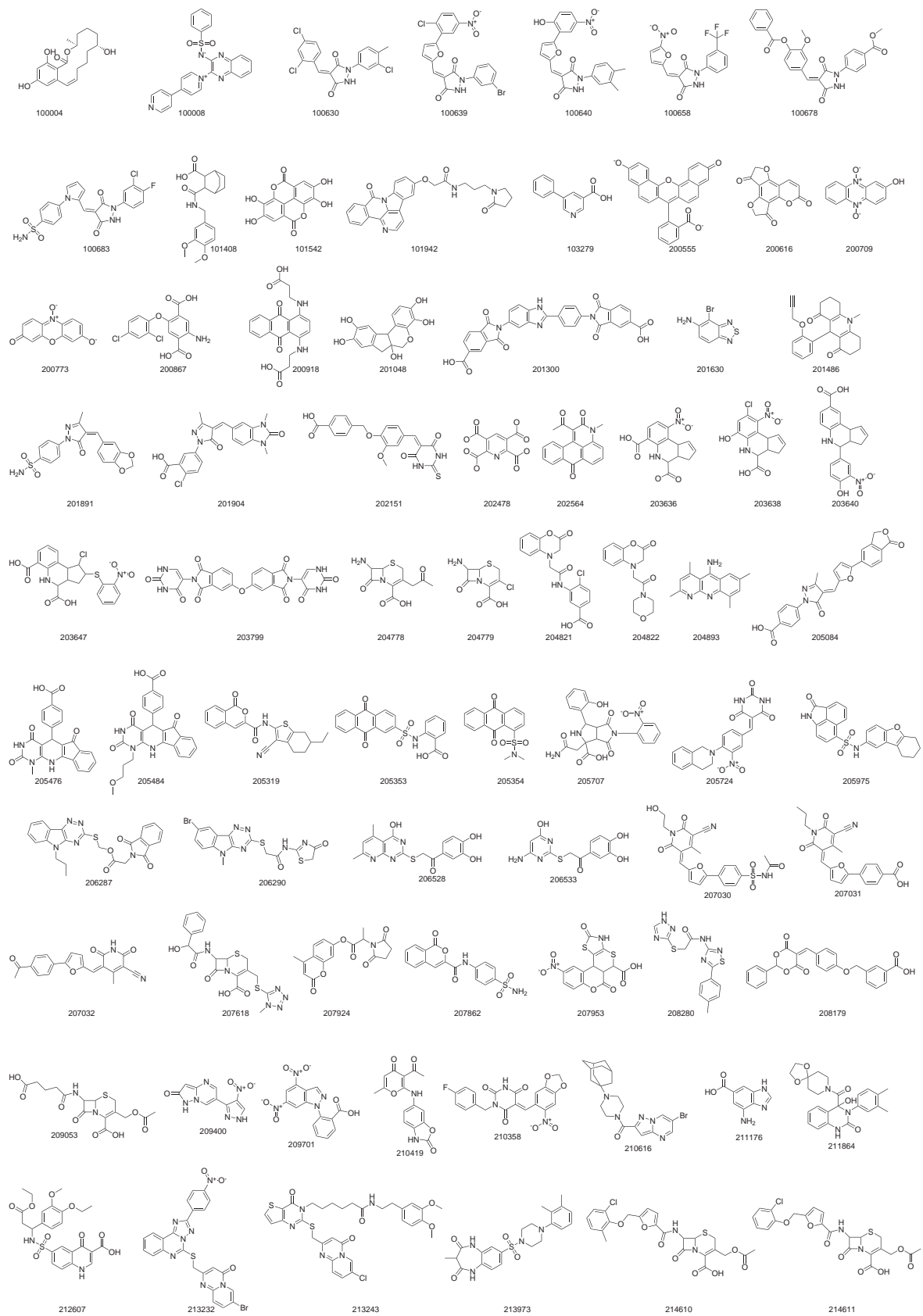


Abb. A.1.: Hiliste 1/2

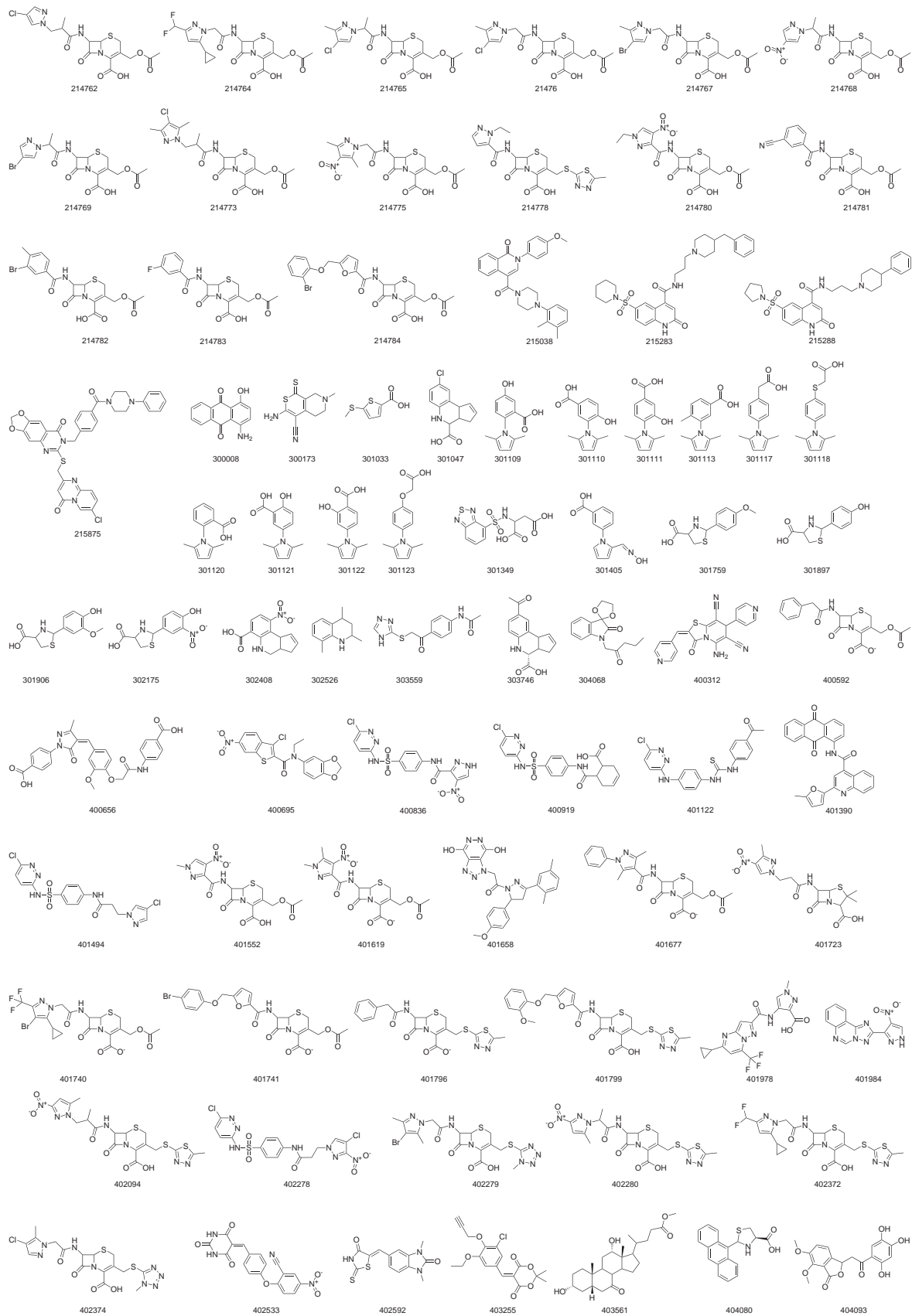
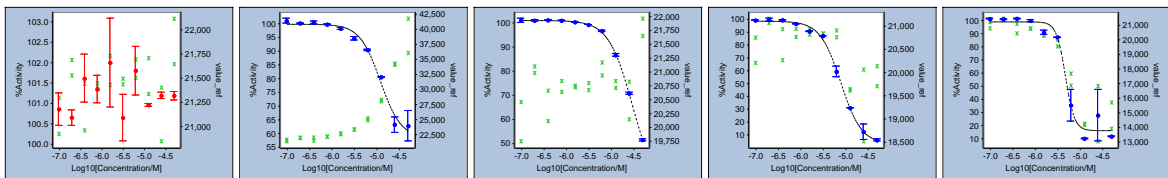


Abb. A.2.: Hiliste 2/2

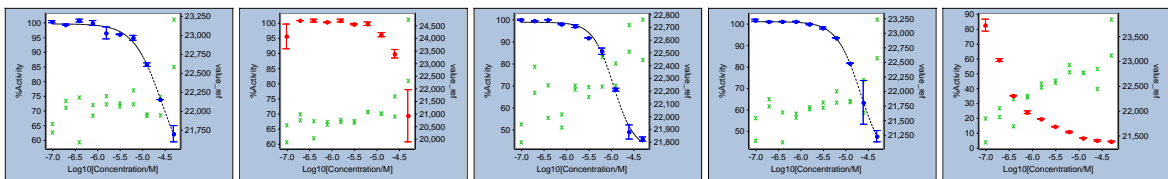
A.3.2. IC50-Validierung

Die folgenden Graphen der 149 validierten Hit-Substanzen wurden automatisch generiert. Es sind die Mittelwerte der Aktivitäten (% Aktivität = $\frac{Signal - A_{min}}{A_{max} - A_{min}}$) (blaue Datenpunkte; linke y-Achse; die Fehlerbalken indizieren den Abstand der beiden Datenpunkte) und die Werte der Fluoreszenzintensitäten in RFU (grüne Datenpunkte; rechte y-Achse) gegen den Logarithmus der Substanzkonzentrationen aufgetragen. Die Daten der drei Compounds 207862, 209400 und 402592 wurden manuell von Datenausreißern gesäubert und mit Prism nahevalidiert. Sie finden sich im Anschluss an die automatisch generierten Graphen.

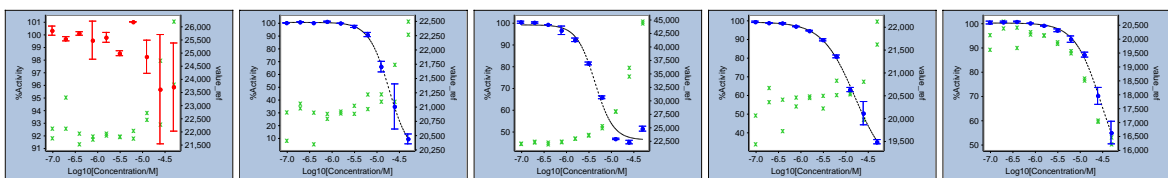
Automatisch generierte Graphen



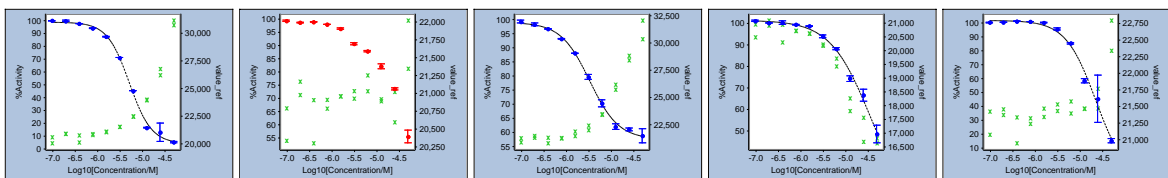
[Chembionet compound 100004](#) [Chembionet compound 100008](#) [Chembionet compound 100630](#) [Chembionet compound 100639](#) [Chembionet compound 100640](#)



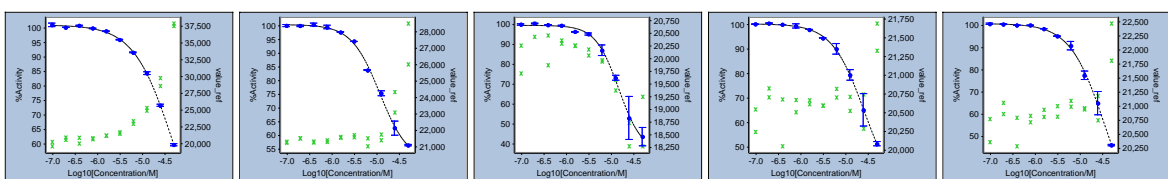
[Chembionet compound 100658](#) [Chembionet compound 100678](#) [Chembionet compound 100683](#) [Chembionet compound 101408](#) [Chembionet compound 101542](#)



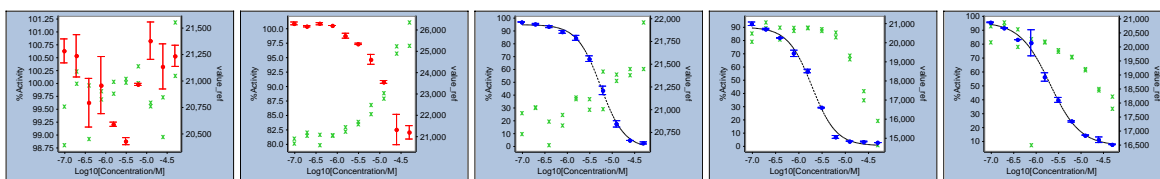
[Chembionet compound 101942](#) [Chembionet compound 103279](#) [Chembionet compound 200555](#) [Chembionet compound 200616](#) [Chembionet compound 200709](#)



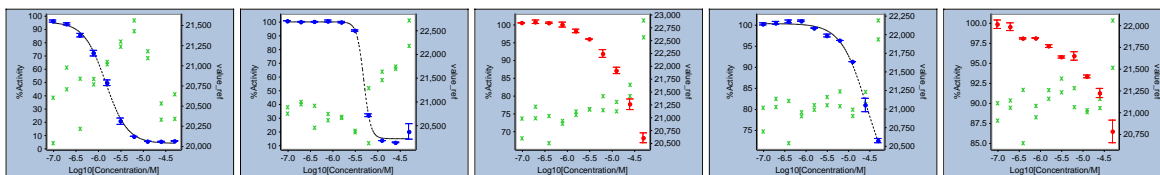
[Chembionet compound 200773](#) [Chembionet compound 200867](#) [Chembionet compound 200918](#) [Chembionet compound 201048](#) [Chembionet compound 201300](#)



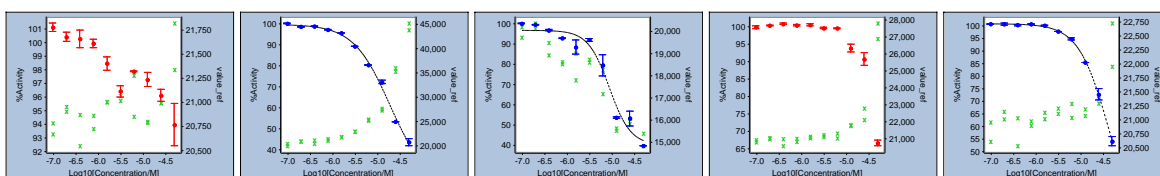
[Chembionet compound 201486](#) [Chembionet compound 201630](#) [Chembionet compound 201891](#) [Chembionet compound 201904](#) [Chembionet compound 202151](#)



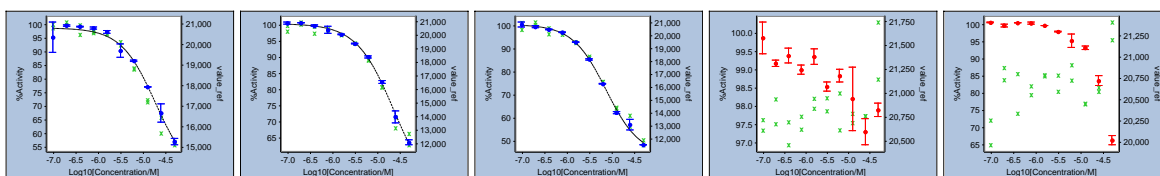
Chembionet compound 202478 Chembionet compound 202564 Chembionet compound 203636 Chembionet compound 203638 Chembionet compound 203640



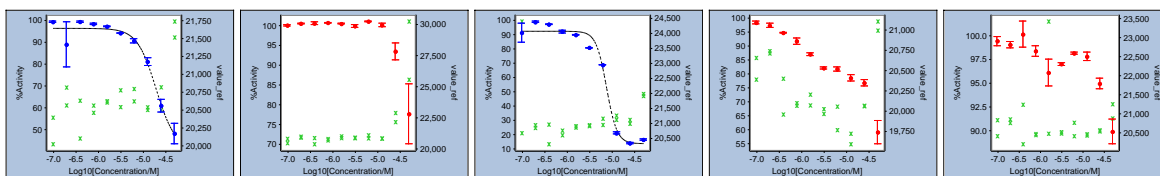
Chembionet compound 203647 Chembionet compound 203799 Chembionet compound 204778 Chembionet compound 204779 Chembionet compound 204821



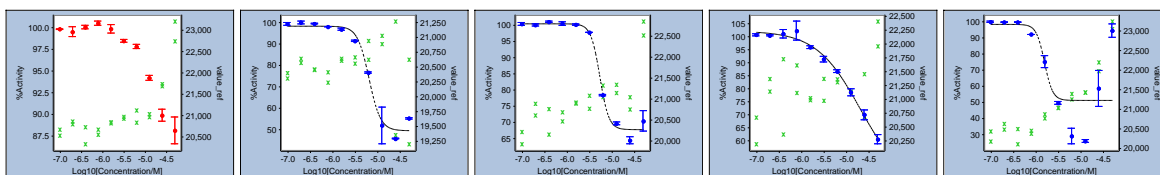
Chembionet compound 204822 Chembionet compound 204893 Chembionet compound 205084 Chembionet compound 205319 Chembionet compound 205353



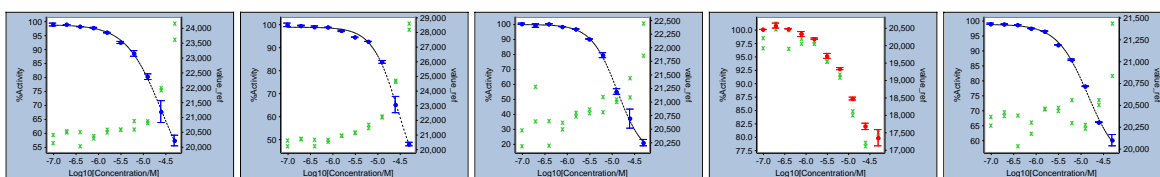
Chembionet compound 205354 Chembionet compound 205476 Chembionet compound 205484 Chembionet compound 205707 Chembionet compound 205724



Chembionet compound 205975 Chembionet compound 206287 Chembionet compound 206290 Chembionet compound 206528 Chembionet compound 206533

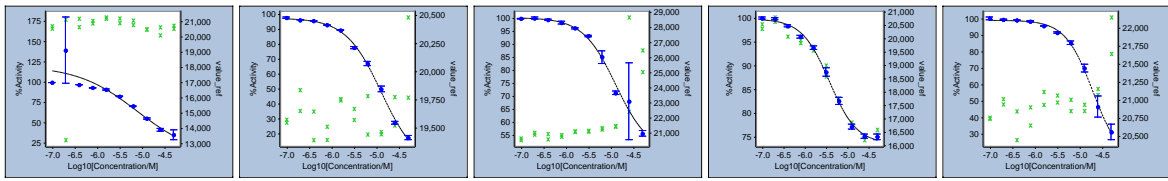


Chembionet compound 207030 Chembionet compound 207031 Chembionet compound 207032 Chembionet compound 207618 Chembionet compound 207862

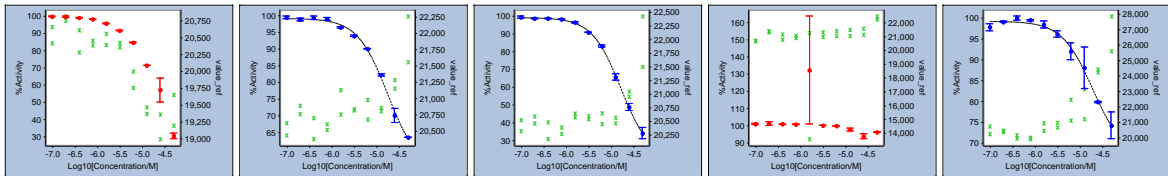


Chembionet compound 207924 Chembionet compound 207953 Chembionet compound 208179 Chembionet compound 208280 Chembionet compound 209053

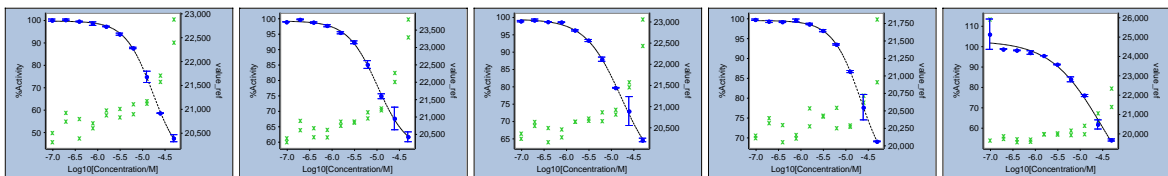
A Anhang



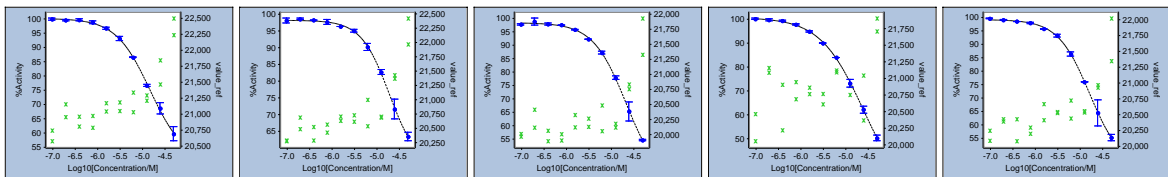
Chebionet compound 20940 Chebionet compound 209701 Chebionet compound 210358 Chebionet compound 210419 Chebionet compound 210616



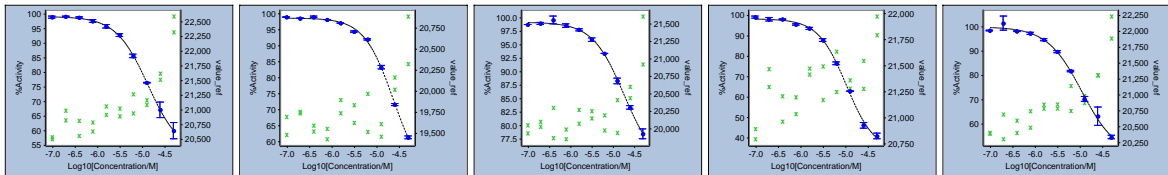
Chebionet compound 211176 Chebionet compound 211864 Chebionet compound 212607 Chebionet compound 213232 Chebionet compound 213243



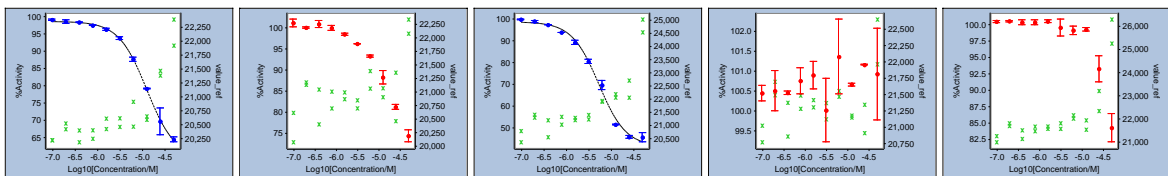
Chebionet compound 213973 Chebionet compound 214610 Chebionet compound 214611 Chebionet compound 214762 Chebionet compound 214764



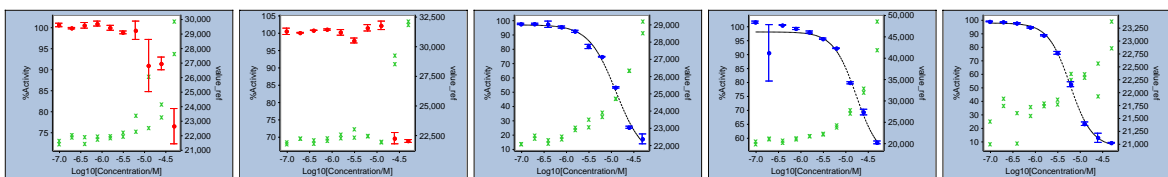
Chebionet compound 214765 Chebionet compound 214766 Chebionet compound 214767 Chebionet compound 214768 Chebionet compound 214769



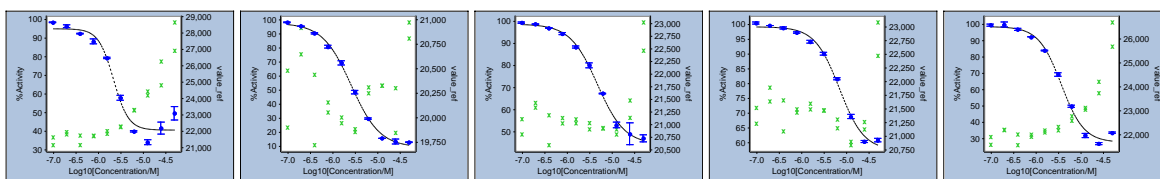
Chebionet compound 214773 Chebionet compound 214775 Chebionet compound 214778 Chebionet compound 214780 Chebionet compound 214781



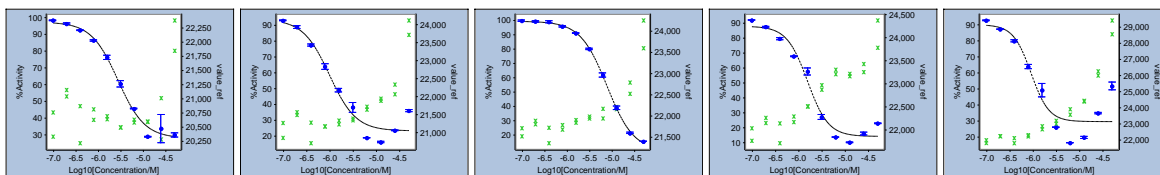
Chebionet compound 214782 Chebionet compound 214783 Chebionet compound 214784 Chebionet compound 215038 Chebionet compound 215283



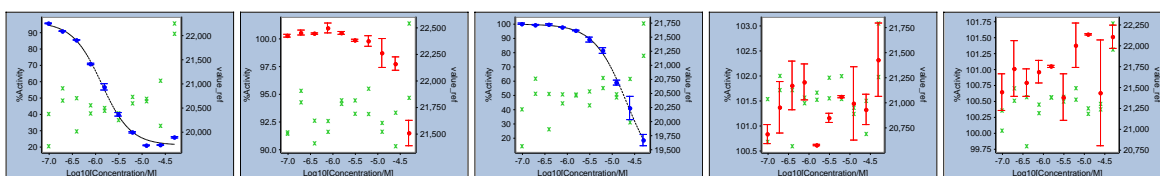
Chebionet compound 215288 Chebionet compound 215875 Chebionet compound 300008 Chebionet compound 300173 Chebionet compound 301033



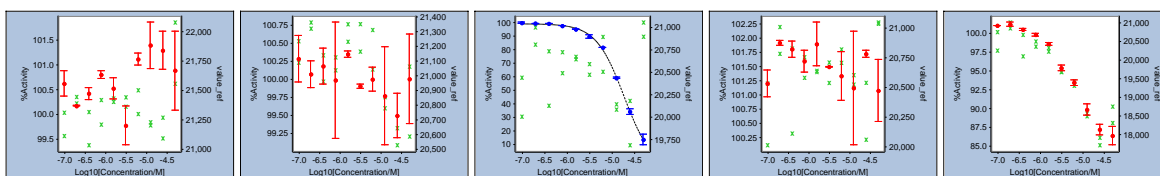
Chebionet compound 301047 Chebionet compound 301109 Chebionet compound 301110 Chebionet compound 301111 Chebionet compound 301113



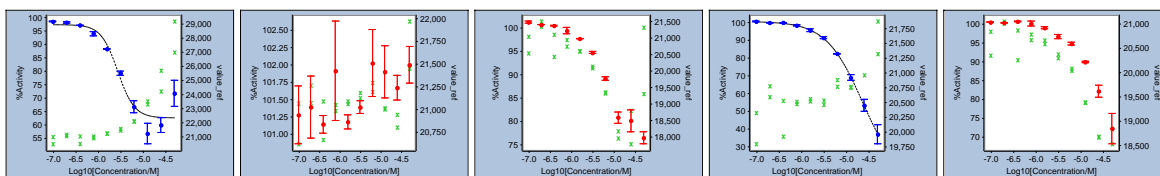
Chebionet compound 301117 Chebionet compound 301118 Chebionet compound 301120 Chebionet compound 301121 Chebionet compound 301122



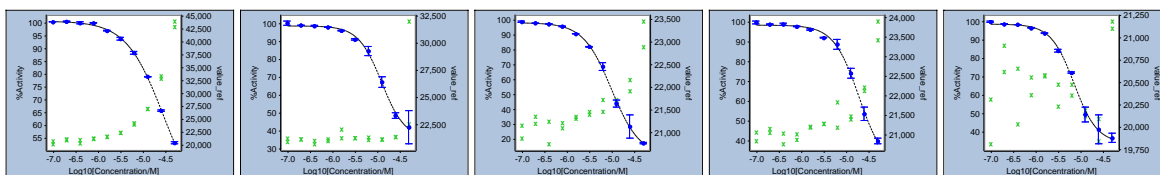
Chebionet compound 301123 Chebionet compound 301349 Chebionet compound 301405 Chebionet compound 301759 Chebionet compound 301897



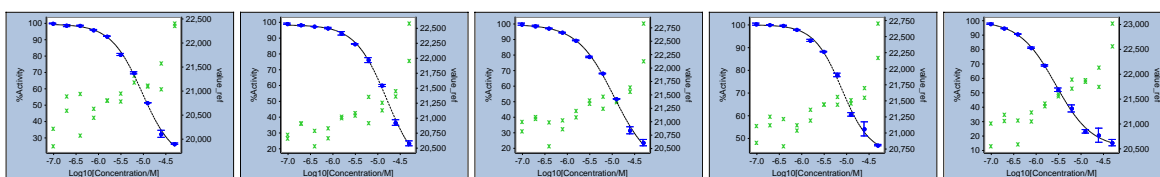
Chebionet compound 301906 Chebionet compound 302175 Chebionet compound 302408 Chebionet compound 302526 Chebionet compound 303559



Chebionet compound 303746 Chebionet compound 304068 Chebionet compound 400312 Chebionet compound 400592 Chebionet compound 400665

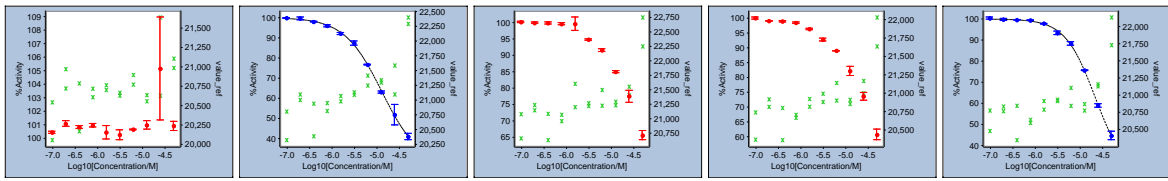


Chebionet compound 400695 Chebionet compound 400836 Chebionet compound 400919 Chebionet compound 401122 Chebionet compound 401390

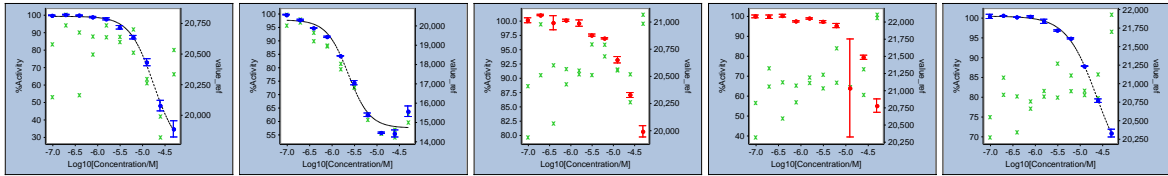


Chebionet compound 401494 Chebionet compound 401552 Chebionet compound 401619 Chebionet compound 401658 Chebionet compound 401677

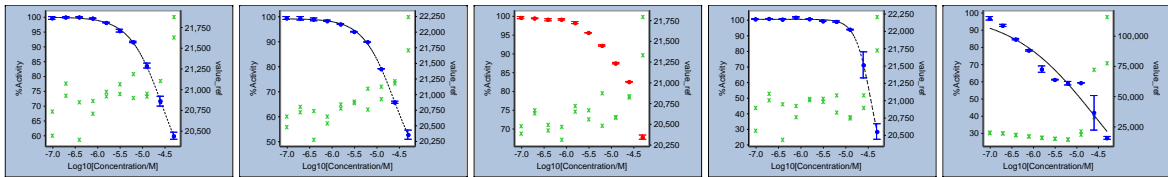
A Anhang



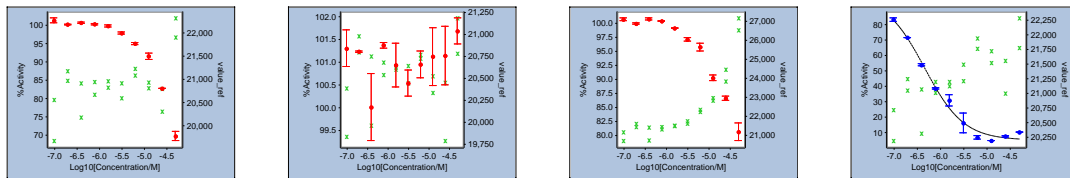
Chembionet compound 401723 Chembionet compound 401740 Chembionet compound 401741 Chembionet compound 401796 Chembionet compound 401799



Chembionet compound 401978 Chembionet compound 401984 Chembionet compound 402094 Chembionet compound 402278 Chembionet compound 402279

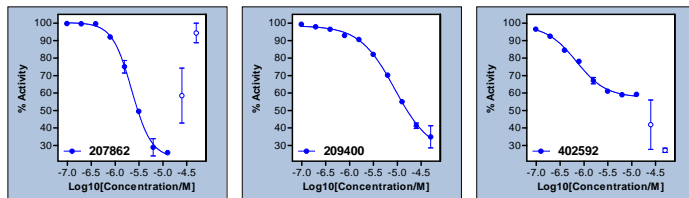


Chembionet compound 402280 Chembionet compound 402372 Chembionet compound 402374 Chembionet compound 402533 Chembionet compound 402592



Chembionet compound 403255 Chembionet compound 403561 Chembionet compound 404080 Chembionet compound 404093

Reevaluierung



A.3.3. Ergebnisse der Hit-Validierung

Comp_ID	LC/MS	IC50 ± 2SD	Relative Aktivität	ChP-Verteil.
100008	100 %	IC50 = 11.9 ± 2.4 µM	Rel. Aktivität = 41 %	χ² = 53.6
100630	28 %	IC50 = 29.2 ± 13.2 µM	Rel. Aktivität = 70 %	χ² = 1.9
100639	54 %	IC50 = 7.7 ± 0.6 µM	Rel. Aktivität = 96 %	χ² = 52.1
100640	43 %	IC50 = 4.7 ± 0.2 µM	Rel. Aktivität = 83 %	χ² = 555.3
100658	0 %	IC50 = 26.9 ± 18.6 µM	Rel. Aktivität = 54 %	χ² = 21.0
100683	46 %	IC50 = 11.2 ± 1.6 µM	Rel. Aktivität = 58 %	χ² = 40.9
101408	0 %	IC50 = 21.5 ± 6.4 µM	Rel. Aktivität = 67 %	χ² = 1.2
103279	100 %	IC50 = 18.5 ± 2 µM	Rel. Aktivität = 104 %	χ² = 13.1
200555	100 %	IC50 = 4.3 ± 0.4 µM	Rel. Aktivität = 53 %	χ² = 129.2
200616	0 %	IC50 = 15.9 ± 5 µM	Rel. Aktivität = 80 %	χ² = 16.4
200709	100 %	IC50 = 29.2 ± 16.6 µM	Rel. Aktivität = 66 %	χ² = 8.3
200773	49 %	IC50 = 5.1 ± 0.4 µM	Rel. Aktivität = 95 %	χ² = 72.7
200918	87 %	IC50 = 3.3 ± 0.6 µM	Rel. Aktivität = 41 %	χ² = 8.9
201048	66 %	IC50 = 34.6 ± 35.2 µM	Rel. Aktivität = 89 %	χ² = 39.4
201300	100 %	IC50 = 22.1 ± 6.2 µM	Rel. Aktivität = 115 %	χ² = 177.3
201486	100 %	IC50 = 11.9 ± 7.5 µM	Rel. Aktivität = 80 %	χ² = 1.5
201630	100 %	IC50 = 11.5 ± 3.2 µM	Rel. Aktivität = 50 %	χ² = 12.3
201891	86 %	IC50 = 14.6 ± 2.8 µM	Rel. Aktivität = 64 %	χ² = 16.2
201904	100 %	IC50 = 25.6 ± 15.8 µM	Rel. Aktivität = 71 %	χ² = 2.3
202151	100 %	IC50 = 34.5 ± 27.4 µM	Rel. Aktivität = 90 %	χ² = 12.3
203636	100 %	IC50 = 5.6 ± 0.4 µM	Rel. Aktivität = 96 %	χ² = 31.2
203638	85 %	IC50 = 1.9 ± 0.2 µM	Rel. Aktivität = 90 %	χ² = 136.1
203640	14 %	IC50 = 2.0 ± 0.2 µM	Rel. Aktivität = 89 %	χ² = 93.3
203647	95 %	IC50 = 1.5 ± 0 µM	Rel. Aktivität = 92 %	χ² = 44.7
203799	97 %	IC50 = 4.9 ± 0.2 µM	Rel. Aktivität = 85 %	χ² = 73.6
204779	0 %	IC50 = 26.5 ± 22.8 µM	Rel. Aktivität = 39 %	χ² = 7.6
204893	100 %	IC50 = 18.3 ± 8.8 µM	Rel. Aktivität = 76 %	χ² = 30.3
205084	70 %	IC50 = 8.6 ± 1.2 µM	Rel. Aktivität = 57 %	χ² = 314.1
205353	97 %	IC50 = 41.5 ± 40.6 µM	Rel. Aktivität = 84 %	χ² = 2.9
205354	99 %	IC50 = 18.5 ± 11.2 µM	Rel. Aktivität = 55 %	χ² = 47.0
205476	67 %	IC50 = 22.5 ± 20.2 µM	Rel. Aktivität = 53 %	χ² = 4.8
205484	40 %	IC50 = 7.3 ± 1.8 µM	Rel. Aktivität = 57 %	χ² = 17.3
205975	100 %	IC50 = 19.1 ± 3.8 µM	Rel. Aktivität = 55 %	χ² = 161.8
206290	97 %	IC50 = 7.5 ± 0.4 µM	Rel. Aktivität = 79 %	χ² = 337.0
207031	29 %	IC50 = 6.4 ± 0.4 µM	Rel. Aktivität = 49 %	χ² = 147.5
207032	81 %	IC50 = 5.3 ± 0.6 µM	Rel. Aktivität = 33 %	χ² = 40.1
207618	0 %	IC50 = 20.0 ± 19.6 µM	Rel. Aktivität = 60 %	χ² = 29.0
207862	100 %	IC50 = 2.2 ± 0.1 µM	Rel. Aktivität = 77 %	χ² = -
207924	78 %	IC50 = 25.5 ± 21.2 µM	Rel. Aktivität = 62 %	χ² = 4.2
207953	95 %	IC50 = 28.6 ± 13.8 µM	Rel. Aktivität = 73 %	χ² = 15.1
208179	24 %	IC50 = 13.1 ± 2 µM	Rel. Aktivität = 89 %	χ² = 21.8
209053	75 %	IC50 = 14.3 ± 6.2 µM	Rel. Aktivität = 47 %	χ² = 7.2
209400	93 %	IC50 = 8.8 ± - µM	Rel. Aktivität = 73 %	χ² = -
209701	100 %	IC50 = 12.4 ± 3 µM	Rel. Aktivität = 99 %	χ² = 38.6
210358	0 %	IC50 = 12.5 ± 5 µM	Rel. Aktivität = 52 %	χ² = 54.5
210419	94 %	IC50 = 3.7 ± 1.2 µM	Rel. Aktivität = 26 %	χ² = 5.2
210616	0 %	IC50 = 19.0 ± 5 µM	Rel. Aktivität = 86 %	χ² = 19.7
211864	100 %	IC50 = 17.3 ± 9.2 µM	Rel. Aktivität = 45 %	χ² = 9.9
212607	100 %	IC50 = 16.1 ± 4.2 µM	Rel. Aktivität = 79 %	χ² = 5.6
213243	100 %	IC50 = 18.8 ± 15.8 µM	Rel. Aktivität = 32 %	χ² = 10.8
213973	100 %	IC50 = 16.9 ± 5.2 µM	Rel. Aktivität = 64 %	χ² = 3.4
214610	97 %	IC50 = 10.3 ± 3.6 µM	Rel. Aktivität = 42 %	χ² = 3.1
214611	100 %	IC50 = 16.5 ± 11.8 µM	Rel. Aktivität = 45 %	χ² = 4.1

Comp_ID	LC/MS	IC50 ± 2SD	Relative Aktivität	ChP-Verteil.
214762	54 %	IC50 = 21.7 ± 15 µM	Rel. Aktivität = 40 %	χ² = 0.6
214764	100 %	IC50 = 30.0 ± 42 µM	Rel. Aktivität = 83 %	χ² = 73.9
214765	94 %	IC50 = 14.6 ± 7.4 µM	Rel. Aktivität = 50 %	χ² = 3.7
214766	92 %	IC50 = 18.8 ± 9.8 µM	Rel. Aktivität = 44 %	χ² = 1.7
214767	100 %	IC50 = 21.3 ± 13 µM	Rel. Aktivität = 60 %	χ² = 2.4
214768	84 %	IC50 = 24.5 ± 22.2 µM	Rel. Aktivität = 77 %	χ² = 2.1
214769	86 %	IC50 = 16.1 ± 7.2 µM	Rel. Aktivität = 55 %	χ² = 1.3
214773	88 %	IC50 = 13.2 ± 5.8 µM	Rel. Aktivität = 47 %	χ² = 0.9
214775	93 %	IC50 = 23.1 ± 14.4 µM	Rel. Aktivität = 51 %	χ² = 4.5
214778	94 %	IC50 = 17.7 ± 19.4 µM	Rel. Aktivität = 27 %	χ² = 1.6
214780	86 %	IC50 = 10.9 ± 2 µM	Rel. Aktivität = 65 %	χ² = 16.6
214781	93 %	IC50 = 10.9 ± 4.2 µM	Rel. Aktivität = 53 %	χ² = 18.9
214782	89 %	IC50 = 12.4 ± 3.9 µM	Rel. Aktivität = 39 %	χ² = 1.5
214784	100 %	IC50 = 5.3 ± 0.8 µM	Rel. Aktivität = 57 %	χ² = 54.7
300008	100 %	IC50 = 12.6 ± 2 µM	Rel. Aktivität = 93 %	χ² = 102.3
300173	0 %	IC50 = 17.1 ± 5 µM	Rel. Aktivität = 46 %	χ² = 162.5
301033	100 %	IC50 = 6.0 ± 0.4 µM	Rel. Aktivität = 92 %	χ² = 33.4
301047	40 %	IC50 = 2.2 ± 0.2 µM	Rel. Aktivität = 54 %	χ² = 364.7
301109	0 %	IC50 = 2.6 ± 0.2 µM	Rel. Aktivität = 88 %	χ² = 46.7
301110	100 %	IC50 = 4.7 ± 0.8 µM	Rel. Aktivität = 54 %	χ² = 21.1
301111	100 %	IC50 = 6.9 ± 1.4 µM	Rel. Aktivität = 42 %	χ² = 27.0
301113	100 %	IC50 = 3.6 ± 0.2 µM	Rel. Aktivität = 71 %	χ² = 122.5
301117	90 %	IC50 = 2.7 ± 0.2 µM	Rel. Aktivität = 69 %	χ² = 106.3
301118	100 %	IC50 = 1.0 ± 0.2 µM	Rel. Aktivität = 70 %	χ² = 674.2
301120	100 %	IC50 = 7.7 ± 0.8 µM	Rel. Aktivität = 91 %	χ² = 9.8
301121	0 %	IC50 = 1.5 ± 0.2 µM	Rel. Aktivität = 74 %	χ² = 473.0
301122	0 %	IC50 = 0.9 ± 0 µM	Rel. Aktivität = 60 %	χ² = 1826.0
301123	100 %	IC50 = 1.3 ± 0.2 µM	Rel. Aktivität = 75 %	χ² = 79.3
301405	100 %	IC50 = 21.0 ± 6.6 µM	Rel. Aktivität = 110 %	χ² = 30.5
302408	90 %	IC50 = 18.3 ± 3.8 µM	Rel. Aktivität = 107 %	χ² = 14.1
303746	49 %	IC50 = 2.7 ± 0.4 µM	Rel. Aktivität = 35 %	χ² = 296.9
400592	100 %	IC50 = 22.7 ± 11.6 µM	Rel. Aktivität = 91 %	χ² = 1.4
400695	100 %	IC50 = 27.6 ± 22.6 µM	Rel. Aktivität = 73 %	χ² = 2.7
400836	100 %	IC50 = 12.2 ± 2 µM	Rel. Aktivität = 63 %	χ² = 24.6
400919	100 %	IC50 = 9.6 ± 1.4 µM	Rel. Aktivität = 89 %	χ² = 18.5
401122	0 %	IC50 = 18.8 ± 4.8 µM	Rel. Aktivität = 72 %	χ² = 23.1
401390	100 %	IC50 = 7.0 ± 0.8 µM	Rel. Aktivität = 65 %	χ² = 33.9
401494	100 %	IC50 = 9.4 ± 1.6 µM	Rel. Aktivität = 84 %	χ² = 31.5
401552	100 %	IC50 = 16.0 ± 4 µM	Rel. Aktivität = 95 %	χ² = 19.7
401619	100 %	IC50 = 11.0 ± 2.8 µM	Rel. Aktivität = 93 %	χ² = 32.7
401658	0 %	IC50 = 7.9 ± 1.4 µM	Rel. Aktivität = 57 %	χ² = 26.9
401677	100 %	IC50 = 2.7 ± 0.4 µM	Rel. Aktivität = 88 %	χ² = 28.7
401740	100 %	IC50 = 12.7 ± 4.8 µM	Rel. Aktivität = 73 %	χ² = 5.7
401799	96 %	IC50 = 21.5 ± 8.8 µM	Rel. Aktivität = 74 %	χ² = 4.1
401978	98 %	IC50 = 17.5 ± 3.4 µM	Rel. Aktivität = 77 %	χ² = 25.1
401984	96 %	IC50 = 2.3 ± 0.4 µM	Rel. Aktivität = 40 %	χ² = 137.7
402279	100 %	IC50 = 23.5 ± 20.2 µM	Rel. Aktivität = 41 %	χ² = 2.4
402280	93 %	IC50 = 28.0 ± 23.4 µM	Rel. Aktivität = 60 %	χ² = 1.5
402372	100 %	IC50 = 23.8 ± 13.6 µM	Rel. Aktivität = 65 %	χ² = 2.5
402533	0 %	IC50 = 37.1 ± 13.2 µM	Rel. Aktivität = 107 %	χ² = 4.7
402592	38 %	IC50 = 0.7 ± - µM	Rel. Aktivität = 41 %	χ² = -
404093	100 %	IC50 = 0.5 ± 0.2 µM	Rel. Aktivität = 94 %	χ² = 161.0

grün: Reinheit > 80 % und Aktivität > 75 %

A.4. Photomarkierung - Gelbilder

Effizienzen und Ausbeuten der Photomarkierung

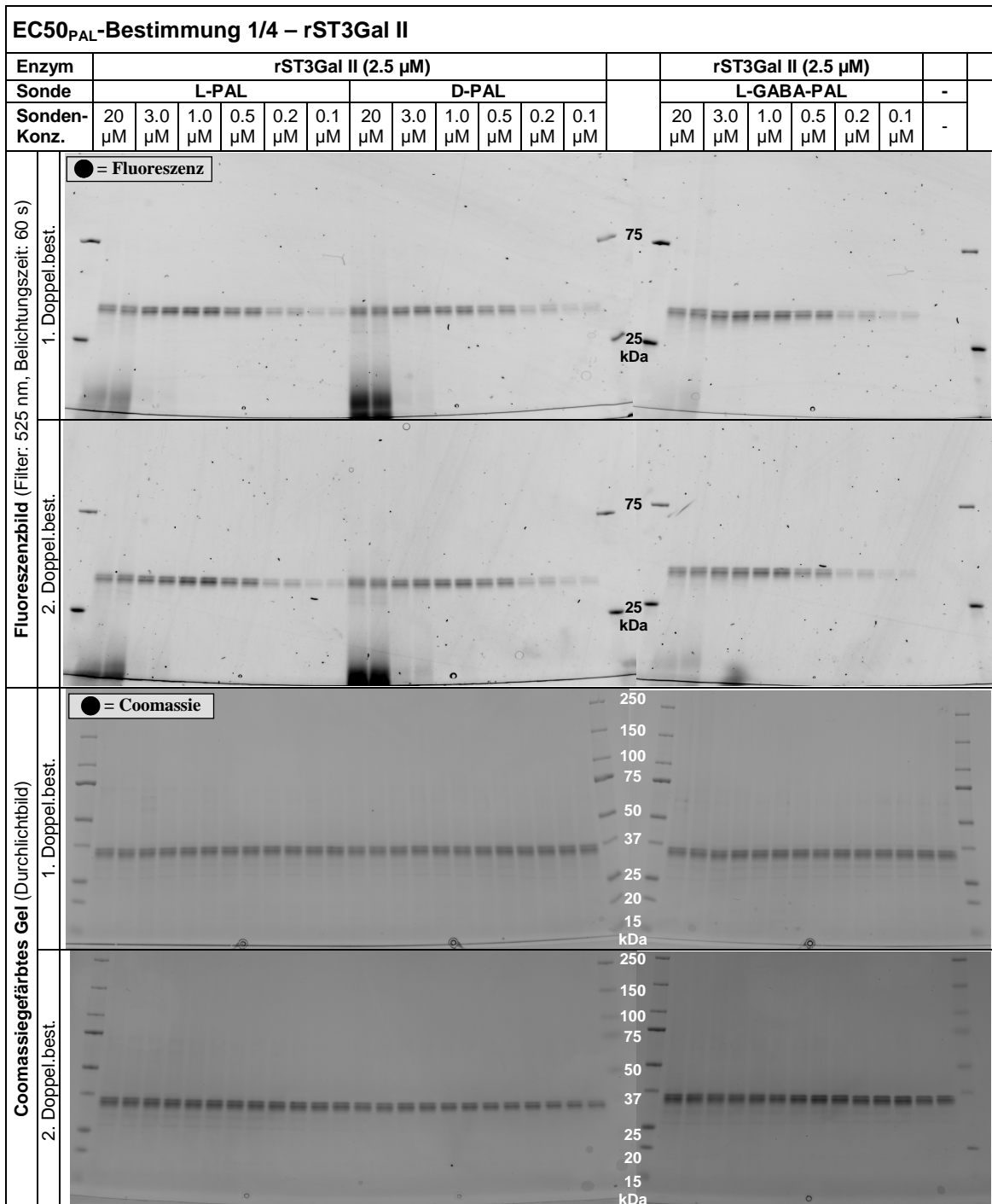


Abb. A.3.: EC50_{PAL}-Bestimmung mit der rST3Gal II.

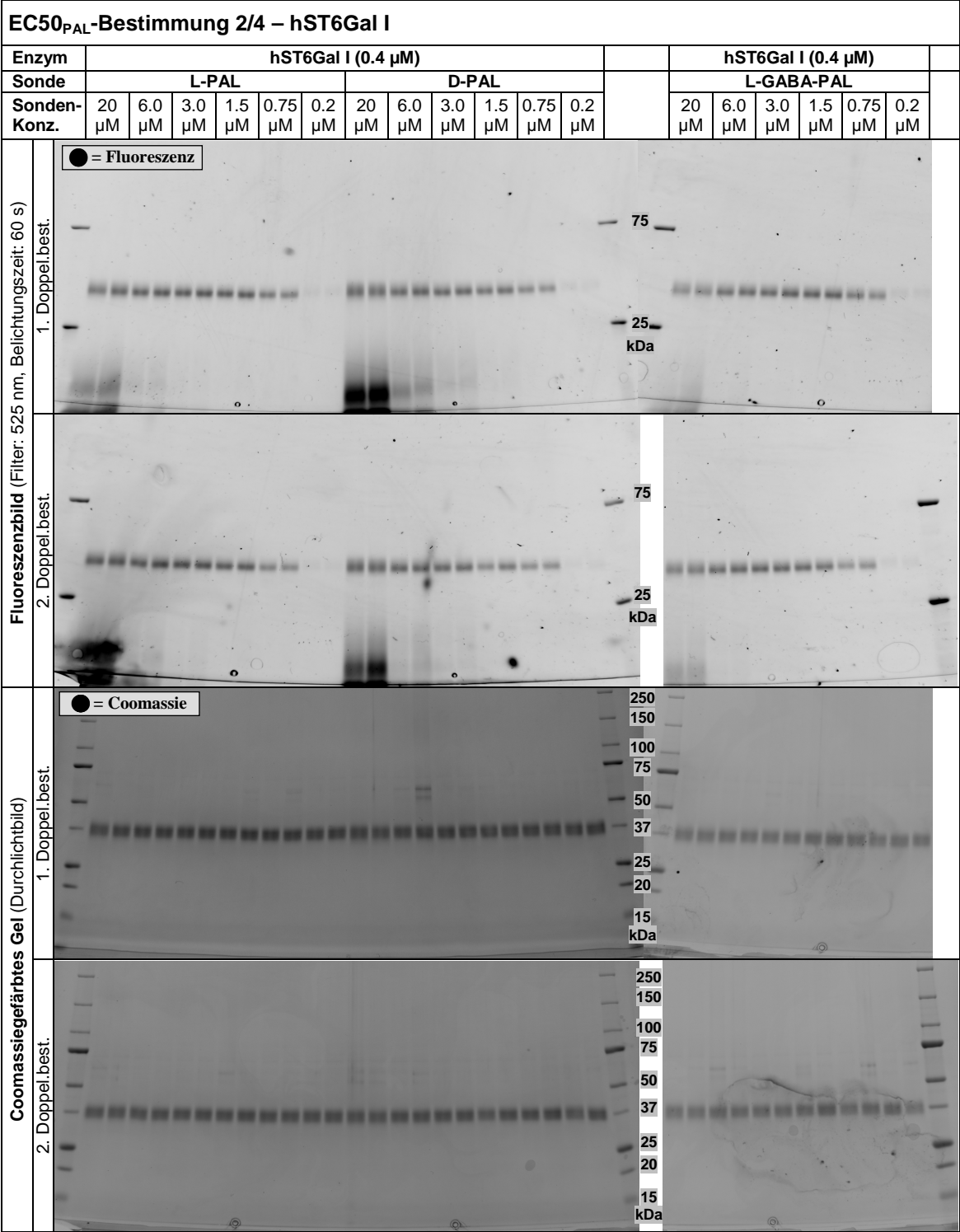


Abb. A.4.: EC50_{PAL}-Bestimmung mit der hST6Gal I.

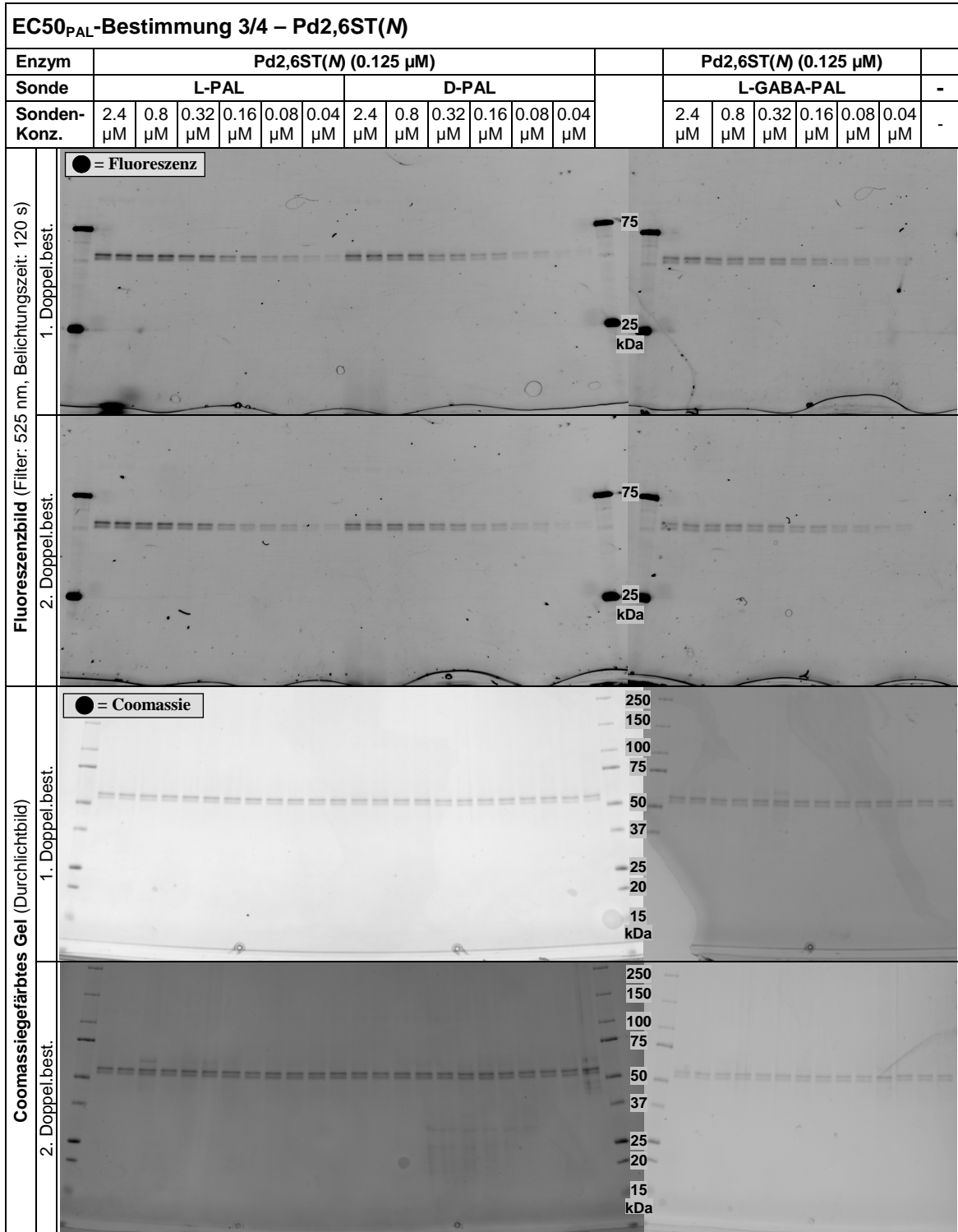


Abb. A.5.: EC50_{PAL}-Bestimmung mit der Pd2,6ST(N).

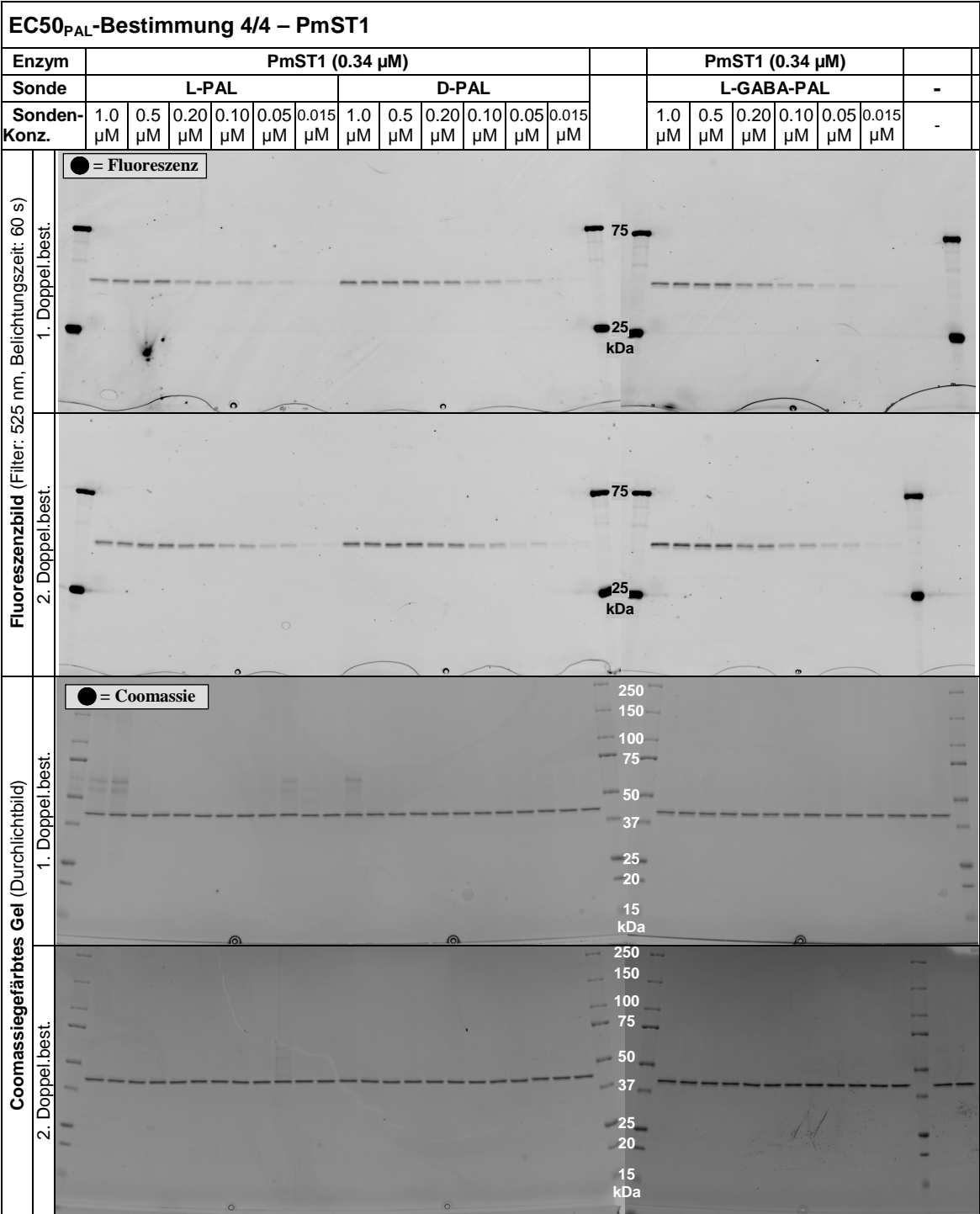


Abb. A.6.: EC50_{PAL}-Bestimmung mit der PmST1.

Affinitätsbasierende Photomarkierung

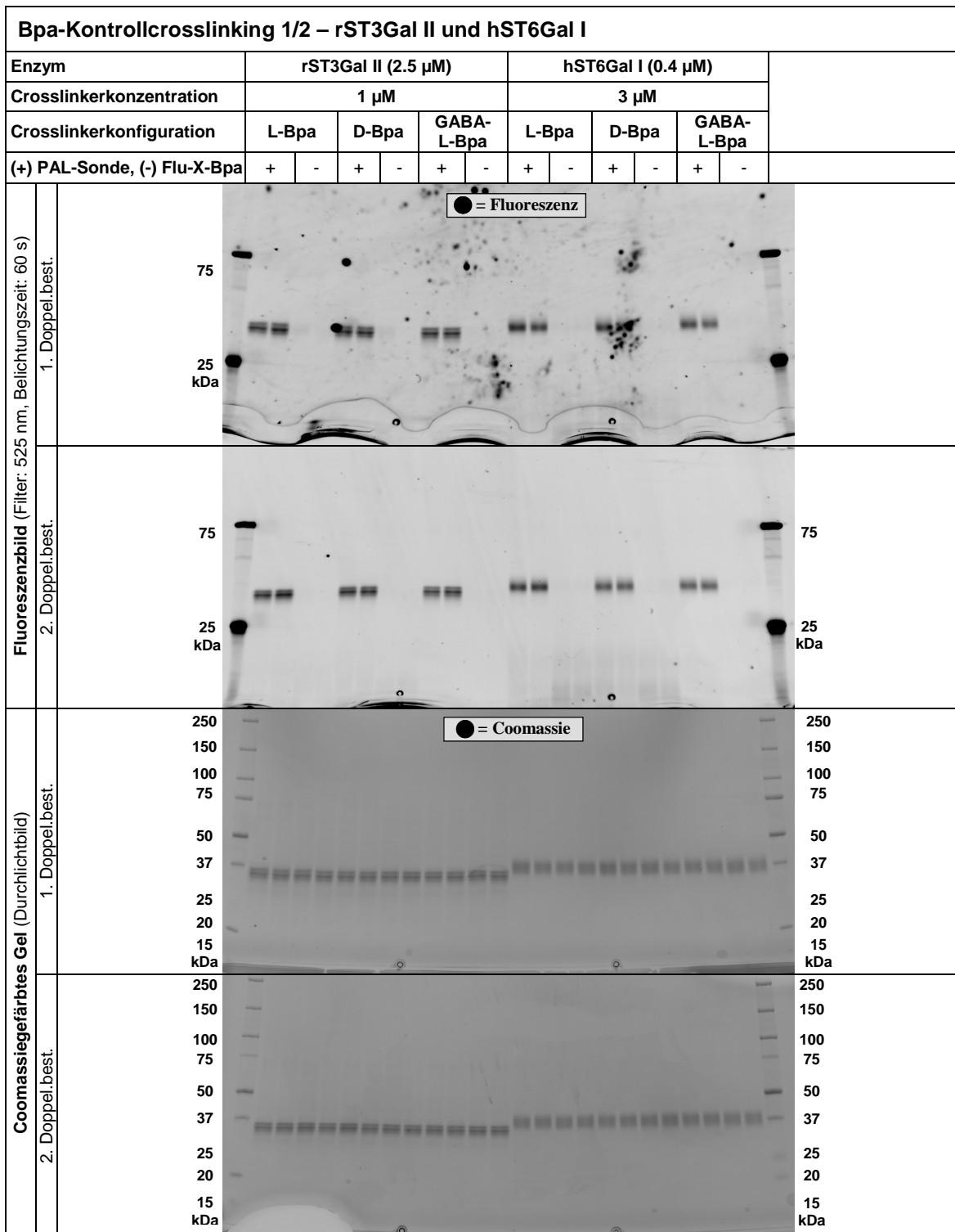


Abb. A.7.: Affinitätsbasierende Photomarkierung der rST3Gal II und hST6Gal I.

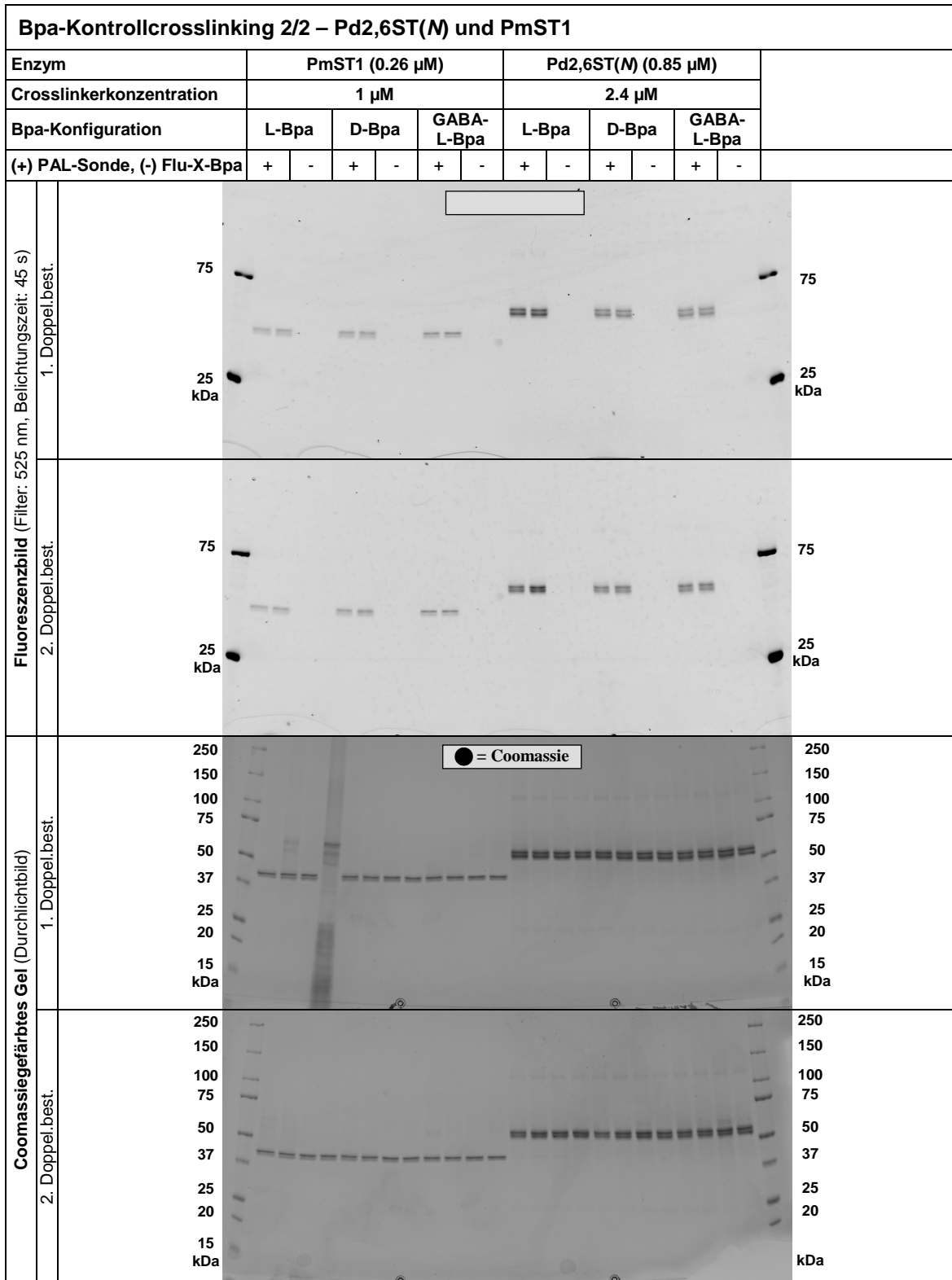


Abb. A.8.: Affinitätsbasierende Photomarkierung der Pd2,6ST(N) und PmST1.

Denaturierung und Verdrängung + Kontrolle mit mG6

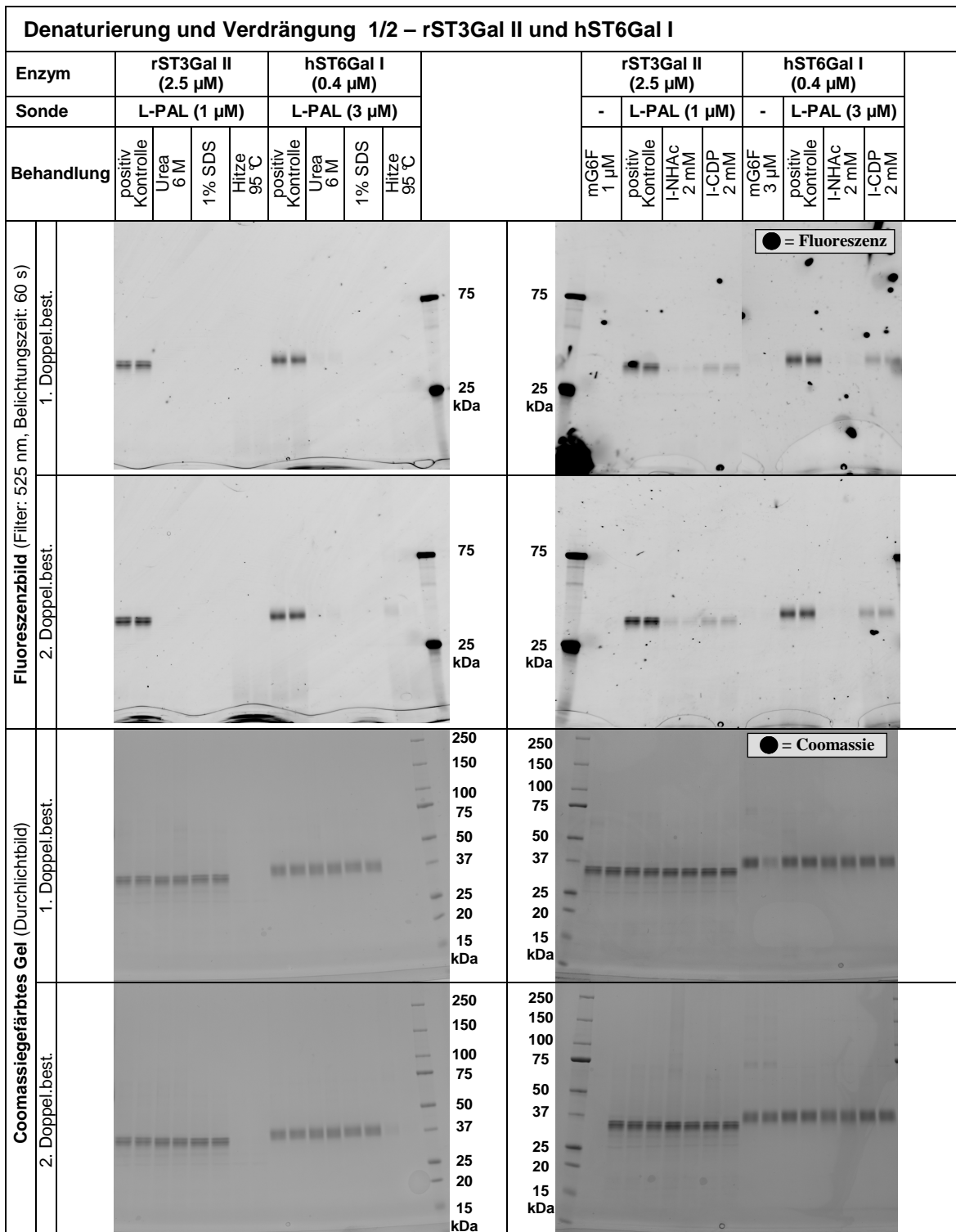


Abb. A.9.: Inhibition und Hemmung der Photomarkierung von rST3Gal II und hST6Gal I.

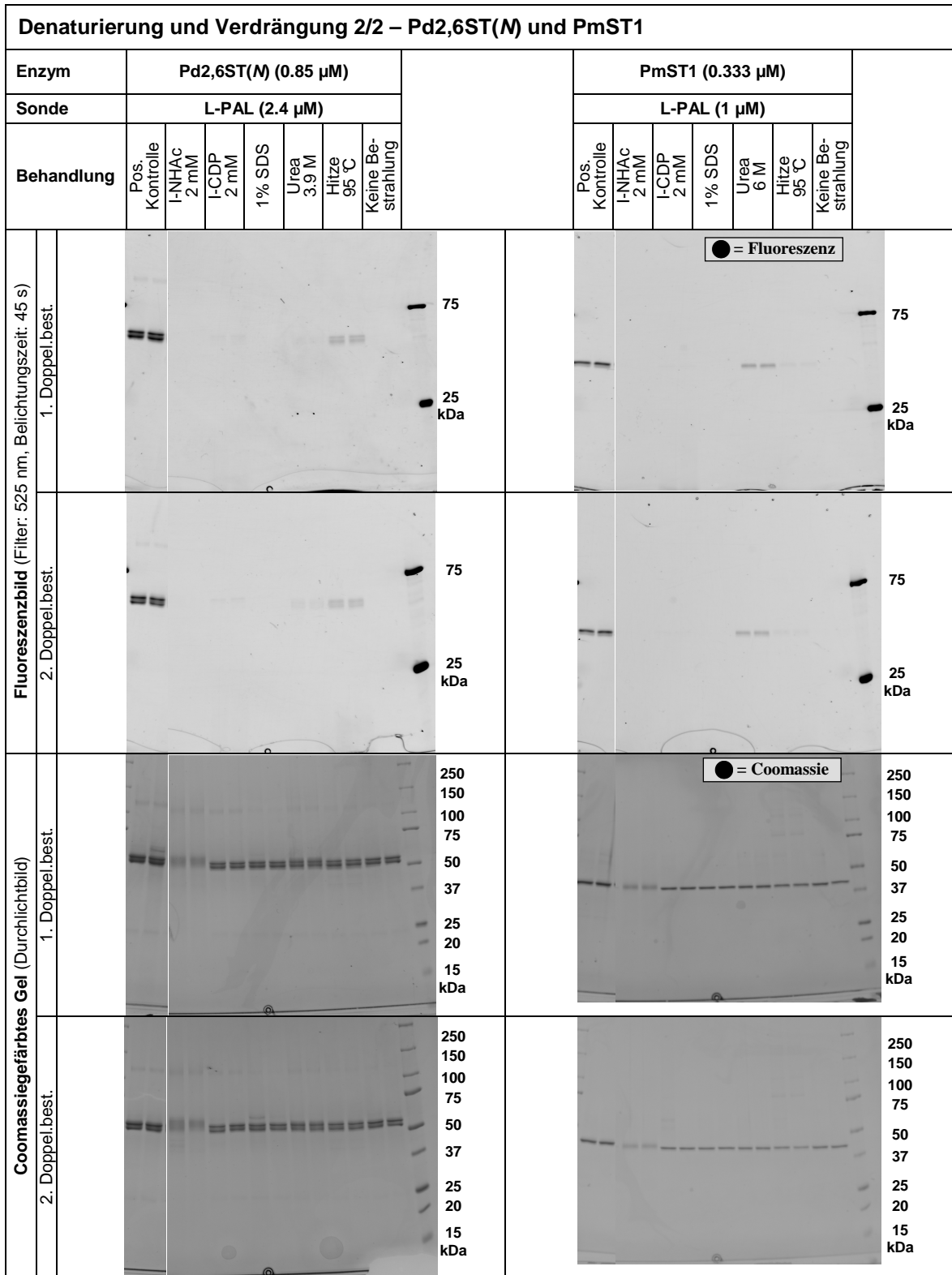


Abb. A.10.: Inhibition und Hemmung der Photomarkierung von Pd2,6ST(N) und PmST1.

Zeitabhängige Photomarkierung

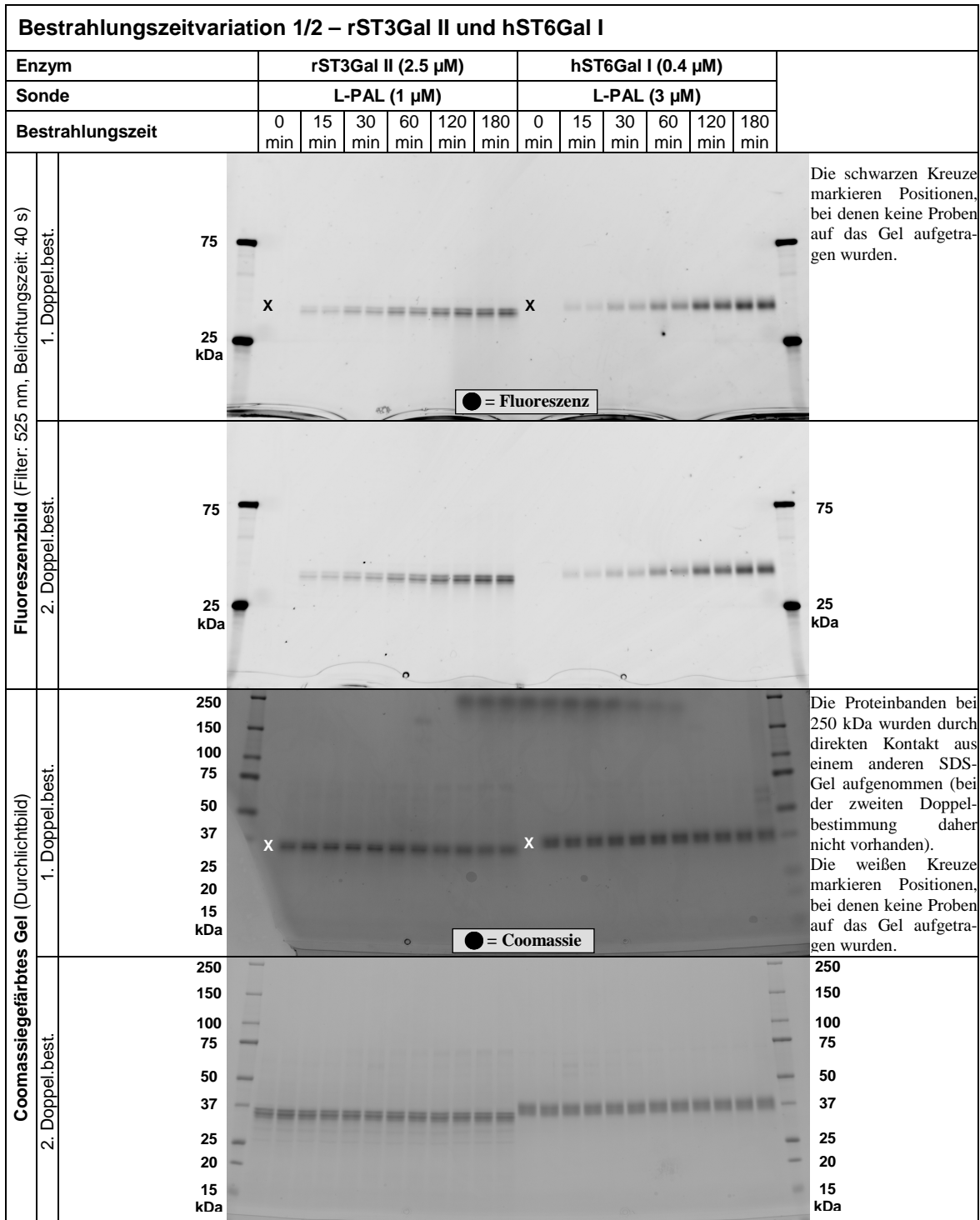


Abb. A.11.: Zeitabhängige Photomarkierung von der rST3Gal II und hST6Gal I.

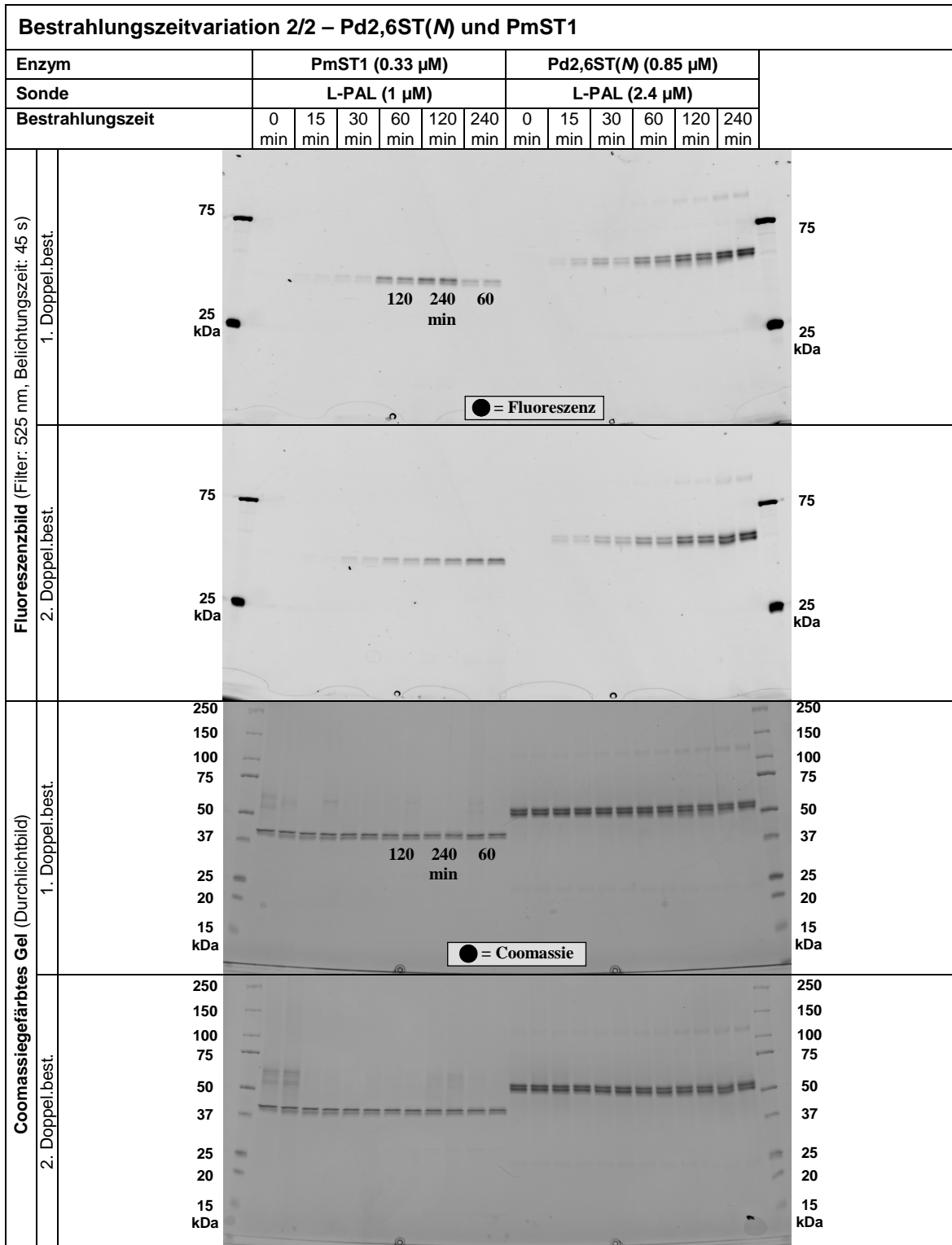


Abb. A.12.: Zeitabhängige Photomarkierung von der Pd2,6(ST)N und PmST1.

Enzymkonzentrationsabhängige Photomarkierung

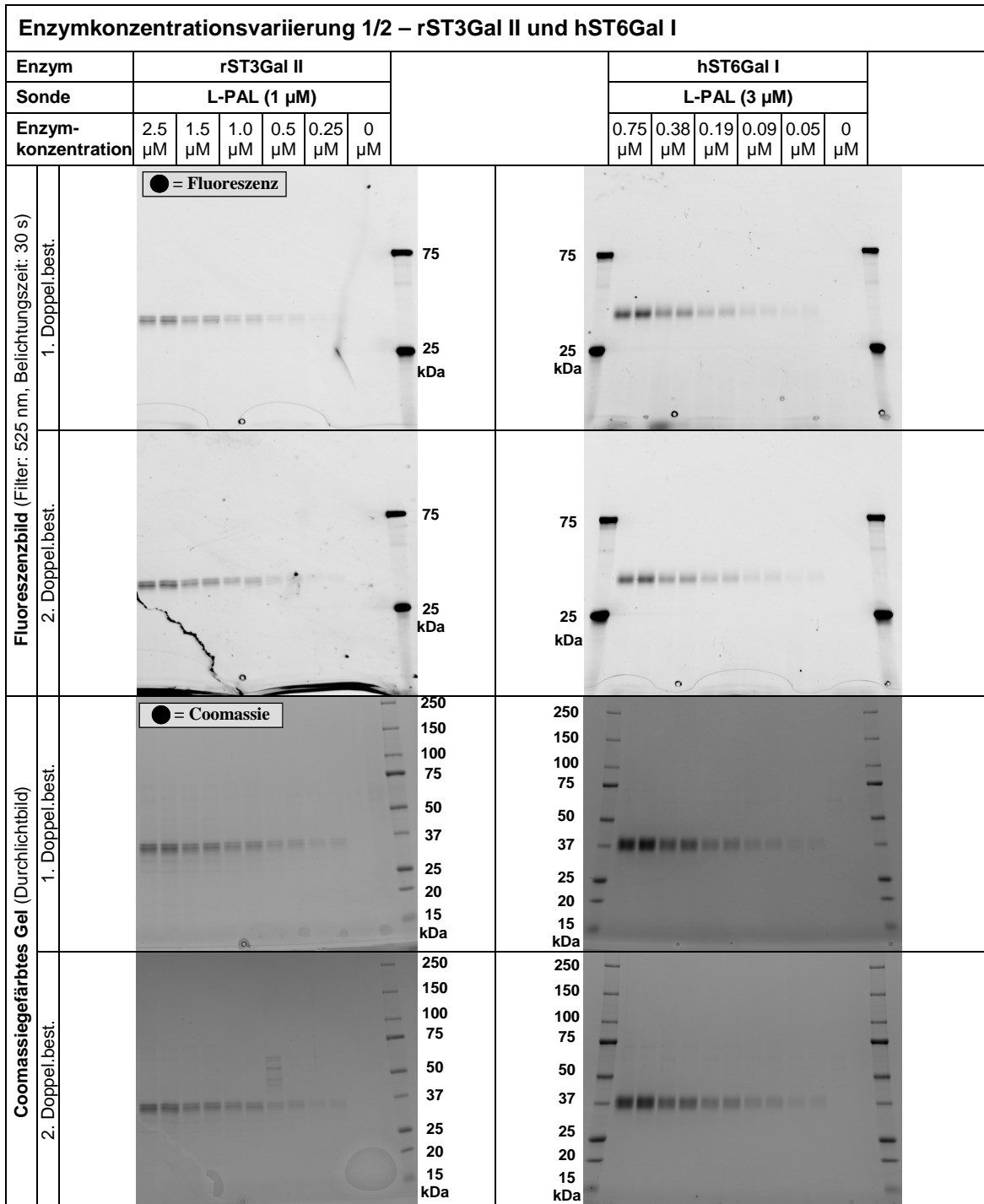


Abb. A.13.: Enzymkonzentrationsabhängige Photomarkierung der rST3Gal II und hST6Gal I.

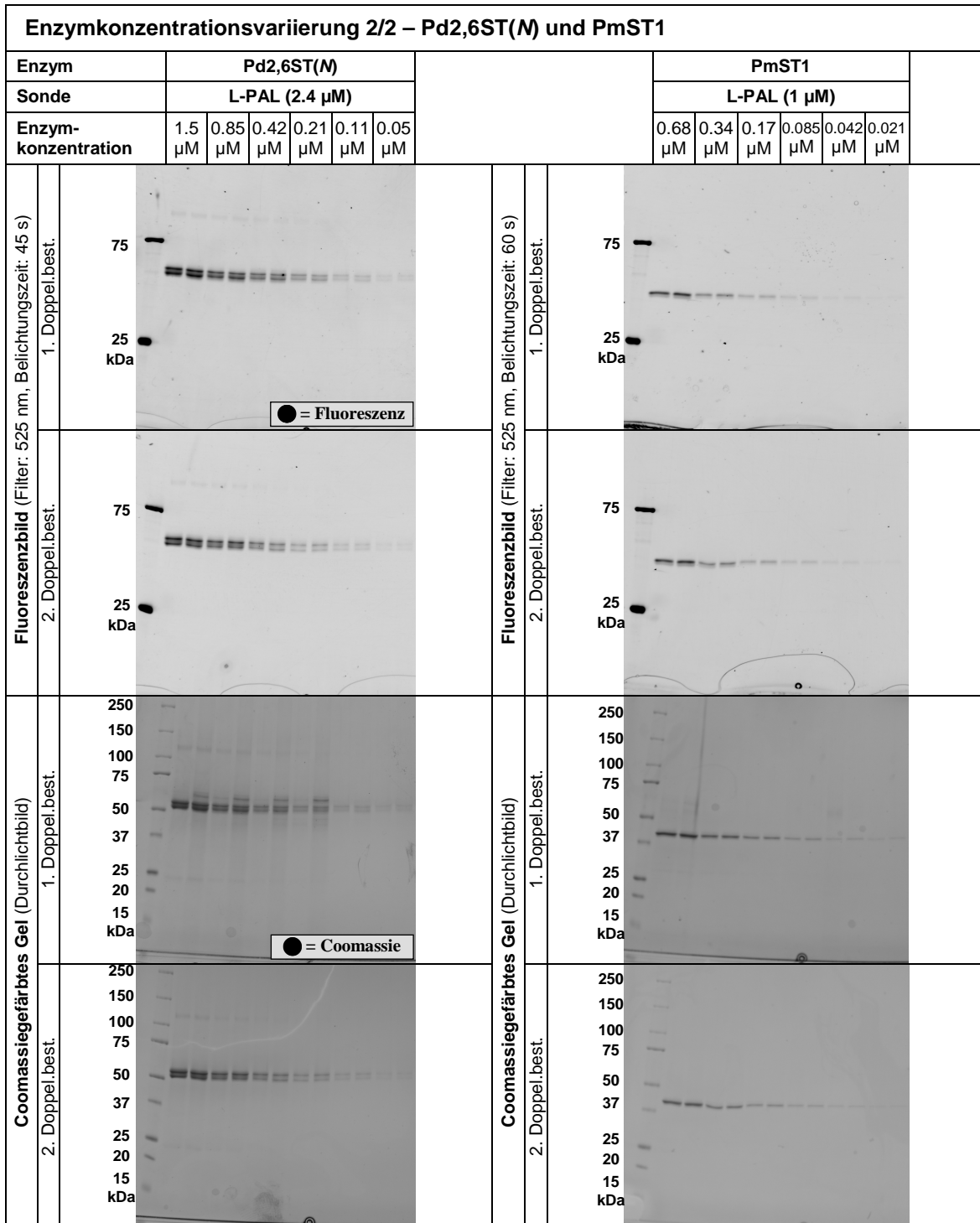


Abb. A.14.: Enzymkonzentrationsabhängige Photomarkierung der Pd2,6ST(N) und PmST1.

Literaturverzeichnis

- [1] T. Meyer, I. Hart, Mechanisms of tumour metastasis, *Eur. J. Cancer* **1998**, *34*(2), 214–221
- [2] S. Eccles, D. Welch, Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies, *Lancet* **2007**, *369*(9574), 1742–1757
- [3] A. Cazet, S. Julien, M. Bobowski, M. Krzewinski-Recchi, A. Harduin-Lepers, S. Groux-Degroote, P. Delannoy, Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer, *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*(10), 1377–1383
- [4] C. Wu, C. Hsu, S. Chen, Y. Tsai, Soyasaponin I, a potent and specific sialyltransferase inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *284*(2), 466–469
- [5] K. Chang, L. Lee, J. Chen, W. Li, Lithocholic acid analogues, new and potent α -2,3-sialyltransferase inhibitors, *Chem. Commun.* **2006**, (6), 629–631
- [6] C. Chiang, C. Wang, H. Chang, S. More, W. Li, W. Hung, A novel sialyltransferase inhibitor AL10 suppresses invasion and metastasis of lung cancer cells by inhibiting integrin-mediated signaling, *J. Cell. Physiol.* **2010**, *223*(2), 492–499
- [7] J. Arnold, M. Wormald, R. Sim, P. Rudd, R. Dwek, The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins, *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, *25*(1), 21–50
- [8] A. Varki, Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiology* **1993**, *3*(2), 97–130
- [9] B. Imperiali, Protein glycosylation: the clash of the Titans, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*(11), 452–459
- [10] T. Lindhorst, Struktur und Funktion von Kohlenhydraten, *Chemie unserer Zeit* **2000**, *34*(1), 38–52
- [11] P. Rudd, H. Joao, E. Coghill, P. Fiten, M. Saunders, G. Opdenakker, R. Dwek, Glycoforms modify the dynamic stability and functional activity of an enzyme, *Biochemistry* **1994**, *33*(1), 17–22
- [12] K. Breen, The role of protein glycosylation in the control of cellular N-sialyltransferase activity, *FEBS Lett.* **2002**, *517*(1-3), 215–218
- [13] A. Varki, *Essentials of Glycobiology, 2nd edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2008**
- [14] R. Kornfeld, S. Kornfeld, Assembly of asparagine-linked oligosaccharides, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*(1), 631–664
- [15] J. Paulson, K. Colley, Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*(30), 17615–17618
- [16] C. Breton, J. Mucha, C. Jeanneau, Structural and functional features of glycosyltransferases, *Biochimie* **2001**, *83*(8), 713–718

- [17] J. Li, D. Rancour, M. Allende, C. Worth, D. Darling, J. Gilbert, A. Menon, W. Young Jr, The DXD motif is required for GM2 synthase activity but is not critical for nucleotide binding, *Glycobiology* **2001**, *11*(3), 217–229
- [18] U. Ünlügil, J. Rini, Glycosyltransferase structure and mechanism, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*(5), 510–517
- [19] G. D. L.L. Lairson, B. Henrissat, S. Withers, Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms, *Annual Review of Biochemistry* **2008**, *77*(1), 521–555
- [20] G. Blix, E. Lindberg, The sialic acids of bovine and equine submaxillary mucins, *Acta chem. scand.* **1960**, *14*(1809), 1811–1814
- [21] A. Varki, Diversity in the sialic acids, *Glycobiology* **1992**, *2*(1), 25–40
- [22] A. Varki, Multiple changes in sialic acid biology during human evolution, *Glycoconjugate J.* **2009**, *26*(3), 231–245
- [23] H. Higashi, Y. Hirabayashi, Y. Fukui, M. Naiki, M. Matsumoto, S. Ueda, S. Kato, Characterization of N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides as tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human colon cancer, *Cancer Res.* **1985**, *45*(8), 3796–3802
- [24] K. Ley, The role of selectins in inflammation and disease, *Trends Mol. Med.* **2003**, *9*(6), 263–268
- [25] P. Crocker, A. Varki, Siglecs, sialic acids and innate immunity, *Trends Immunol.* **2001**, *22*(6), 337–342
- [26] I. Moustafa, H. Connaris, M. Taylor, V. Zaitsev, J. Wilson, M. Kiefel, M. Von Itzstein, G. Taylor, Sialic acid recognition by *Vibrio cholerae* neuraminidase, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*(39), 40819–40826
- [27] K. Karlsson, Microbial recognition of target-cell glycoconjugates, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*(5), 622–635
- [28] B. Horenstein, M. Bruner, Acid-catalyzed solvolysis of CMP-N-acetyl neuraminatate: Evidence for a sialyl cation with a finite lifetime, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*(43), 10371–10379
- [29] F. Amann, C. Schaub, B. Müller, R. Schmidt, New potent sialyltransferase inhibitors - synthesis of donor and of transition-state analogues of sialyl donor CMP-Neu5Ac, *Chem.-Eur. J.* **1998**, *4*(6), 1106–1115
- [30] V. Francesco, R. Jamie, other, Structural insight into mammalian sialyltransferases, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*(11), 1186–1188
- [31] L. Ni, M. Sun, H. Yu, H. Chokhawala, X. Chen, A. Fisher, Cytidine 5-Monophosphate (CMP)-Induced Structural Changes in a Multifunctional Sialyltransferase from *Pasteurella multocida*, *Biochemistry* **2006**, *45*(7), 2139–2148
- [32] L. Ni, H. Chokhawala, H. Cao, R. Henning, L. Ng, S. Huang, H. Yu, X. Chen, A. Fisher, Crystal Structures of *Pasteurella multocida* Sialyltransferase Complexes with Acceptor and Donor Analogues Reveal Substrate Binding Sites and Catalytic Mechanism, *Biochemistry* **2007**, *46*(21), 6288–6298
- [33] C. Chiu, A. Watts, L. Lairson, M. Gilbert, D. Lim, W. Wakarchuk, S. Withers, N. Strynadka, Structural analysis of the sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni* in complex with a substrate analog, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*(2), 163–170

- [34] C. Chiu, L. Lairson, M. Gilbert, W. Wakarchuk, S. Withers, N. Strynadka, Structural Analysis of the α -2,3-Sialyltransferase Cst-I from *Campylobacter jejuni* in Apo and Substrate-Analogue Bound Forms, *Biochemistry* **2007**, *46*(24), 7196–7204
- [35] S. Takashima, S. Tsuji, M. Tsujimoto, Characterization of the second type of human β -galactoside α 2,6-sialyltransferase (ST6Gal II), which sialylates Gal β 1,4GlcNAc structures on oligosaccharides preferentially, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*(48), 45719–45728
- [36] K. Colley, E. Lee, B. Adler, J. Browne, J. Paulson, Conversion of a Golgi apparatus sialyltransferase to a secretory protein by replacement of the NH₂-terminal signal anchor with a signal peptide., *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*(30), 17619–17622
- [37] C. Jeanneau, V. Chazalet, C. Augé, D. Soumpasis, A. Harduin-Lepers, P. Delanoy, A. Imberty, C. Breton, Structure-function analysis of the human sialyltransferase ST3Gal I, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*(14), 13461–13468
- [38] S. Kitazume-Kawaguchi, S. Kabata, M. Arita, Differential biosynthesis of polysialic or disialic acid structure by ST8Sia II and ST8Sia IV, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*(19), 15696–15703
- [39] A. Datta, J. Paulson, The Sialyltransferase Sialylmotif Participates in Binding the Donor Substrate CMP-NeuAc, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*(4), 1497–1500
- [40] K. Angata, T. Yen, A. El-Battari, B. Macher, M. Fukuda, Unique disulfide bond structures found in ST8Sia IV polysialyltransferase are required for its activity, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*(18), 15369–15377
- [41] K. Drickamer, Letters to the Glyco-Forum: A conserved disulphide bond in sialyltransferases, *Glycobiology* **1993**, *3*(1), 2–3
- [42] A. Datta, R. Chammas, J. Paulson, Conserved cysteines in the sialyltransferase sialylmotifs form an essential disulfide bond, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*(18), 15200–15207
- [43] F. Freiberger, H. Claus, A. Günzel, I. Oltmann-Norden, J. Vionnet, M. Mühlenhoff, U. Vogel, W. Vann, R. Gerardy-Schahn, K. Stummeyer, Biochemical characterization of a *Neisseria meningitidis* polysialyltransferase reveals novel functional motifs in bacterial sialyltransferases, *Mol. Microbiol.* **2007**, *65*(5), 1258–1275
- [44] Y. Kakuta, N. Okino, H. Kajiwara, M. Ichikawa, Y. Takakura, M. Ito, T. Yamamoto, Crystal structure of *Vibrionaceae* *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 α 2,6-sialyltransferase in a ternary complex with donor product CMP and acceptor substrate lactose: catalytic mechanism and substrate recognition, *Glycobiology* **2008**, *18*(1), 66–73
- [45] H. Conradt, A. Bünsch, R. Brossmer, Preparation of 9-fluoro-9-deoxy-N-[2-¹⁴C]acetylneuraminic acid: Activation and transfer onto asialo- α 1-acid glycoprotein, *FEBS Lett.* **1984**, *170*(2), 295–300
- [46] J. Paulson, J. Rearick, R. Hill, Enzymatic properties of β -D-galactoside α (2,6)-Sialyltransferase from bovine colostrum, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*(7), 2363–2371
- [47] W. Laroy, M. Maras, W. Fiers, R. Contreras, A radioactive assay for sialyltransferase activity using 96-well multiscreen filtration plates, *Anal. Biochem.* **1997**, *249*(1), 108–111
- [48] M. Nakamura, A. Tsunoda, M. Saito, Radioimmune assay of sialyltransferase and N-acetylgalactosaminyltransferase activities using specific antibodies on a 96-well filtration plate of a multiscreen assay system, *Anal. Biochem.* **1991**, *198*(1), 154–159

- [49] T. Sato, K. Omichi, T. Ikenaka, Simple assay for sialyltransferase activity with a new fluorogenic substrate, *J. Biochem.* **1988**, *104*(1), 18–21
- [50] H. Gross, U. Sticher, R. Brossmer, A highly sensitive fluorometric assay for sialyltransferase activity using CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc as donor, *Anal. Biochem.* **1990**, *186*(1), 127–134
- [51] L. Spiegel, J. Hadjimichael, E. Rossomando, Assay of sialyltransferase activity by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* **1992**, *573*(1), 23–27
- [52] G. Limberg, G. Slim, R. Furneaux, C. Compston, P. Stangier, M. Palcic, A New Assay For Sialyltransferases Using Fluorescein-Labelled Acceptors, *Liebigs Ann.* **1996**, *1996*(11), 1773–1784
- [53] C. Schaub, B. Muller, R. Schmidt, New sialyltransferase inhibitors based on CMP-quinic acid: development of a new sialyltransferase assay, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*(4), 345–354
- [54] S. Cohen, R. Halcomb, Synthesis and characterization of an anomeric sulfur analogue of CMP-sialic acid, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*(19), 6145–6152
- [55] Y. Kajihara, T. Kamitani, T. Sakakibara, A new fluorescent assay for sialyltransferase, *Carbohydr. Res.* **2001**, *331*(4), 455–459
- [56] H. Gross, R. Brossmer, Enzymatic introduction of a fluorescent sialic acid into oligosaccharide chains of glycoproteins, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *177*(3), 583–589
- [57] K. Washiya, T. Furuike, F. Nakajima, Y. Lee, S. Nishimura, Design of Fluorogenic Substrates for Continuous Assay of Sialyltransferase by Resonance Energy Transfer, *Anal. Biochem.* **2000**, *283*(1), 39–48
- [58] K. Hosoguchi, T. Maeda, J. Furukawa, Y. Shinohara, H. Hinou, M. Sekiguchi, H. To-game, H. Takemoto, H. Kondo, S. Nishimura, An Efficient Approach to the Discovery of Potent Inhibitors against Glycosyltransferases, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 431–438
- [59] L. Warren, The thiobarbituric acid assay of sialic acids, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*(8), 1971–1975
- [60] L. Warren, Thiobarbituric acid assay of sialic acids, *Method. Enzymol.* **1963**, *234*(8), 463–465
- [61] V. Křen, J. Thiem, Ein Multienzymsystem zur Eintopfsynthese des Sialyl-T-Antigens, *Angew. Chem.* **1995**, *107*(8), 979–981
- [62] S. Gosselin, M. Alhussaini, M. Streiff, K. Takabayashi, M. Palcic, A continuous spectrophotometric assay for glycosyltransferases, *Anal. Biochem.* **1994**, *220*(1), 92–97
- [63] J. V. J. Philip McCoy, Jr., I. J. Goldstein, Enzyme-linked lectin assay (ELLA): Use of alkaline phosphatase-conjugated Griffonia simplicifolia B4 isolectin for the detection of α -D-galactopyranosyl end groups, *Anal. Biochem.* **1983**, *130*(2), 437–444
- [64] J. Yeh, R. Cummings, Absorbance-and Light-Based Solid-Phase Assays for CMPNeuAc:Gal β 1-4GlcNAc-R α -2,3-Sialyltransferase, *Anal. Biochem.* **1996**, *236*(1), 126–133
- [65] S. Mattox, K. Walrath, D. Ceiler, D. Smith, R. Cummings, A solid-phase assay for the activity of CMPNeuAc: Gal β 1-4GlcNAc-R α -2,6-sialyltransferase, *Anal. Biochem.* **1992**, *206*(2), 430–436

- [66] J. Halliday, A. Franks, T. Ramsdale, R. Martin, E. Palant, A rapid, semi-automated method for detection of Gal β 1-4GlcNAc α 2,6-sialyltransferase (EC 2.4. 99.1) activity using the lectin Sambucus nigra agglutinin, *Glycobiology* **2001**, *11*(7), 557–564
- [67] W. Klohs, R. Bernacki, W. Korytnyk, Effects of nucleotides and nucleotide: analogs on human serum sialyltransferase, *Cancer Res.* **1979**, *39*(4), 1231–1238
- [68] Y. Kajihara, H. Kodama, T. Wakabayashi, K. Sato, H. Hashimoto, Characterization of inhibitory activities and binding mode of synthetic 6-modified methyl N-acetyl- β -lactosaminide toward rat liver CMP-D-Neu5Ac: D-galactoside-(2,6)- α -D-sialyltransferase, *Carbohydr. Res.* **1993**, *247*, 179–193
- [69] J. Dorst, J. Tikkanen, C. Krezdorn, M. Streiff, E. Berger, J. Kuik, J. Kamerling, J. Vliegthart, Exploring the Substrate Specificities of α -2, 6- and α -2, 3-Sialyltransferases using Synthetic Acceptor Analogues, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *242*(3), 674–681
- [70] N. K. W. B. R. Korytnyk, Walter; Angelino, CMP and CMP-sugar analogs as inhibitors of sialic acid incorporation into glycoconjugates, *Eur. J. Med. Chem.* **1980**, *15*, 77–84
- [71] M. Imamura, H. Hashimoto, Synthesis of novel CMP-NeuNAc analogues having a glycosyl phosphonate structure, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*(9), 1451–1454
- [72] B. Müller, T. Martin, C. Schaub, R. Schmidt, Synthesis of phosphonate analogues of CMP-Neu5Ac determination of α (2,6)-sialyltransferase inhibition, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*(7), 509–512
- [73] L. Whalen, K. McEvoy, R. Halcomb, Synthesis and evaluation of phosphoramidate amino acid-based inhibitors of sialyltransferases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*(2), 301–304
- [74] R. Kleineidam, T. Schmelter, R. Schwarz, R. Schauer, Studies on the inhibition of sialyl- and galactosyltransferases, *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*(1), 57–66
- [75] M. Burkart, S. Vincent, A. Döffels, B. Murray, S. Ley, C. Wong, Chemo-enzymatic synthesis of fluorinated sugar nucleotide: useful mechanistic probes for glycosyltransferases, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*(8), 1937–1946
- [76] K. Jung, R. Schworer, R. Schmidt, Sialyltransferase inhibitors, *Trends Glycosci. Glyc.* **2003**, *15*(85), 275–290
- [77] R. Schwörer, R. Schmidt, Efficient sialyltransferase inhibitors based on glycosides of N-acetylglucosamine, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(8), 1632–1637
- [78] C. Schaub, B. Müller, R. Schmidt, Sialyltransferase inhibitors based on CMP-quinic acid, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *2000*(9), 1745–1758
- [79] H. Sun, J. Yang, K. Amaral, B. Horenstein, Synthesis of a new transition-state analog of the sialyl donor. Inhibition of sialyltransferases, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*(13), 2451–2453
- [80] B. Müller, C. Schaub, R. Schmidt, Efficient sialyltransferase inhibitors based on transition-state analogues of the sialyl donor, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*(20), 2893–2897
- [81] D. Skropeta, R. Schwörer, T. Haag, R. Schmidt, Asymmetric synthesis and affinity of potent sialyltransferase inhibitors based on transition-state analogues, *Glycoconjugate J.* **2004**, *21*(5), 205–219

- [82] D. Skropeta, R. Schwoerer, R. Schmidt, Stereoselective synthesis of phosphoramidate $\alpha(2-6)$ Sialyltransferase transition-State analogue inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*(19), 3351–3354
- [83] C. Hsu, T. Lin, W. Chang, C. Wu, W. Lo, P. Wang, Y. Tsai, Soyasaponin-I-modified invasive behavior of cancer by changing cell surface sialic acids, *Gynecol. oncol.* **2005**, *96*(2), 415–422
- [84] T. Geiger, D. Peeper, Metastasis mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer* **2009**, *1796*(2), 293–308
- [85] J. F. Holland, E. Frei, *Holland-Frei Cancer Medicine, 5th edition*, Hamilton (ON): BC Decker, **2000**
- [86] P. Sugarbaker, Metastatic inefficiency: the scientific basis for resection of liver metastases from colorectal cancer, *J. Surg. Oncol.* **1993**, *53*(S3), 158–160
- [87] R. Kannagi, M. Izawa, T. Koike, K. Miyazaki, N. Kimura, Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis, *Cancer Sci.* **2004**, *95*(5), 377–384
- [88] F. Dall'Olio, M. Chiricolo, Sialyltransferases in cancer, *Glycoconjugate J.* **2001**, *18*(11), 841–850
- [89] I. Brockhausen, J. Yang, N. Dickinson, S. Ogata, S. Itzkowitz, Enzymatic basis for sialyl-Tn expression in human colon cancer cells, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*(6), 595–603
- [90] M. Kono, T. Tsuda, S. Ogata, S. Takashima, H. Liu, T. Hamamoto, S. Itzkowitz, S. Nishimura, S. Tsuji, Redefined substrate specificity of ST6GalNAc II: a second candidate sialyl-Tn synthase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *272*(1), 94–97
- [91] I. Brockhausen, Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1999**, *1473*(1), 67–95
- [92] F. Schneider, W. Kemmner, W. Haensch, G. Franke, S. Gretschel, U. Karsten, P. Schlag, Overexpression of Sialyltransferase CMP-Sialic Acid:Gal β 1,3GalNAc-R α 6-Sialyltransferase is Related to Poor Patient Survival in Human Colorectal Carcinomas, *Cancer Res.* **2001**, *61*(11), 4605–4611
- [93] I. Brockhausen, Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions, *EMBO Rep.* **2006**, *7*(6), 599–604
- [94] R. Singh, B. Campbell, L. Yu, D. Fernig, J. Milton, R. Goodlad, A. FitzGerald, J. Rhodes, Cell surface-expressed Thomsen-Friedenreich antigen in colon cancer is predominantly carried on high molecular weight splice variants of CD44, *Glycobiology* **2001**, *11*(7), 587–592
- [95] G. Springer, Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy, *J. Mol. Med.* **1997**, *75*(8), 594–602
- [96] Y. Takano, Y. Teranishi, S. Terashima, R. Motoki, T. Kawaguchi, Lymph node metastasis-related carbohydrate epitopes of gastric cancer with submucosal invasion, *Surg. Today* **2000**, *30*(12), 1073–1082
- [97] T. Imada, Y. Rino, S. Hatori, M. Takahashi, T. Amano, J. Kondo, T. Suda, Sialyl Tn antigen expression is associated with the prognosis of patients with advanced colorectal cancer, *Hepato-gastroenterol.* **1999**, *46*(25), 208–214

- [98] T. Nakagoe, T. Sawai, T. Tsuji, M. Jibiki, A. Nanashima, H. Yamaguchi, N. Kurosaki, T. Yasutake, H. Ayabe, Circulating sialyl Lewis x, sialyl Lewis a, and sialyl Tn antigens in colorectal cancer patients: multivariate analysis of predictive factors for serum antigen levels, *J. Gastroenterol.* **2001**, *36*(3), 166–172
- [99] S. Itzkowitz, E. Bloom, W. Kokal, G. Modin, S. Hakomori, Y. Kim, Sialosyl-Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients, *Cancer* **1990**, *66*(9), 1960–1966
- [100] R. Soares, A. Marinho, F. Schmitt, Expression of sialyl-Tn in breast cancer. Correlation with prognostic parameters, *Pathol. Res. Pract.* **1996**, *192*(12), 1181–1186
- [101] N. Yoo, Absence of COSMC gene mutations in breast and colorectal carcinomas, *APMIS* **2008**, *116*(2), 154–155
- [102] S. Julien, E. Adriaenssens, K. Ottenberg, A. Furlan, G. Courtand, A. Vercoutter-Edouart, F. Hanisch, P. Delannoy, X. Le Bourhis, ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity, *Glycobiology* **2006**, *16*(1), 54–64
- [103] V. Ravn, E. Dabelsteen, Tissue distribution of histo-blood group antigens., *APMIS* **2000**, *108*(1), 1–28
- [104] N. Matsuura, T. Narita, N. Hiraiwa, M. Hiraiwa, H. Murai, T. Iwase, H. Funahashi, T. Imai, H. Takagi, R. Kannagi, Gene expression of fucosyl- and sialyl-transferases which synthesize sialyl Lewisx, the carbohydrate ligands for E-selectin, in human breast cancer, *Int. J. Oncol.* **1998**, *12*(5), 1157–1164
- [105] Y. Kim, A. Varki, Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer, *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*(5), 569–576
- [106] M. Recchi, M. Hebbbar, L. Hornez, A. Harduin-Lepers, J. Peyrat, P. Delannoy, Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assessment of sialyltransferase expression in human breast cancer, *Cancer Res.* **1998**, *58*(18), 4066–4070
- [107] T. Nakayama, M. Watanabe, T. Katsumata, T. Teramoto, M. Kitajima, Expression of sialyl Lewis x as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma, *Cancer* **1995**, *75*(8), 2051–2056
- [108] D. Christie, F. Shaikh, J. Lucas IV, J. Lucas III, S. Bellis, ST6Gal-I expression in ovarian cancer cells promotes an invasive phenotype by altering integrin glycosylation and function, *J. Ovarian Res.* **2008**, *1*, 3–8
- [109] P. Gessner, S. Riedl, A. Quentmaier, W. Kemmner, Enhanced activity of CMP-NeuAc:Gal β 1-4GlcNAc: α 2,6-sialyltransferase in metastasizing human colorectal tumor tissue and serum of tumor patients, *Cancer Lett.* **1993**, *75*(3), 143–149
- [110] F. Dall’Olio, M. Chiricolo, J. Lau, Differential expression of the hepatic transcript of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase in human colon cancer cell lines, *Int. J. Cancer* **1999**, *81*(2), 243–247
- [111] P. Wang, W. Lee, Y. Lee, C. Juang, Y. Chen, H. Chao, Y. Tsai, C. Yuan, Enhanced expression of α 2,6-sialyltransferase ST6Gal I in cervical squamous cell carcinoma, *Gynecol. oncol.* **2003**, *89*(3), 395–401
- [112] F. Dall’Olio, The sialyl- α 2,6-lactosaminyl-structure: biosynthesis and functional role, *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*(10), 669–676

- [113] S. Lin, W. Kemmner, S. Grigull, P. Schlag, Cell Surface α 2,6-Sialylation Affects Adhesion of Breast Carcinoma Cells, *Exp. Cell Res.* **2002**, *276*(1), 101–110
- [114] E. Seales, G. Jurado, B. Brunson, J. Wakefield, A. Frost, S. Bellis, Hypersialylation of β 1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility, *Cancer Res.* **2005**, *65*(11), 4645–4652
- [115] M. Vierbuchen, W. Fruechtnicht, S. Brackrock, K. Krause, T. Zienkiewicz, Quantitative lectin histochemical and immunohistochemical studies on the occurrence of α (2,3)- and α (2,6)-linked sialic acid residues in colorectal carcinomas. Relation to clinicopathologic features, *Cancer* **1995**, *76*(5), 727–735
- [116] M. Lise, C. Belluco, S. Perera, R. Patel, P. Thomas, A. Ganguly, Clinical correlations of α 2,6-sialyltransferase expression in colorectal cancer patients, *Hybridoma* **2000**, *19*(4), 281–286
- [117] M. Fukuda, Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens, *Cancer Res.* **1996**, *56*(10), 2237–2244
- [118] I. Fujimoto, J. Bruses, U. Rutishauser, Regulation of cell adhesion by polysialic acid, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*(34), 31745–31751
- [119] C. Sandi, Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules, *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*(12), 917–930
- [120] D. Nakata, F. Troy, Degree of Polymerization (DP) of Polysialic Acid (PolySia) on Neural Cell Adhesion Molecules (N-CAMs), *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*(46), 38305–38316
- [121] B. Livingston, J. Paulson, Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*(16), 11504–11507
- [122] M. Eckhardt, M. Mühlenhoff, A. Bethe, J. Koopman, M. Frosch, R. Gerardy-Schahn, Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1, *Nature* **1995**, *373*, 715–718
- [123] H. Hildebrandt, C. Becker, S. Glüer, H. Rösner, R. Gerardy-Schahn, H. Rahmann, Polysialic acid on the neural cell adhesion molecule correlates with expression of polysialyltransferases and promotes neuroblastoma cell growth, *Cancer Res.* **1998**, *58*(4), 779–784
- [124] D. Figarella-Branger, P. Durbec, G. Rougon, Differential spectrum of expression of neural cell adhesion molecule isoforms and L1 adhesion molecules on human neuroectodermal tumors, *Cancer Res.* **1990**, *50*(19), 6364
- [125] J. Roth, C. Zuber, P. Wagner, D. Taatjes, C. Weisgerber, P. Heitz, C. Goridis, D. Bitter-Suermann, Reexpression of poly (sialic acid) units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor, *PNAS* **1988**, *85*(9), 2999–3003
- [126] E. Scheidegger, P. Lackie, J. Papay, J. Roth, In vitro and in vivo growth of clonal sublines of human small cell lung carcinoma is modulated by polysialic acid of the neural cell adhesion molecule., *Lab. Invest.* **1994**, *70*(1), 95–106
- [127] F. Tanaka, Y. Otake, T. Nakagawa, Y. Kawano, R. Miyahara, M. Li, K. Yanagihara, J. Nakayama, I. Fujimoto, K. Ikenaka, *et al.*, Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer, *Cancer Res.* **2000**, *60*(11), 3072–3080

- [128] J. Lastiri, L. Puricelli, L. Todaro, The Neural Cell Adhesion Molecule Is Involved in the Metastatic Capacity in a Murine Model of Lung Cancer, *Mol. Carcinog.* **2010**, *49*, 386–397
- [129] L. Daniel, P. Durbec, E. Gautherot, E. Rouvier, G. Rougon, D. Figarella-Branger, A nude mice model of human rhabdomyosarcoma lung metastases for evaluating the role of polysialic acids in the metastatic process, *Oncogene* **2001**, *20*(8), 997–1004
- [130] F. Tanaka, Y. Otake, T. Nakagawa, Y. Kawano, R. Miyahara, M. Li, K. Yanagihara, K. Inui, H. Oyanagi, T. Yamada, *et al.*, Prognostic significance of polysialic acid expression in resected non-small cell lung cancer, *Cancer Res.* **2001**, *61*(4), 1666–1670
- [131] I. Cheung, A. Vickers, N. Cheung, Sialyltransferase STX (ST8SiaII): a novel molecular marker of metastatic neuroblastoma, *Int. J. Cancer* **2006**, *119*(1), 152–156
- [132] C. Albach, E. Damoc, T. Denzinger, M. Schachner, M. Przybylski, B. Schmitz, Identification of N-glycosylation sites of the murine neural cell adhesion molecule NCAM by MALDI-TOF and MALDI-FTICR mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*(4), 1129–1135
- [133] T. Yamashita, R. Wada, T. Sasaki, C. Deng, U. Bierfreund, K. Sandhoff, R. Proia, A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation, *PNAS* **1999**, *96*(16), 9142–9147
- [134] S. Birkle, G. Zeng, L. Gao, R. Yu, J. Aubry, Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression, *Biochimie* **2003**, *85*(3-4), 455–463
- [135] S. Birklé, S. Ren, A. Slominski, G. Zeng, L. Gao, R. Yu, Down-Regulation of the Expression of O-Acetyl-GD3 by the O-Acetyltransferase cDNA in Hamster Melanoma Cells, *J. Neurochem.* **1999**, *72*(3), 954–961
- [136] G. Zeng, D. Li, L. Gao, S. Birkle, E. Bieberich, A. Tokuda, R. Yu, Alteration of Ganglioside Composition by Stable Transfection with Antisense Vectors against GD3-Synthase Gene Expression, *Biochemistry* **1999**, *38*(27), 8762–8769
- [137] T. Taki, D. Ishikawa, M. Ogura, M. Nakajima, S. Handa, Ganglioside GD1 α Functions in the Adhesion of Metastatic Tumor Cells to Endothelial Cells of the Target Tissue, *Cancer Res.* **1997**, *57*(10), 1882–1888
- [138] D. Cheresch, M. Pierschbacher, M. Herzig, K. Mujoo, Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins., *J. Cell Biol.* **1986**, *102*(3), 688–696
- [139] S. Ladisch, H. Becker, L. Ulsh, Immunosuppression by human gangliosides: I. Relationship of carbohydrate structure to the inhibition of T cell responses, *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* **1992**, *1125*(2), 180–188
- [140] E. Dyatlovitskaya, A. Kandyba, Sphingolipids in tumor metastases and angiogenesis, *Biochemistry (Moscow)* **2006**, *71*(4), 347–353
- [141] Y. Gu, J. Zhang, W. Mi, J. Yang, F. Han, X. Lu, W. Yu, Silencing of GM3 synthase suppresses lung metastasis of murine breast cancer cells, *Breast Cancer Res.* **2008**, *10*(1), 1–12
- [142] H. Sasaki, T. Momoi, C. Yamanaka, T. Yorifuji, M. Kaji, H. Mikawa, Changes in the ganglioside composition of human neuroblastoma cells under different growth conditions, *Int. J. Cancer* **1991**, *47*(5), 742–745

- [143] S. Ruan, M. Raj, K. Lloyd, Relationship of glycosyltransferases and mRNA levels to ganglioside expression in neuroblastoma and melanoma cells, *J. Neurochem.* **1999**, *72*(2), 514–521
- [144] S. Birklé, L. Gao, G. Zeng, R. Yu, Down-Regulation of GD3 Ganglioside and Its O-Acetylated Derivative by Stable Transfection with Antisense V, *J. Neurochem.* **2000**, *74*(2), 547–554
- [145] K. Hamamura, K. Furukawa, T. Hayashi, T. Hattori, J. Nakano, H. Nakashima, T. Okuda, H. Mizutani, H. Hattori, M. Ueda, *et al.*, Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells, *PNAS* **2005**, *102*(31), 11041–11046
- [146] G. Marquina, H. Waki, L. Fernandez, K. Kon, A. Carr, O. Valiente, R. Perez, S. Ando, Gangliosides expressed in human breast cancer, *Cancer Res.* **1996**, *56*(22), 5165–5171
- [147] A. Cazet, J. Lefebvre, E. Adriaenssens, S. Julien, M. Bobowski, A. Grigoriadis, A. Tutt, D. Tulasne, X. Le Bourhis, P. Delannoy, GD3 synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation, *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 1526–1535
- [148] I. Kijima-Suda, Y. Miyamoto, S. Toyoshima, M. Itoh, T. Osawa, Inhibition of experimental pulmonary metastasis of mouse colon adenocarcinoma 26 sublines by a sialic acid: nucleoside conjugate having sialyltransferase inhibiting activity, *Cancer Res.* **1986**, *46*(2), 858–862
- [149] I. Kijima-Suda, T. Miyazawa, M. Itoh, S. Toyoshima, T. Osawa, Possible mechanism of inhibition of experimental pulmonary metastasis of mouse colon adenocarcinoma 26 sublines by a sialic acid: nucleoside conjugate, *Cancer Res.* **1988**, *48*(13), 3728–3732
- [150] B. Harvey, P. Thomas, Inhibition of CMP-sialic acid transport in human liver and colorectal cancer cell lines by a sialic acid nucleoside conjugate (KI-8110), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *190*(2), 571–575
- [151] X. Huang, Fluorescence polarization competition assay: the range of resolvable inhibitor potency is limited by the affinity of the fluorescent ligand, *J. Biomol. Screen.* **2003**, *8*(1), 34–38
- [152] A. Pope, U. Haupts, K. Moore, Homogeneous fluorescence readouts for miniaturized high-throughput screening: theory and practice, *Drug Discov. Today* **1999**, *4*(8), 350–362
- [153] J. Helm, Y. Hu, L. Chen, B. Gross, S. Walker, Identification of active-site inhibitors of MurG using a generalizable, high-throughput glycosyltransferase screen, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*(37), 11168–11169
- [154] Y. Hu, J. Helm, L. Chen, C. Ginsberg, B. Gross, B. Kraybill, K. Tiyanont, X. Fang, T. Wu, S. Walker, Identification of selective inhibitors for the glycosyltransferase MurG via high-throughput screening, *Chem. Biol.* **2004**, *11*(5), 703–711
- [155] M. Soltero-Higgin, E. Carlson, J. Phillips, L. Kiessling, Identification of inhibitors for UDP-galactopyranose mutase, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(34), 10532–10533
- [156] M. Roehrl, J. Wang, G. Wagner, Discovery of small-molecule inhibitors of the NFAT-calcineurin interaction by competitive high-throughput fluorescence polarization screening, *Biochemistry* **2004**, *43*(51), 16067–16075

- [157] J. Owicki, *et al.*, Fluorescence polarization and anisotropy in high throughput screening: perspectives and primer, *J. Biomol. Screen.* **2000**, *5*(5), 297–306
- [158] G. Lokesh, A. Rachamalla, G. Kumar, A. Natarajan, High-throughput fluorescence polarization assay to identify small molecule inhibitors of BRCT domains of breast cancer gene 1, *Anal. Biochem.* **2006**, *352*(1), 135–141
- [159] Y. Du, K. Moulick, A. Rodina, J. Aguirre, S. Felts, R. Dingledine, H. Fu, G. Chiosis, High-throughput screening fluorescence polarization assay for tumor-specific Hsp90, *J. Biomol. Screen.* **2007**, *12*(7), 915–924
- [160] S. Turconi, K. Shea, S. Ashman, K. Fantom, D. Earnshaw, R. Bingham, U. Haupts, M. Brown, A. Pope, Real experiences of uHTS: a prototypic 1536-well fluorescence anisotropy-based uHTS screen and application of well-level quality control procedures, *J. Biomol. Screen.* **2001**, *6*(5), 275–290
- [161] A. Speers, B. Cravatt, Chemical Strategies for Activity-Based Proteomics, *ChemBioChem* **2004**, *5*(1), 41–47
- [162] M. Hagenstein, J. Mussnug, K. Lotte, R. Plessow, A. Brockhinke, O. Kruse, N. Sewald, Affinitätsbasierte Markierung von Proteinfamilien mit reversiblen Inhibitoren—ein Konzept für die funktionelle Proteomik, *Angew. Chem.* **2003**, *115*(45), 5793–5796
- [163] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. Cravatt, Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases, *PNAS* **2004**, *101*(27), 10000–10005
- [164] K. Tanaka, X. Chen, F. Yoneda, 5-Arylidene 1,3-Dimethylbarbituric Acid Derivatives, Mild Organic Oxidants for Allylic and Benzylic Alcohols, *Chem. Pharm. Bull.* **1988-01-25**, *36*(1), 60–69
- [165] E. Vodovozova, Photoaffinity labeling and its application in structural biology, *Biochemistry (Moscow)* **2007**, *72*(1), 1–20
- [166] J. Brunner, H. Senn, F. Richards, 3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. A new carbene generating group for photolabeling reagents., *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*(8), 3313–3318
- [167] G. Dorman, G. Prestwich, Benzophenone photophores in biochemistry, *Biochemistry* **1994**, *33*(19), 5661–5673
- [168] A. Kawamura, S. Hindi, D. Mihai, L. James, O. Aminova, Binding is not enough: Flexibility is needed for photocrosslinking of Lck kinase by benzophenone photoligands, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*(19), 8824–8829
- [169] S. Hindi, H. Deng, L. James, A. Kawamura, Selective photolabeling of Lck kinase in complex proteome, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*(21), 5625–5628
- [170] H. Yu, S. Huang, H. Chokhawala, M. Sun, H. Zheng, X. Chen, Highly Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Naturally Occurring and Non-Natural α -2,6-Linked Sialosides: A *P. damsela* α -2,6-Sialyltransferase with Extremely Flexible Donor-Substrate Specificity, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*(24), 3938–3944
- [171] H. Yu, H. Chokhawala, R. Karpel, H. Yu, B. Wu, J. Zhang, Y. Zhang, Q. Jia, X. Chen, A multifunctional *Pasteurella multocida* sialyltransferase: a powerful tool for the synthesis of sialoside libraries, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(50), 17618–17619
- [172] J. J. Preidl, Synthese einer Fluoreszenzsonde für die Sialinsäuretransferasen, Master's thesis, Freie Universität Berlin **2007**

- [173] V. Uryga-Polowy, D. Kosslick, C. Freund, J. Rademann, Resin-Bound Aminofluorescein for C-Terminal Labeling of Peptides: High-Affinity Polarization Probes Binding to Polyproline-Specific GYF Domains, *ChemBioChem* **2008**, *9*(15), 2452–2462
- [174] F. Rossi, J. Kao, Practical Method for the Multigram Separation of the 5- and 6-Isomers of Carboxyfluorescein, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*(4), 495–497
- [175] S. Meyer, S. Schreiber, Acceleration of the Dess-Martin oxidation by water, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*(24), 7549–7552
- [176] C. Ip, D. Ha, P. Morris, M. Puttemans, D. Venton, Separation of nucleosides and nucleotides by reversed-phase high-performance liquid chromatography with volatile buffers allowing sample recovery, *Anal. Biochem.* **1985**, *147*(1), 180–185
- [177] R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista, Absorption and fluorescence properties of fluorescein, *Spectrochim. Acta, Part A* **1995**, *51*(6), L7–L21
- [178] R. Schwörer, Sialyltransferase Inhibitoren, Ph.D. thesis, Universität Konstanz **2003**
- [179] C. Meier, W. Laux, J. Bats, Asymmetric synthesis of chiral, nonracemic dialkyl α -hydroxyarylmethyl- and α -, β - and γ -hydroxyalkylphosphonates from keto phosphonates, *Liebigs Ann.* **1995**, *1995*(11), 1963–1979
- [180] D. Wiemer, Synthesis of nonracemic phosphonates, *Tetrahedron* **1997**, *53*(49), 16609–16643
- [181] D. Skropeta, R. Schmidt, Chiral, non-racemic [α]-hydroxyphosphonates and phosphonic acids via stereoselective hydroxylation of diallyl benzylphosphonates, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*(2), 265–273
- [182] F. Davis, M. Weismiller, C. Murphy, R. Reddy, B. Chen, Chemistry of oxaziridines. 18. Synthesis and enantioselective oxidations of the [(8,8-dihalocamphoryl)sulfonyl]oxaziridines, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*(26), 7274–7285
- [183] D. Pogatchnik, D. Wiemer, Enantioselective synthesis of α -hydroxy phosphonates via oxidation with (camphorsulfonyl) oxaziridines, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*(20), 3495–3498
- [184] F. Davis, B. Chen, Asymmetric hydroxylation of enolates with N-sulfonyloxaziridines, *Chem. Rev.* **1992**, *92*(5), 919–934
- [185] D. Cermak, Y. Du, D. Wiemer, Synthesis of Nonracemic Dimethyl α -(Hydroxyfarnesyl) phosphonates via Oxidation of Dimethyl Farnesylphosphonate with (Camphorsulfonyl) oxaziridines, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*(2), 388–393
- [186] R. Engel, J. Cohen, *Synthesis of carbon-phosphorus bonds*, CRC press, **2004**
- [187] V. Gagnard, A. Leydet, A. Morere, J. Montero, I. Lefebvre, G. Gosselin, C. Pannecouque, E. De Clercq, Synthesis and in vitro evaluation of S-acyl-3-thiopropyl prodrugs of Foscarnet, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*(6), 1393–1402
- [188] J. Dale, H. Mosher, Nuclear magnetic resonance enantiomer reagents. Configurational correlations via nuclear magnetic resonance chemical shifts of diastereomeric mandelate, O-methylmandelate, and α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) esters, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*(2), 512–519
- [189] F. Hammerschmidt, *et al.*, Determination of absolute configuration of α -hydroxyphosphonates by ^{31}P NMR spectroscopy of corresponding Mosher esters, *Tetrahedron* **1994**, *50*(34), 10253–10264

- [190] H. Kunz, C. Unverzagt, Der Allyloxycarbonyl (aloc)-Rest–die Verwandlung einer untauglichen in eine wertvolle Aminoschutzgruppe für die Peptidsynthese, *Angew. Chem.* **1984**, *96*(6), 426–427
- [191] B. Mathew, R. Schmidt, Potential sialyltransferase inhibitors based on neuraminyl substitution by hetaryl rings, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*(3-4), 558–566
- [192] Y. Lee, Y. Kim, K. Lee, K. Kim, B. Kim, H. Kim, C. Kim, S. Do, Cloning and Expression of cDNA for a Human Sia α 2,3Gal β 1,4GlcNA: α 2,8-Sialyltransferase (hST8Sia III), *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *360*(1), 41–46
- [193] M. Williams, H. Kitagawa, A. Datta, J. Paulson, J. Jamieson, Large-scale expression of recombinant sialyltransferases and comparison of their kinetic properties with native enzymes, *Glycoconjugate J.* **1995**, *12*(6), 755–761
- [194] M. Sun, Y. Li, H. Chokhawala, R. Henning, X. Chen, N-Terminal 112 amino acid residues are not required for the sialyltransferase activity of *Photobacterium damsela* α 2,6-sialyltransferase, *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*(4), 671–676
- [195] X. Huang, A. Aulabaugh, Application of fluorescence polarization in HTS assays, *Method. Mol. Biol.* **2009**, *565*, 127–143
- [196] M. Roehrl, J. Wang, G. Wagner, A General Framework for Development and Data Analysis of Competitive High-Throughput Screens for Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions by Fluorescence Polarization, *Biochemistry* **2004**, *43*(51), 16056–16066
- [197] M. Roehrl, S. Kang, J. Aramburu, G. Wagner, A. Rao, P. Hogan, Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules, *PNAS* **2004**, *101*(20), 7554–7559
- [198] A. Weljie, H. Vogel, Steady-state fluorescence spectroscopy, *Method. Mol. Biol.* **2002**, *173*, 75–88
- [199] J. Zhang, T. Chung, K. Oldenburg, *et al.*, A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays, *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4*(2), 67–73
- [200] C. Yung-Chi, W. Prusoff, Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*(23), 3099–3108
- [201] P. Munson, D. Rodbard, An Exact Correction to the Cheng-Prusoff Correction, *J. Recept. Signal Transduction* **1988**, *8*(1-4), 533–546
- [202] Z. Nikolovska-Coleska, R. Wang, X. Fang, H. Pan, Y. Tomita, P. Li, P. Roller, K. Krajewski, N. Saito, J. Stuckey, *et al.*, Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization, *Anal. Biochem.* **2004**, *332*(2), 261–273
- [203] M. Lisurek, B. Rupp, J. Wichard, M. Neuenschwander, J. von Kries, R. Frank, J. Rademann, R. Kühne, Design of chemical libraries with potentially bioactive molecules applying a maximum common substructure concept, *Mol. Diversity* **2010**, *14*(2), 401–408
- [204] B. Gunter, C. Brideau, B. Pikounis, A. Liaw, Statistical and graphical methods for quality control determination of high-throughput screening data, *J. Biomol. Screen.* **2003**, *8*(6), 624–633

- [205] C. Brideau, B. Gunter, B. Pikounis, A. Liaw, Improved statistical methods for hit selection in high-throughput screening, *J. Biomol. Screen.* **2003**, *8*(6), 634–647
- [206] N. Thorne, D. Auld, J. Inglese, Apparent activity in high-throughput screening: origins of compound-dependent assay interference, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*(3), 315–324
- [207] X. Cheng, J. Hochlowski, H. Tang, D. Hepp, C. Beckner, S. Kantor, R. Schmitt, Studies on repository compound stability in DMSO under various conditions, *J. Biomol. Screen.* **2003**, *8*(3), 292–304
- [208] G. Rishton, Reactive compounds and in vitro false positives in HTS, *Drug Discov. Today* **1997**, *2*(9), 382–384
- [209] J. Huth, R. Mendoza, E. Olejniczak, R. Johnson, D. Cothron, Y. Liu, C. Lerner, J. Chen, P. Hajduk, ALARM NMR: a rapid and robust experimental method to detect reactive false positives in biochemical screens, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(1), 217–224
- [210] J. Baell, G. Holloway, New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*(7), 2719–2740
- [211] J. Huth, D. Song, R. Mendoza, C. Black-Schaefer, J. Mack, S. Dorwin, U. Lador, J. Severin, K. Walter, D. Bartley, *et al.*, Toxicological evaluation of thiol-reactive compounds identified using a La assay to detect reactive molecules by nuclear magnetic resonance, *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*(12), 1752–1759
- [212] X. Liu, D. Sok, Identification of alkylation-sensitive target chaperone proteins and their reactivity with natural products containing michael acceptor, *Arch. Pharmacol. Res.* **2003**, *26*(12), 1047–1054
- [213] W. Li, J. Heinze, W. Haehnel, Site-specific binding of quinones to proteins through thiol addition and addition-elimination reactions, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(17), 6140–6141
- [214] K. Tanaka, X. Chen, F. Yoneda, Oxidation of thiol with 5-arylidene-1,3-dimethylbarbituric acid: application to synthesis of unsymmetrical disulfide, *Tetrahedron* **1988**, *44*(11), 3241–3249
- [215] J. Meissner, A. van der Laan, U. Pandit, Reduction of 5-arylidenebarbiturate derivatives by thiols, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*(17), 2757–2760
- [216] O. Kaumanns, H. Mayr, Electrophilicity Parameters of 5-Benzylidene-2,2-dimethyl[1,3]dioxane-4,6-diones (Benzylidene Meldrum's Acids), *J. Org. Chem.* **2008**, *73*(7), 2738–2745
- [217] L. Sleno, R. Staack, E. Varesio, G. Hopfgartner, Investigating the in vitro metabolism of fipexide: characterization of reactive metabolites using liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*(14), 2301–2311
- [218] R. Oballa, J. Truchon, C. Bayly, N. Chauret, S. Day, S. Crane, C. Berthelette, A generally applicable method for assessing the electrophilicity and reactivity of diverse nitrile-containing compounds, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*(4), 998–1002
- [219] J. Powers, D. Piper, Y. Li, V. Mayorga, J. Anzola, J. Chen, J. Jaen, G. Lee, J. Liu, M. Peterson, *et al.*, SAR and mode of action of novel non-nucleoside inhibitors of hepatitis C NS5b RNA polymerase, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*(3), 1034–1046

- [220] E. Carlson, J. May, L. Kiessling, Chemical probes of UDP-galactopyranose mutase, *Chem. Biol.* **2006**, *13*(8), 825–837
- [221] J. Metz, J. Huth, P. Hajduk, Enhancement of chemical rules for predicting compound reactivity towards protein thiol groups, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2007**, *21*(1), 139–144
- [222] J. Eswaran, J. Von Kries, B. Marsden, E. Longman, J. Debreczeni, E. Ugochukwu, A. Turnbull, W. Lee, S. Knapp, A. Barr, Crystal structures and inhibitor identification for PTPN5, PTPRR and PTPN7: a family of human MAPK-specific protein tyrosine phosphatases, *Biochem. J.* **2006**, *395*(Pt 3), 483–491
- [223] N. Mashhoon, C. Pruss, M. Carroll, P. Johnson, N. Reich, Selective inhibitors of bacterial DNA adenine methyltransferases, *J. Biomol. Screen.* **2006**, *11*(5), 497–510
- [224] I. Schepetkin, A. Khlebnikov, L. Kirpotina, M. Quinn, Novel small-molecule inhibitors of anthrax lethal factor identified by high-throughput screening, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*(17), 5232–5244
- [225] Z. Zawahir, R. Dayam, J. Deng, C. Pereira, N. Neamati, Pharmacophore guided discovery of small-molecule human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 inhibitors, *J. Med. Chem.* **2008**, *52*(1), 20–32
- [226] M. Manger, M. Scheck, H. Prinz, J. Von Kries, T. Langer, K. Saxena, H. Schwalbe, A. Fürstner, J. Rademann, H. Waldmann, Discovery of Mycobacterium Tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase A (MptpA) Inhibitors Based on Natural Products and a Fragment-Based Approach, *ChemBioChem* **2005**, *6*(10), 1749–1753
- [227] P. Johnston, C. Foster, T. Shun, J. Skoko, S. Shinde, P. Wipf, J. Lazo, Development and implementation of a 384-well homogeneous fluorescence intensity high-throughput screening assay to identify mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 dual-specificity protein phosphatase inhibitors, *Assay Drug Dev. Technol.* **2007**, *5*(3), 319–332
- [228] B. Edwards, C. Bologna, S. Young, K. Balakin, E. Prossnitz, N. Savchuck, L. Sklar, T. Oprea, Integration of virtual screening with high-throughput flow cytometry to identify novel small molecule formylpeptide receptor antagonists, *Mol. Pharmacol.* **2005**, *68*(5), 1301–1310
- [229] D. Chen, M. Misra, L. Sower, J. Peterson, G. Kellogg, C. Schein, Novel inhibitors of anthrax edema factor, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*(15), 7225–7233
- [230] D. Vidal, J. Blobel, Y. Pérez, M. Thormann, M. Pons, Structure-based discovery of new small molecule inhibitors of low molecular weight protein tyrosine phosphatase, *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*(8), 1102–1108
- [231] Y. Fukunishi, Y. Mikami, K. Takedomi, M. Yamanouchi, H. Shima, H. Nakamura, Classification of chemical compounds by protein-compound docking for use in designing a focused library, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*(2), 523–533
- [232] M. Brisson, T. Nguyen, A. Vogt, J. Yalowich, A. Giorgianni, D. Tobi, I. Bahar, C. Stephenson, P. Wipf, J. Lazo, Discovery and characterization of novel small molecule inhibitors of human Cdc25B dual specificity phosphatase, *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*(4), 824–833
- [233] M. Forino, S. Johnson, T. Wong, D. Rozanov, A. Savinov, W. Li, R. Fattorusso, B. Be-

- cattini, A. Orry, D. Jung, *et al.*, Efficient synthetic inhibitors of anthrax lethal factor, *PNAS* **2005**, *102*(27), 9499–9504
- [234] T. Doman, S. McGovern, B. Witherbee, T. Kasten, R. Kurumbail, W. Stallings, D. Connolly, B. Shoichet, Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*(11), 2213–2221
- [235] N. Kim, J. Yoon, J. Kim, J. Lee, Y. Chon, M. Hwang, I. Ha, W. Song, Putative therapeutic agents for the learning and memory deficits of people with Down syndrome, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*(14), 3772–3776
- [236] R. Dayam, L. Al-Mawsawi, Z. Zawahir, M. Witvrouw, Z. Debyser, N. Neamati, Quinolone 3-carboxylic acid pharmacophore: Design of second generation HIV-1 integrase inhibitors, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*(5), 1136–1144
- [237] G. Deng, W. Li, J. Shen, H. Jiang, K. Chen, H. Liu, Pyrazolidine-3,5-dione derivatives as potent non-steroidal agonists of farnesoid X receptor: Virtual screening, synthesis, and biological evaluation, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*(20), 5497–5502
- [238] N. Huang, A. Nagarsekar, G. Xia, J. Hayashi, A. MacKerell Jr, Identification of non-phosphate-containing small molecular weight inhibitors of the tyrosine kinase p56 Lck SH2 domain via in silico screening against the pY + 3 binding site, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*(14), 3502–3511
- [239] S. Rajamaki, A. Innitzer, C. Falciani, C. Tintori, F. Christ, M. Witvrouw, Z. Debyser, S. Massa, M. Botta, Exploration of novel thiobarbituric acid-, rhodanine- and thiohydantoin-based HIV-1 integrase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*(13), 3615–3618
- [240] H. Kim, H. Choo, Y. Cho, K. No, A. Pae, Novel GSK-3 β inhibitors from sequential virtual screening, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*(2), 636–643
- [241] F. Chen, C. Hancock, A. Macias, J. Joh, K. Still, S. Zhong, A. MacKerell Jr, P. Shapiro, Characterization of ATP-independent ERK inhibitors identified through in silico analysis of the active ERK2 structure, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*(24), 6281–6287
- [242] S. Rayter, R. Elliott, J. Travers, M. Rowlands, T. Richardson, K. Boxall, K. Jones, S. Linardopoulos, P. Workman, W. Aherne, *et al.*, A chemical inhibitor of PPM1D that selectively kills cells overexpressing PPM1D, *Oncogene* **2007**, *27*(8), 1036–1044
- [243] H. Yang, A. Shelat, R. Guy, V. Gopinath, T. Ma, K. Du, G. Lukacs, A. Taddei, C. Folli, N. Pedemonte, *et al.*, Nanomolar affinity small molecule correctors of defective $\Delta F508$ -CFTR chloride channel gating, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*(37), 35079–35085
- [244] X. Hu, G. Prehna, C. Stebbins, Targeting plague virulence factors: a combined machine learning method and multiple conformational virtual screening for the discovery of Yersinia protein kinase A inhibitors, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*(17), 3980–3983
- [245] G. Kumar, P. Parasuraman, S. Sharma, T. Banerjee, K. Karmodiya, N. Surolia, A. Surolia, Discovery of a rhodanine class of compounds as inhibitors of Plasmodium falciparum enoyl-acyl carrier protein reductase, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*(11), 2665–2675
- [246] X. Wang, B. Thomas, R. Sachdeva, L. Arterburn, L. Frye, P. Hatcher, D. Cornwell, J. Ma, Mechanism of arylating quinone toxicity involving Michael adduct formation and induction of endoplasmic reticulum stress, *PNAS* **2006**, *103*(10), 3604–3609
- [247] Y. Hu, S. Walker, Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases, *Chem. Biol.* **2002**, *9*(12), 1287–1296

- [248] K. Yamazaki, N. Kusunose, K. Fujita, H. Sato, S. Asano, A. Dan, M. Kanaoka, Identification of phosphodiesterase-1 and 5 dual inhibitors by a ligand-based virtual screening optimized for lead evolution, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*(5), 1371–1379
- [249] Z. Xia, C. Knaak, J. Ma, Z. Beharry, C. McInnes, W. Wang, A. Kraft, C. Smith, Synthesis and evaluation of novel inhibitors of Pim-1 and Pim-2 protein kinases, *J. Med. Chem.* **2008**, *52*(1), 74–86
- [250] B. Allison, V. Phuong, L. McAtee, M. Rosen, M. Morton, C. Prendergast, T. Barrett, G. Lagaud, J. Freedman, L. Li, *et al.*, Identification and optimization of anthranilic sulfonamides as novel, selective cholecystikinin-2 receptor antagonists, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*(21), 6371–6390
- [251] L. Podust, J. Von Kries, A. Eddine, Y. Kim, L. Yermalitskaya, R. Kuehne, H. Ouellet, T. Warriier, M. Altekoster, J. Lee, *et al.*, Small-molecule scaffolds for CYP51 inhibitors identified by high-throughput screening and defined by X-ray crystallography, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*(11), 3915–3923
- [252] Y. Oyamada, H. Ito, M. Fujimoto-Nakamura, A. Tanitame, N. Iwai, K. Nagai, J. Yamagishi, M. Wachi, Anucleate cell blue assay: a useful tool for identifying novel type II topoisomerase inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*(1), 348–350
- [253] A. Kauppi, R. Nordfelth, H. Uvell, H. Wolf-Watz, M. Elofsson, Targeting Bacterial Virulence: Inhibitors of Type III Secretion in *Yersinia*, *Chem. Biol.* **2003**, *10*(3), 241–249
- [254] K. Okabe, R. Wada, K. Ohno, S. Uchiyama, T. Santa, K. Imai, Development of hydrophilic fluorogenic derivatization reagents for thiols: 4-(N-acetylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole and 4-(N-trichloroacetylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole, *J. Chromatogr.* **2002**, *982*(1), 111–118
- [255] S. Uchiyama, T. Santa, N. Okiyama, T. Fukushima, K. Imai, Fluorogenic and fluorescent labeling reagents with a benzofurazan skeleton, *Biomed. Chromatogr.* **2001**, *15*(5), 295–318
- [256] K. Mequanint, A. Patel, D. Bezuidenhout, Synthesis, Swelling Behavior, and Biocompatibility of Novel Physically Cross-Linked Polyurethane-block-Poly (glycerol methacrylate) Hydrogels, *Biomacromolecules* **2006**, *7*(3), 883–891
- [257] W. Chan, P. White, *Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach*, Oxford University Press, USA, **2000**
- [258] H. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*(21), 7512–7515
- [259] R. Cer, U. Mudunuri, R. Stephens, F. Lebeda, IC50-to-Ki: a web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, W441–W445