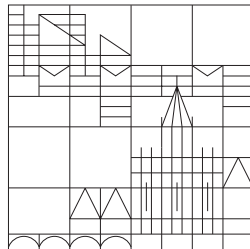


Heike Busse

Rationales Design und Synthese von
carbocyclischen Kohlenhydratmimetika
zur Inhibition
mikrobieller Sialidasen und Trans-Sialidasen



Konstanz 2006

Rationales Design und Synthese von
carbocyclischen Kohlenhydratmimetika
zur Inhibition
mikrobieller Sialidasen und Trans-Sialidasen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
an der Universität Konstanz
Naturwissenschaftliche Sektion
Fachbereich Chemie

vorgelegt von

Heike Busse

2006

Die experimentellen Arbeiten dieser Dissertation wurden in der Zeit von Oktober 2002 bis Dezember 2005 im Fachbereich Chemie der Universität Konstanz am Lehrstuhl für Organische Chemie unter Leitung von PD Dr. Hansjörg Streicher durchgeführt.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen, die einen Teil zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn PD Dr. Hansjörg Streicher für die interessante Themenstellung, für die große Handlungsfreiheit, sowie für die Möglichkeit, die Ergebnisse international präsentieren zu können.

Herrn Prof. Dr. A. Marx für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Den Mitarbeitern der NMR-Abteilung für die schnelle Aufnahme der NMR-Spektren, insbesondere in der Endphase meiner Promotion.

Prof. R. R. Schmidt und seinen Mitarbeitern für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe und die große Hilfsbereitschaft.

Meinen Laborkollegen Ramon Kranaster, Jan Müller, Moritz Biskup, Jens Gaster und Benjamin Bornemann für die gute Organisation des Labortalltags, die vielen Diskussionen über die Chemie hinaus und den moralischen Beistand besonders an den Rückwärtstagen.

Dr. Torsten Winkler, Dr. Marco Kühne und Moritz Biskup für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Anke Hartung für unsere jahrelange Freundschaft, unsere gemeinsame Studienzeit in Würzburg und die gegenseitige Stütze während der Höhen und Tiefen in unserer Promotionszeit.

Meinen Kieler Freunden Sonja Lühje, Edda Kettler, Arne Stademann, Torsten Winkler, Markus Deichmann, Tim Dreessen, Felix Köhler und Britta Harbaum dafür, dass sie mich in all meinen Entscheidungen voll unterstützt und dafür gesorgt haben, dass Kiel zu einem zweiten Zuhause wurde, in dem ich immer meinen Akku aufladen kann.

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig.

Man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Mögliche getan hat.

Johann Wolfgang von Goethe, „Italienreise“ (1787)

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. DIE SIALIDASE- FAMILIE	1
1.2. DIE SIALIDASE-REAKTION	1
1.3. SIALIDASEN UND KRANKHEITEN	2
1.4. BAKTERIELLE SIALIDASEN	2
1.5. TRANS-SIALIDASEN	3
1.6. TRYPANOSOMA CRUZI ALS ERREGER DER CHAGAS-KRANKHEIT	4
1.6.1. STRUKTUR DER TCTS	5
1.6.2. BESONDERHEITEN IM KATALYTISCHEN ZENTRUM	7
1.6.3. KOMPLEXE MIT DANA	7
1.6.4. KOMPLEXE MIT LAKTOSE ALS SUBSTRAT	8
1.6.5. MECHANISMUS DER TRANS-SIALIDASE-REAKTION	10
2. THEMENSTELLUNG	14
2.1. CYCLOHEXENDERIVATE ALS NEURAMINIDASE-HEMMER	14
2.2. CYCLOHEXENPHOSPHONATE ALS NEUE ÜBERGANGSZUSTANDSANALOGA	15
2.3. KONZEPT FÜR INHIBITORDESIGN UND LEITSTRUKUREN	16
3. SYNTHESE VON PSEUDO-SIALOSIDEN	19
3.1. DARSTELLUNG DER PSEUDO-SIALOSIDE ÜBER DIE BENZYLESTER-STRATEGIE	19
3.1.1. RETROSYNTHESE ZUR DARSTELLUNG DES CYCLOHEXENPHOSPHONAT-MONOBENZYLESTERS	19
3.1.1.1. DARSTELLUNG DES ALKOHOLS 8	20
3.1.1.2. DARSTELLUNG DES DIPHOSPHONATS 12	21
3.1.1.3. ENTSCHÜTZUNG DES DIPHOSPHONATS 12	23
3.1.1.4. ZYKLISIERUNG ZUM CYCLOHEXENPHOSPHONAT 14	24
3.1.1.5. EINFÜHRUNG DES ACETAMIDS 15	25
3.1.1.6. SPALTUNG ZUM MONOESTER 16	26
3.1.1.7. ENTSCHÜTZUNG DES MONOESTERS 17	27
3.1.2. DARSTELLUNG DER GEMISCHTEN DIESTER	28
3.1.2.1. SÄURECHLORIDE	28
3.1.2.2. ESTERSYNTHESE MITTELS KUPPLUNGSREAGENZIEEN	29
3.1.2.3. ESTERSYNTHESE MITTELS MITSUNOBU-REAKTION	30
3.1.2.4. ESTERSYNTHESE VIA ALKYLIERUNG	30
3.1.3. SYNTHESE EINES 1,6- VERKNÜPFTEN PSEUDO-SIALOSIDS	31
3.1.3.1. RETROSYNTHESE DES 1,6- VERKNÜPFTEN PSEUDO-SIALOSIDS	31
3.1.3.2. SYNTHESE DES PSEUDO-SIALOSIDS 21	32
3.1.3.3. ENTSCHÜTZUNG VON 21	32
3.1.4. SYNTHESE EINES UNPOLAREN AGLYCONMIMETIKUMS	33
3.1.4.1. RETROSYNTHESE FÜR EIN OKTYLCYCLOHEXENPHOSPHONAT	34
3.1.4.2. SYNTHESE DES OKTYLCYCLOHEXENPHOSPHONATS 25	34
3.1.4.3. ENTSCHÜTZUNG VON 25	35
3.1.5. DARSTELLUNG EINES 2,3- VERKNÜPFTEN SIALOSIDS	36
3.1.5.1. RETROSYNTHESE FÜR EIN 2,3- VERKNÜPFTES SIALOSID	36
3.1.5.2. SYNTHESE DES GALAKTOSEBAUSTEINS FÜR EINE 2,3- VERKNÜPFUNG	37
3.1.5.3. VERSUCH DER UMSETZUNG ZUM 2,3- VERKNÜPFTEN SIALOSID	38
3.1.6. RETROSYNTHESE FÜR EIN 2,3- VERKNÜPFTES SIALOSID MIT ETHYLENSPACER	39

3.1.6.1. DARSTELLUNG DES GALAKTOSEBAUSTEINS MIT ETHYLENLINKER	39
3.1.6.2. VERSUCH DER SYNTHESSE EINES 2,3- VERKNÜPFTEN SIALOSIDS MIT ETHYLENSPACER	40
3.1.7. VARIIERTE RETROSYNTHESE FÜR EIN 2,3- VERKNÜPFTES SIALOSID MIT ETHYLENSPACER	41
3.1.7.1. SYNTHESSE DES GALAKTOSEBAUSTEINS	42
3.1.7.2. VERSUCH DER UMSETZUNG ZU EINEM 2,3- VERKNÜPFTEN SIALOSID MIT ETHYLENSPACER	43
3.1.8. VORÜBERLEGUNGEN FÜR EINE NEUE SYNTHESESTRATEGIE FÜR PSEUDO-SIALOSIDE	43
3.1.8.1. TEST FÜR MITSUNOBU-BEDINGUNGEN	44
3.2. DARSTELLUNG ÜBER DIE METHYLESTER-STRATEGIE	45
3.2.1. RETROSYNTHESE FÜR DIE DARSTELLUNG EINES METHYLCYCLOHEXEN-PHOSPHONATS	45
3.2.1.1. DARSTELLUNG DES TRIFLATS	46
3.2.1.2. SYNTHESSE DES DIPHOSPHONATS	46
3.2.1.3. DARSTELLUNG DES CYCLOHEXENPHOSPHONATS	47
3.2.1.4. WAHL DER GEEIGNETEN SCHUTZGRUPPE	47
3.2.1.5. ENTSCHÜTZUNG DES BENZYLETHERS	49
3.2.1.6. DIE EINFÜHRUNG DES AZIDS	50
3.2.1.7. SYNTHESSE DES ACETAMIDS	51
3.2.1.8. SYNTHESSE DER SÄURE	52
3.2.1.9. ENTSCHÜTZUNG DES MONOESTERS	52
3.2.2. DARSTELLUNG VON 2,3- VERKNÜPFTEN PSEUDO-SIALOSIDEN	53
3.2.2.1. RETROSYNTHESE FÜR EIN 2,3- VERKNÜPFTES SIALOSID MIT ETHYLENSPACER	53
3.2.2.2. DARSTELLUNG DES GEMISCHTEN DIESTERS VIA MITSUNOBU-KUPPLUNG	54
3.2.2.3. ENTSCHÜTZUNG VON	54
3.2.2.4. VERSUCH ZUR DARSTELLUNG EINES 2,3- VERKNÜPFTEN SIALOSIDS VIA MITSUNOBU-KUPPLUNG	55
3.3. DARSTELLUNG VON EINFACHEN AGLYCONMIMETIKA	56
3.3.1. SYNTHESSE EINES 1,6- VERKNÜPFTEN MIMETIKUMS	56
3.3.2. SYNTHESSE EINES 2,3- VERKNÜPFTEN MIMETIKUMS MIT ETHYLENSPACER	57
3.4. SYNTHESSE VON LAKTOSE-BASIERTEN PSEUDO-SIALOSIDEN MIT DIETHYLENGLYCOLSPACERN	57
3.4.1. RETROSYNTHESE DES LAKTOSEBAUSTEINS FÜR EIN 1,6 -GLC-VERKNÜPFTES LAKTOSEANALOGON	58
3.4.1.1. SYNTHESSEVERSUCH ZUR DARSTELLUNG DES LAKTOSEBAUSTEINS FÜR EIN 1,6- GLC VERKNÜPFTES LAKTOSEANALOGON	59
3.4.2. ALTERNATIVE RETROSYNTHESE FÜR EINEN LAKTOSEBAUSTEIN	60
3.4.2.1. SYNTHESSE DES GESCHÜTZTEN LAKTOSEBAUSTEINS	60
3.4.2.2. SYNTHESSE DER LINKER	61
3.4.2.3. VERKNÜPFUNG DER LINKER MIT DEM LAKTOSEBAUSTEIN	62
3.4.2.4. ALTERNATIVE VERKNÜPFUNG VON LINKER UND LAKTOSEBAUSTEIN	63
3.4.3. DARSTELLUNG EINES LAKTOSEBAUSTEINS FÜR EIN 1,6- GAL- VERKNÜPFTES LAKTOSEANALOGON	64
3.4.3.1. RETROSYNTHESE FÜR DEN LAKTOSEBAUSTEIN	64
3.4.3.1.1. SYNTHESSE VON	65
3.4.3.2. VERSUCHE ZUR VERKNÜPFUNG DES LINKERS MIT DEM LAKTOSEBAUSTEIN	65
3.4.4. RETROSYNTHESE FÜR EIN EINFACHES LAKTOSEANALOGON	66
3.4.4.1. DARSTELLUNG VON	67
3.5. INHIBITIONSSTUDIEN	69

3.5.1. INHIBITIONSTEST MIT BAKTERIELLEN SIALIDASEN	69
3.5.2. VERGLEICH MIT BEKANNTEN INHIBITOREN	70
3.6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	72
4. EXPERIMENTAL PART	79
4.1. GENERAL METHODS	79
4.2. NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY	80
4.3. MASS SPECTROMETRY	81
4.4. FLUORESCENCE SPECTROPHOTOMETRY	81
4.5. EXPERIMENTS	82
4.6. SIALIDASE INHIBITION ASSAY	140
5. NMR-SPEKTREN	142
6. DIAGRAMME ZU DEN INHIBITIONSTESTS	170
7. LITERATURVERZEICHNIS	176
8. PUBLIKATIONEN	180

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolute
All	Allyl
Bn	Benzyl
Bz	Benzoyl
CHCA	Cyanohydroxy cinnamic acid
COSY	Correlation Spectroscopy
CSA	Camphor sulfonic acid
d	days
DCC	N, N-Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichloromethane
DHB	2,6 Dihydroxybenzoic acid
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
DMAP	4-Dimethylaminopyridine
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxide
EA	Ethyl acetate
Eq	Equivalents
ESI	Electrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
FAB	Fast Atom Bombardment
Gal	Galactose
Glc	Glucose
h	hour
HR-MS	High Resolution Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Experiment
Im	Imidazole
LG	Leaving Group
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MeOH	Methanol
MOM	Methoxymethyl
MPLC	Medium Performance Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Nos	4-Nitrobenzene sulfonyl

Ox	Oxidation
PG	Protecting Group
Ph	Phenyl
ppm	Parts Per Million
Pyr	Pyridine
quant.	quantitative
Rf	Retention factor
RP	Reverse Phase
RT	Room Temperature
sat.	saturated
TBAI	Tetrabutylammonium iodide
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TIPS	Triisopropylsilyl
Tf	Trifluoromethane sulfonate
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Thin Layer Chromatography
<i>p</i> TSA	<i>para</i> -Toluenesulfonic acid
Tol	Toluene
Tos	Tosylate

1. Einleitung

1.1. Die Sialidase- Familie

Sialidasen oder Neuraminidasen, wie sie auch genannt werden, sind Enzyme, die die Abspaltung der Sialinsäuren von Glycokonjugaten katalysieren.^[1, 2]

Sialidasen findet man bei allen Deuterostomiern, aber auch bei verschiedenen Viren und Mikroorganismen, obwohl diese selbst keine Sialinsäuren produzieren.^[3]

Man unterscheidet zwischen Exo- und Endosialidasen. Exosialidasen katalysieren die Abspaltung von terminalen Sialinsäuren, die an komplexe Kohlenhydratstrukturen gebunden sind. Endosialidasen dagegen katalysieren die Abspaltung von Sialinsäuren, die glycosidisch an Oligo- oder Polysialylketten gebunden sind.^[4]

Die meisten mikrobiellen Sialidasen gehören zu den Exosialidasen.

1.2. Die Sialidase-Reaktion

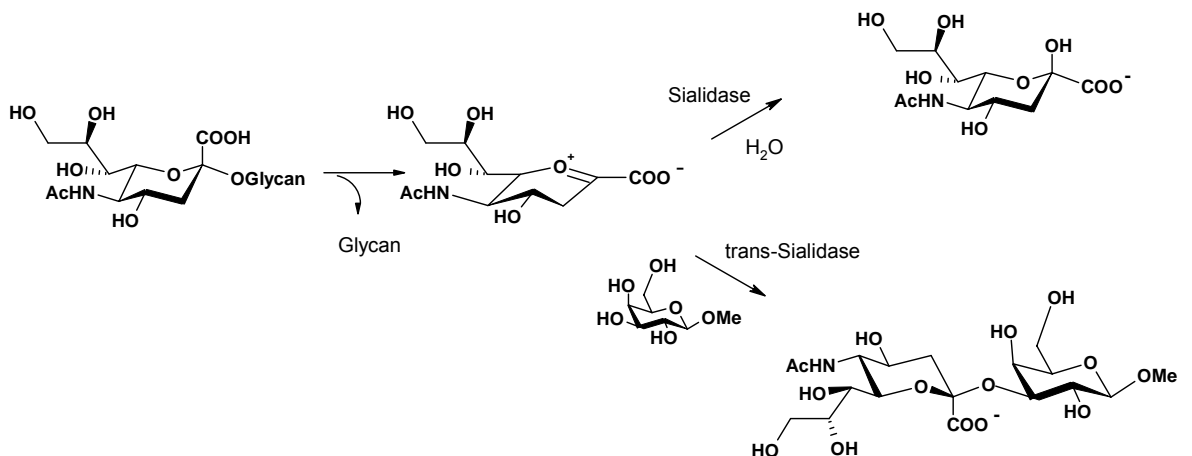


Abb. 1.2.: Mechanismus der Sialidase-Reaktion

Man nimmt an, dass die Abspaltung der glycosidischen Bindung zwischen Sialinsäure und Zucker vom Glycokonjugat über ein abgeflachtes Sialosylkation-Intermediat verläuft. Dieses wird im Falle der Sialidasen von Wasser abgefangen, und es entsteht die α -N-Acetylneuraminsäure.

Bei Trans-Sialidasen wird dieses Intermediat von einem Zucker abgefangen, und die Neuraminsäure wird so auf einen anderen Zucker übertragen.^[5]

1.3. Sialidasen und Krankheiten

Obwohl sie häufig im Zusammenhang mit Krankheiten^[6] genannt werden, stellen Sialidasen wichtige Enzyme im Zuckerstoffwechsel vieler Lebewesen dar. Gefährlich wird es erst, wenn diese Enzyme dazu beitragen, dass Mikroorganismen sich in ihren Wirten ausbreiten können.

Die Influenza-Infektion ist schon länger erforscht und ist wohl auch das bekannteste Beispiel für die Bedeutung von Sialidasen im Krankheitsprozess. Grippeviren dringen in die Wirtszelle ein, indem sie mit ihrem Hämagglutinin an die Sialinsäure der Wirtszelle andocken, und vermehren sich dort. Beim Austritt aus der Wirtszelle sind die neuen Erreger noch von der Sialinsäure des Wirts ummantelt. Hier kappt die Neuraminidase den Sialinsäuremantel, um ein Verklumpen der Viren mit dem Hämagglutinin zu verhindern. So kann sich das Virus weiter ausbreiten.^[7, 8]

1.4. Bakterielle Sialidasen

Bei vielen Krankheiten, die durch Bakterien verursacht werden, spielen Sialidasen eine entscheidende Rolle. Als Beispiele seien hier Wundbrand, Gastritis, Cholera oder Zystische Fibrose genannt.^[9]

Allerdings steht hier die Wissenschaft noch am Anfang. Bakterielle Sialidasen sind lange nicht so gut erforscht wie die Influenza- Sialidase. Bisher konnten nur wenige Röntgenstrukturen von bakteriellen Sialidasen erhalten werden. An einigen ausgewählten Bakterien werden im Folgenden die unterschiedlichen Funktionen der Sialidasen erläutert.

Clostridium perfringens:

Dieses Grampositive Bakterium ist der Erreger des Wundbrands. Hier wird der Befall des Wirtsgewebes erst durch das Kappen des Sialinsäuremantels durch die Sialidase ermöglicht. Das Bakterium kann dann leicht in das Gewebe eindringen und sich dort ausbreiten. Ein weiterer Effekt ist, dass durch die steigende Desialisierung das Wirtsgewebe seinen Schutzschild verliert und von anderen Enzymen wie Proteasen

oder Glykosidasen weiter abgebaut werden kann. So breitet sich der Wundbrand rasch aus.^[10]

Salmonella typhimurium:

Auch von dieser Sialidase konnte bereits eine Röntgenstruktur gewonnen werden. Dieses Bakterium verursacht die Gastroenteritis.

In diesem Falle wird die freigesetzte Sialinsäure vom Wirtsgewebe als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt.^[10]

Vibrio cholerae:

Die Sialidase von *V. cholerae* war eine der ersten Sialidasen, die man näher erforscht hat.

In diesem Fall wird durch die Desialisierung eines Gangliosids GD1a das Pentasaccharid GM1 demaskiert. Das GM1 wirkt als Erkennungsepitop für das eigentliche Cholera-toxin, welches daran bindet und so zum Ausbruch der Cholera führt.^[9]

Wie man an den drei Beispielen sehen kann, sind die Funktionen bakterieller Sialidasen sehr vielfältig und stellen damit ein interessantes Ziel für die Entwicklung neuer Wirkstoffe im Kampf gegen viele Krankheiten dar.

1.5. Trans-Sialidasen

Trans-Sialidasen stellen eine besondere Klasse der Sialidasen dar. Sie kombinieren die Eigenschaften von Sialidasen und Sialyltransferasen.

Diese Enzyme spalten die glycosidische Bindung zwischen der Sialinsäure und dem Glycokonjugat und übertragen die Sialinsäure auf einen anderen Zucker, wobei es sich meist um β -Galaktose als Akzeptor handelt. Im Unterschied zu den Sialyltransferasen ist hier die CMP-Sialinsäure nicht beteiligt.^[11, 12]

Trans-Sialidasen sind zwar seit den 80 er Jahren bekannt,^[13] allerdings ist es erst vor kurzem gelungen, Röntgenstrukturen von Trans- Sialidasen zu gewinnen.

In der vorliegenden Arbeit soll die Trans-Sialidase von *Trypanosoma Cruzi* (TcTS) näher betrachtet werden.

1.6. *Trypanosoma Cruzi* als Erreger der Chagas-Krankheit

Diese Erkrankung, die zu malariaähnlichen Fieberschüben führt, ist ein großes soziales Problem in Süd- und Mittelamerika, wobei es bis heute kein wirksames Medikament auf dem Markt gibt. Bis heute sind 20 Millionen Menschen infiziert.^[14]

T. Cruzi ist ein Einzeller, der zur Klasse der Flagellaten zählt. Diese Flagellaten leben als Parasiten und entwickeln sich über einen Wirtswechsel zwischen Insekt und Wirbeltier. Bei *T. Cruzi* ist die Raubwanze *Triatoma* der Überträger. Dieses Insekt überträgt durch einen Biß oder kleine Verletzungen in der Haut durch seine Fäzes die trypomastigote Form des Erregers in die Blutbahn des Wirts.^[15] Dort infiziert der Parasit weitere Zellen des Wirts. Um die Wirtszellen überhaupt befallen zu können, ist es notwendig, dass sich der Parasit vor dem Immunsystem des Wirts schützt. Dies gelingt, indem er die wirtseigenen Sialinsäuren auf seine Zelloberfläche überträgt. In den befallenen Wirtszellen entwickelt sich die sogenannte amastigote Form (geißellose Form). Die Wirtszelle stirbt ab und setzt diese Amastigoten frei, diese entwickeln sich entweder zu Trypomastigoten weiter und infizieren weitere Zellen oder werden durch einen erneuten Biß des Insekts auf das Insekt zurück übertragen. Dort entwickelt sich aus der amastigoten Form die epimastigote Form asexuell im Darm des Insektes weiter. Damit schliesst sich der Kreislauf. Die epimastigote Form wird dann erneut auf einen anderen Wirt übertragen, und der Zyklus beginnt von vorne.

Trypanosomen kommen überall in flüssigen Körpergeweben vor, insbesondere dem Blut, Lymphe, Knochenmark, Rückenmarksflüssigkeit und dem Gehirn.^[16]

T. cruzi exprimiert in seinen verschiedenen Stadien ein bestimmtes Enzym, die sogenannte Trans-Sialidase, welche die Übertragung der wirtseigenen Sialinsäuren auf den Parasiten katalysiert. Diese Trans-Sialidase kann nur im Blut des Wirts nachgewiesen werden, im Darm des Insekts ist keine Trans-Sialidase-Aktivität festzustellen. Die TcTS ist ein GPI-verankertes Enzym auf der Plasmamembran des

Parasiten.^[17] *T. cruzi* selbst kann *de novo* keine Sialinsäure herstellen und ist daher auf fremde Sialinsäuren angewiesen. Sobald der Wirt befallen wird, wird auf der Oberfläche der Trypanosomen die TcTS exprimiert, und die Übertragung der Sialinsäuren auf die parasitischen Glycokonjugate beginnt. Damit ist der Parasit effektiv vor dem Immunsystem des Wirts geschützt und kann sich weiter im Wirt vermehren. Der TcTS kommt somit eine wichtige Rolle zu. Würde man diese Reaktion unterbinden, wäre ein Ausbreiten der Krankheit nicht möglich. Daher stellt die TcTS eine interessante Schlüsselposition für ein potentielles Medikament dar.

1.6.1. Struktur der TcTS

Buschiazzo et al. haben 2002 die Röntgenstruktur der Trypanosoma cruzi Trans-Sialidase aufgeklärt.^[17] Das Enzym hat viele Gemeinsamkeiten mit anderen bakteriellen und viralen Sialidasen.

- Die Arginin-Triade, die die Carboxylatgruppe der Sialinsäure bindet
- Glu 357, welches Arg 35 der Triade stabilisiert
- Asp 59, welches für die Katalyse notwendig ist
- Tyr 342 und Glu 230, die am Boden des aktiven Zentrums den Übergangszustand stabilisieren
- Die hydrophobe Tasche, welche die *N*-Acetyl-Gruppe der Sialinsäure bindet.^[17]

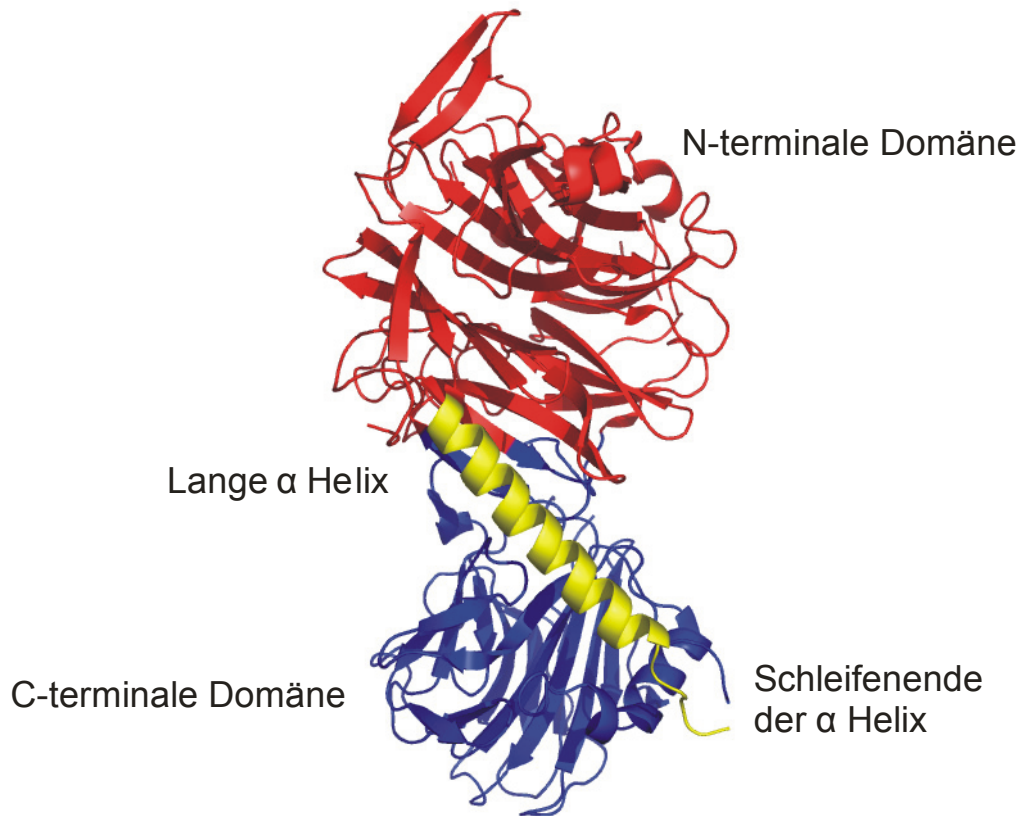


Abb. 1.6.1.: Trans-Sialidase von *T. cruzi*
PDB-Code: 1MS4

Die TcTS setzt sich aus zwei Domänen zusammen. Die N-terminale katalytische Domäne besteht aus sechs β -Propellerflügeln. Dieser Teil ist bei allen mikrobiellen Sialidasen gleich. Die Propellerflügel sind über eine lange α -Helix mit der C-terminalen lektinähnlichen Domäne verbunden. Das Protein endet mit einer α -Helix Schleife, die sich in Richtung C-Terminus windet. Dieser Helix folgt eine hydrophile Region von variabler Länge, welche als das SAPA-Antigen identifiziert wurde.

Die lektinähnliche Domäne ist der katalytischen Domäne wie der Sialidase von *V. cholerae* sehr ähnlich. Allerdings ist das hydrophobe Interface zwischen der lektinähnlichen Domäne und den β -Propellerflügeln mit 2550 Å deutlich größer, als man es von anderen Sialidasen kennt (1300-1600 Å). Dieses deutet auf einen starren Proteinkern hin, der eine Beteiligung der C-terminalen Domäne an der Trans-Sialidasereaktion ausschliesst.^[17]

1.6.2. Besonderheiten im katalytischen Zentrum

Es gibt einige Abweichungen in den Aminosäuren, die wohl für die Einzigartigkeit der TcTS verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang wären als erstes zwei aromatische Reste (Tyr 119, Tyr 248) zu nennen. Zusammen mit Trp 312 wird hier eine hydrophobe Umgebung geschaffen, die wahrscheinlich nur dazu dient, Wasser vom Reaktionszentrum fernzuhalten und eine Transglykosilierung zu begünstigen.^[17] Ein weiterer Unterschied zu anderen Sialidasen ist Pro 283; diese Aminosäure erlaubt Trp 312 näher ans katalytische Zentrum zu rücken. Damit wird die Struktur entscheidend beeinflusst. Die Aminosäure Asp 96 befindet sich an einer etwas anderen Position und beeinflusst dadurch die Orientierung der Carboxylatgruppe, was sich wieder auf die Position der Sialinsäure im katalytischen Zentrum auswirkt. Neben dieser Sialinsäure-bindenden Seite im aktiven Zentrum verfügt die Trans-Sialidase noch über eine Galaktose-bindende Seite. Diese ist bisher nicht bei anderen Sialidasen nachgewiesen worden und entsteht erst durch die eigentliche Substratbindung.^[18-21]

1.6.3. Komplexe mit DANA

Um die Substratbindungsstelle besser zu verstehen, wurden Kristalle der TcTS mit verschiedenen Liganden gebunden. Im Komplex mit DANA (2-Desoxy-2,3-didehydro-*N*-acetylneuraminsäure) ergaben sich folgende Beobachtungen:

Die Aminosäureseitenkette des Tyr 119 am Grunde des katalytischen Zentrums besetzt die Stelle, die normalerweise von der Sialinsäure eingenommen wird. Im Komplex mit DANA kann man eine Konformationsänderung beobachten. Man kann sehen, dass die Seitenkette des Tyr 119 sich in Richtung hydrophobe Tasche verschiebt und dort Wasserstoffbrückenbindungen mit der Glycerolseitenkette des Liganden eingeht.

Durch diese Verschiebung der Seitenkette wird der Zuckerring der Sialinsäure verzerrt, so dass sich durch diese Rotation der Abstand aller funktionellen Gruppen im katalytischen Zentrum ändert. Dadurch kann die Glycerolseitenkette starke Wasserstoffbrückenbindungen zu Asp 96 eingehen.^[17]

Allerdings hat man noch eine weitere Konformation in der monoklinen Form der Kristalle gefunden. Hier hat sich die Seitenkette des Tyr 119 komplett aus dem aktiven Zentrum herausgedreht und geht keinerlei Bindungen mit dem Liganden ein. Von Tyr 342 am Boden der Substrattasche kann man in Gegenwart eines Inhibitors zwei Konformationen erkennen. Zum einen wurde eine Wasserstoffbrückenbindung zu Arg 314 gefunden; diese Konformation ist inkompatibel mit dem Substrat DANA. Zum andern gibt es eine passende Konformation zum Substrat, was das aktive Zentrum für das Substrat zugänglich macht. Damit liegt die Vermutung nahe, dass Tyr wie ein Schalter zwischen der aktiven und inaktiven Form des Enzyms wirkt.^[22]

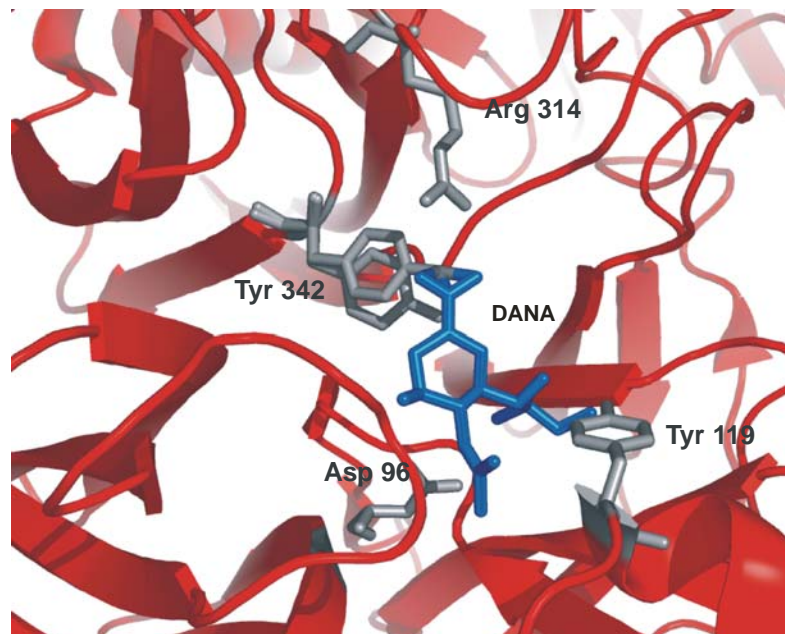


Abb. 1.6.3.: Komplex mit DANA
PDB-Code: 1MS8

1.6.4. Komplexe mit Laktose als Substrat

Experimente mit Laktose als Substrat und DANA als Inhibitor haben gezeigt, dass beide am Enzym zu einem sogenannten ternären Komplex binden. Dies legt die Vermutung nahe, dass Laktose als Sialinsäure-Akzeptor wirkt. Die 3-OH- Gruppe der Galaktose-Einheit ist dann in einer günstigen Position, um nukleophil das anomere C-Atom des Sialosylkations anzugreifen. Des weiteren geht die Seitenkette Tyr 119 aus der DANA Bindungstasche eine neue Bindung zum Substrat Laktose ein und macht somit Platz im katalytischen Zentrum für den Donor (diese Beobachtung deckt sich

mit der zweiten Konformation von Tyr 119, welche man im Komplex mit DANA gefunden hat). Außerdem wird die externe Position des Tyr 119 stabilisiert. Man kann daran sehen, dass Tyr 119 einen bedeutende Verbindung zur Sialinsäure herstellt und damit auch die Affinität zum Substrat Laktose erhöht.^[17]

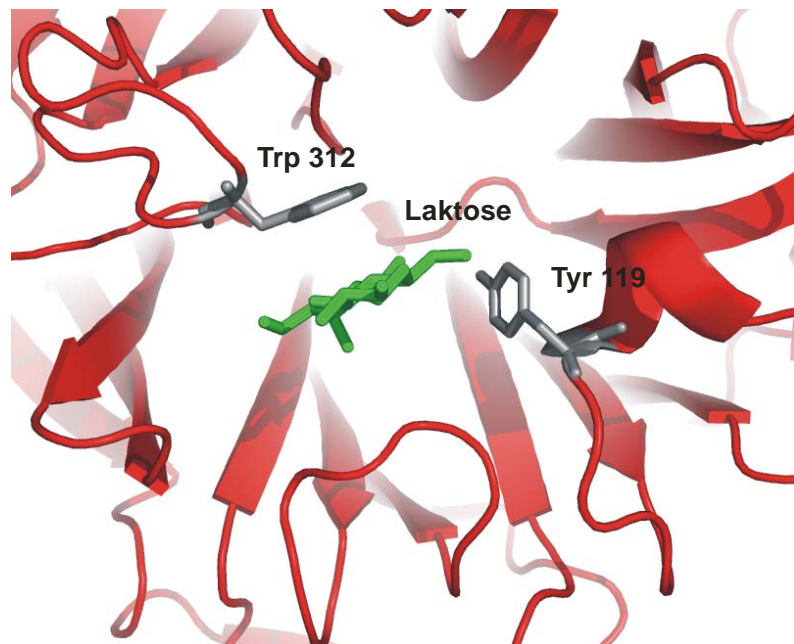


Abb. 1.6.4.1.: Komplex mit Laktose
PDB-Code: 1MS9

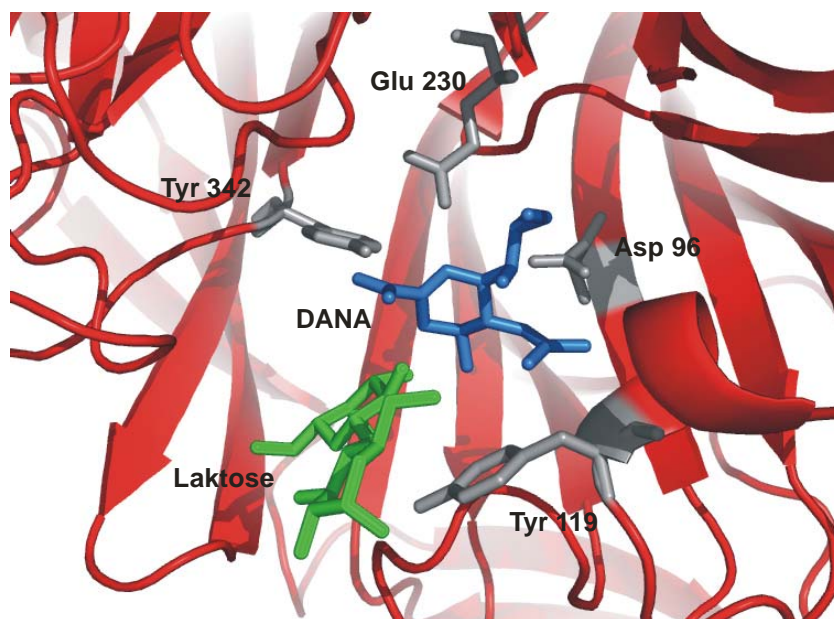


Abb. 1.6.4.2.: Komplex mit DANA und Laktose
PDB-Code: 1MS0

1.6.5. Mechanismus der Trans-Sialidase-Reaktion

Aus diesen Erkenntnissen wurden zwei generelle Mechanismen für TcTS entwickelt, wobei es bis heute keine gesicherten Erkenntnisse gibt, welcher Mechanismus der wahrscheinlichere ist.

Watts et al. geht davon aus, dass es sich um einen Ping-Pong-Mechanismus mit einem langen Reaktionsintermediat und einem doppelten Substitutionsmechanismus handeln könnte.^[19]

Watts et al. konnte zeigen, dass die Trans-Sialidase-Reaktion von TcTS über ein für viele Glycosidasen ähnlichen Mechanismus verläuft. In ihren Untersuchungen konnte Tyr 342 als das katalytische Nukleophil identifiziert werden.

Zuerst greift Tyr 342 nukleophil das anomere Kohlenstoffatom der Sialinsäure an C2 an. Diese geht so in die 2C_5 Konformation, welche typisch für ein kovalentes Intermediat ist, über. Dieser Angriff wird durch Glu 230 als basischer Katalysator begünstigt. Die Carboxylatgruppe des Glu 230 greift an der OH-Gruppe des Phenols nukleophil an und stabilisiert so den ionischen Charakter des phenolischen Sauerstoffs des Tyr 342 während des Übergangszustandes. Der terminale Zucker kann so von der Sialinsäure abgespalten werden. Im zweiten Schritt erfolgt der Transfer der Sialinsäure auf den Akzeptor Laktose, indem der umgekehrte Prozess stattfindet. Hierbei greift die 3-OH-Gruppe der Laktose nukleophil das anomere Zentrum an C2 an und der sialylierte Zucker wird freigesetzt.^[22, 23]

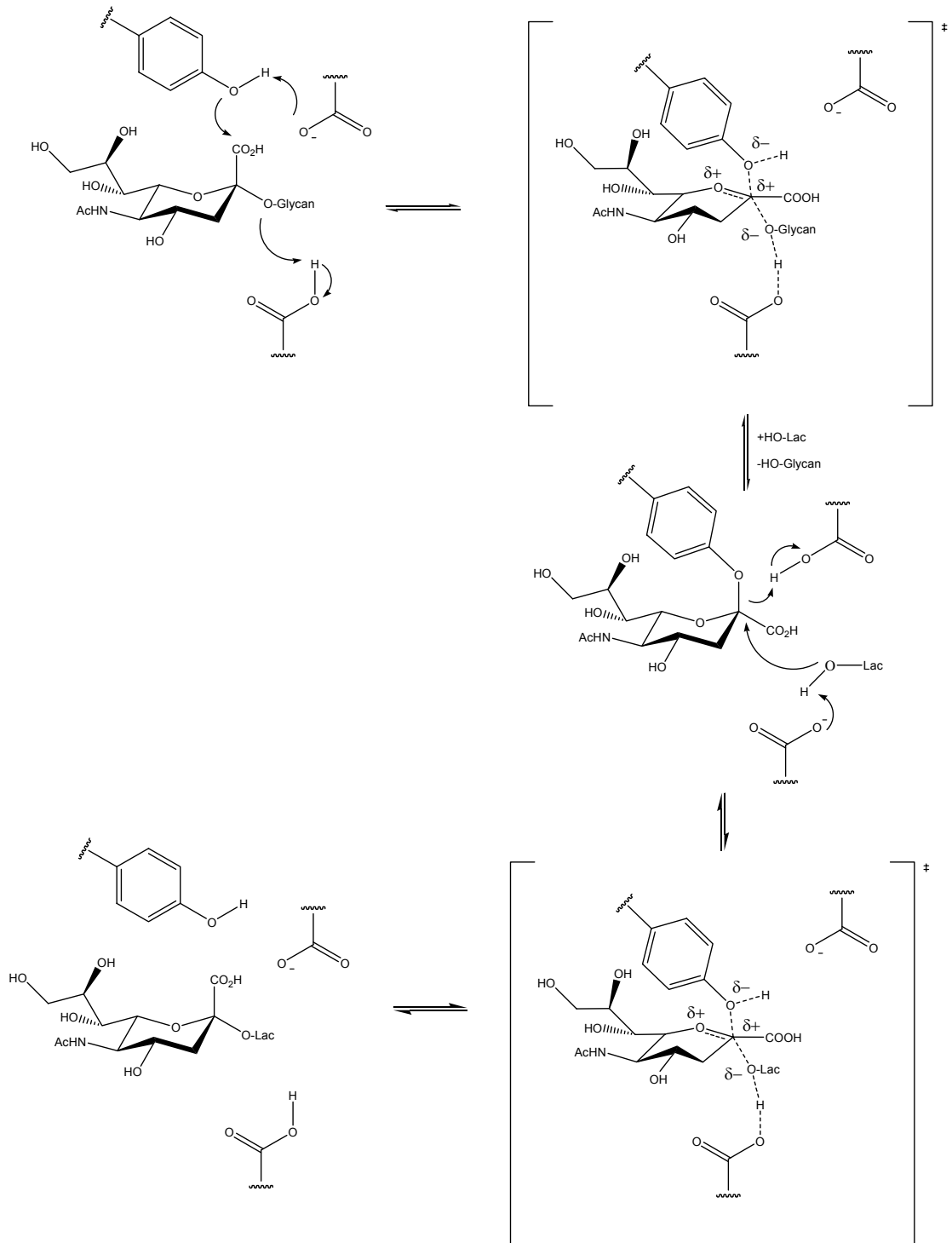


Abb. 1.6.5.1.: Postulierter Mechanismus von *Watts et al.*

Daneben wird die Bildung eines Ternärer-Komplexbildungsmechanismus mit zwei Bindungstaschen für Donor und Akzeptor diskutiert.^[17, 20, 22]

Zunächst liegt das freie Enzym vor, welches nicht in der Lage ist, an Laktose zu binden. Bindet der Donor an das katalytische Zentrum, wird der Zucker in der Bindungstasche fixiert, indem das Carboxylat an die Arg Triade gebunden wird und

die *N*-Acetylgruppe mit Asp 96 bindet. Damit ist das C2 am anomeren Zentrum in der Lage, sich zum katalytischen Nukleophil Tyr 342 zu bewegen. Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung. Diese ²C₅ Konformation ist typisch für ein kovalentes Intermediat. Der nukleophile Angriff von Tyr 342 wird dadurch begünstigt, dass Glu 230 als basischer Katalysator wirkt und die H-Brückenbindung schwächt. Glu 230 geht stattdessen eine neue Bindung zu einem Wassermolekül ein. Durch die Bindung des Donors kommt es zu einer weiteren Änderung. Tyr 119 besetzt jetzt nicht mehr diese Bindungsstelle und wird aus der Tasche gedreht. Als Folge dessen wird die Bindung zur Laktose möglich, was wiederum die externe Position des Tyr 119 stabilisiert. Die 3-OH- Gruppe der Galaktose-Einheit ist dann in einer günstigen Position, um nukleophil das anomere C-Atom des Sialosylkations anzugreifen. Damit ist die Übertragung der Sialinsäure abgeschlossen, und der sialylierte Zucker wird freigesetzt. Das Enzym geht dabei wieder in den inaktiven Zustand über.

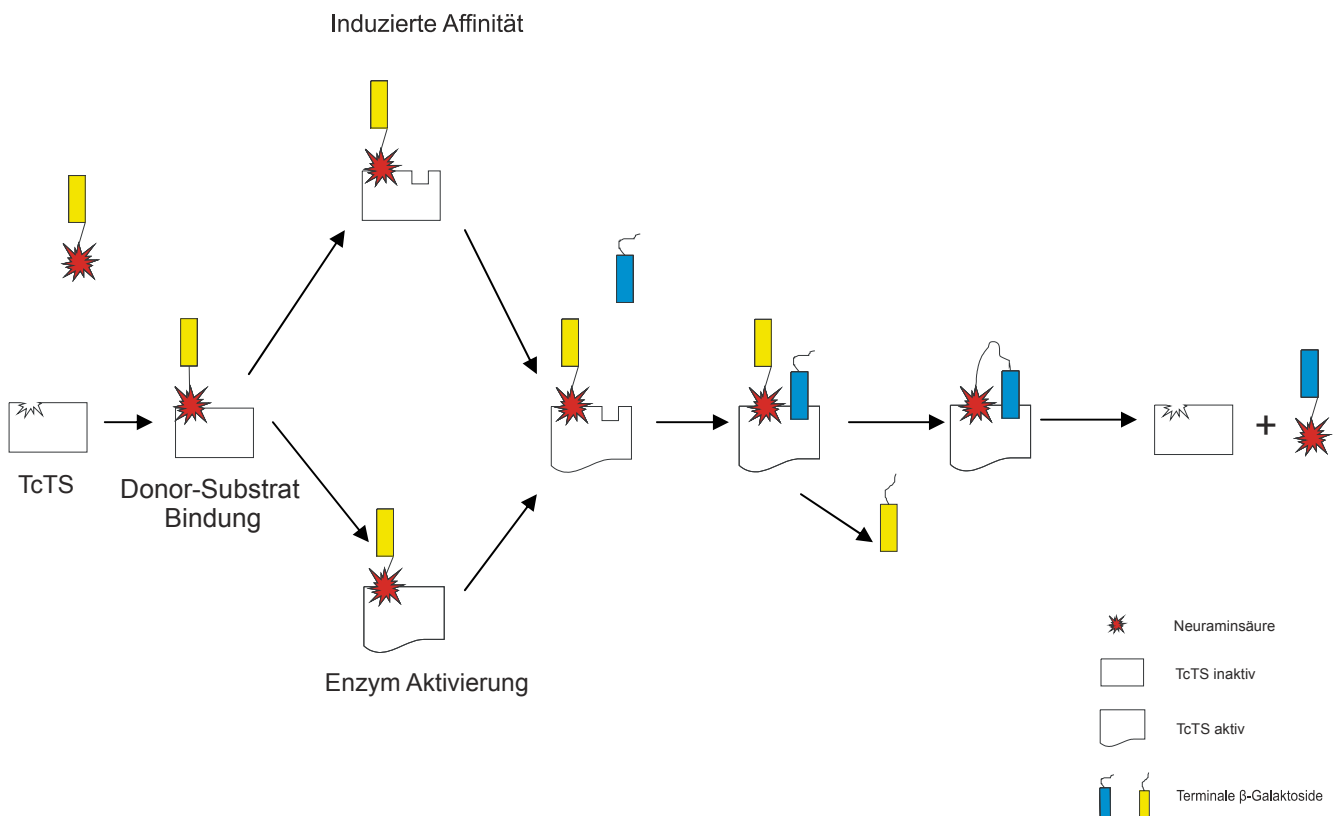


Abb. 1.6.5.2.: Postulierter Mechanismus nach *Buschiazzo et al.*

Um weitere Erkenntnisse über den Mechanismus zu gewinnen, ist es notwendig, neue Inhibitoren zu synthetisieren. Bekannte Inhibitoren wie DANA zeigen bei TcTS

nur schlechte Inhibitionsergebnisse. Bisher gibt es nur Experimente mit natürlich vorkommenden Substraten wie z.B. Lacitol als Sialinsäure-Akzeptoren wie von *Agusti et al.* kürzlich publiziert.^[18]

Mit dieser Arbeit sollen neuartige Inhibitoren synthetisiert werden, die für bakterielle Sialidasen und besonders für Trans-Sialidasen geeignet sind.

2. Themenstellung

2.1. Cyclohexenderivate als Neuraminidase-Hemmer

Da die Erforschung der bakteriellen Sialidasen erst am Anfang steht, gibt es bis heute nicht sehr viele Arbeiten auf diesem Gebiet.^[24] Im Gegensatz dazu wurden in den letzten 10 Jahren viele Neuraminsäurederivate synthetisiert, um als potentielle Inhibitoren für Influenza wirken zu können.^[25, 26]

Mit der Gewinnung der Röntgenstruktur von Influenza-Sialidase wurde DANA zur Leitstruktur für neue Anti-Influenza Medikamente.^[27, 28] Da DANA virale Sialidasen im μM -Bereich hemmt, wurden weitere Sialidase-Hemmer als Übergangszustandsanaloga entwickelt.^[29-31]

Zanamivir ist ein bekanntes Beispiel für einen Neuraminidase-Hemmer auf der Basis eines Dihydropyran-Rings.^[32] Dieser Sialidase-Hemmer ist seit den 90er Jahren unter dem Namen Relenza™ auf dem Markt. Zahlreiche Arbeiten auf diesem Gebiet zeigen das grosse Interesse an der Optimierung dieser Leitstruktur.^[33-39]

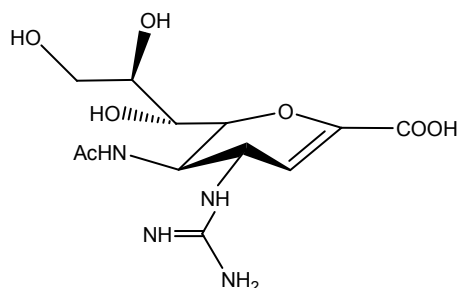


Abb. 2.1.1.: Struktur von Zanamivir

Die Synthese von Phospha- oder Thioanaloga, wie in den Arbeiten von *Vasella et al.*^[40-42] und *Brossmer, Mack*^[43] beschrieben, zeigen zwar gute IC_{50} -Werte im mikromolaren Bereich, haben jedoch einen grossen Nachteil: Die Bioverfügbarkeit ist sehr gering.

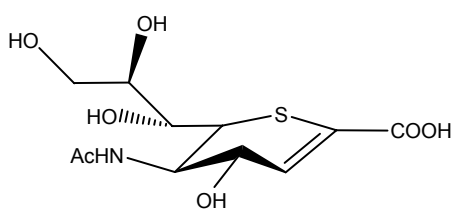


Abb. 2.1.2.: 6-Thio-Neu5Ac2en

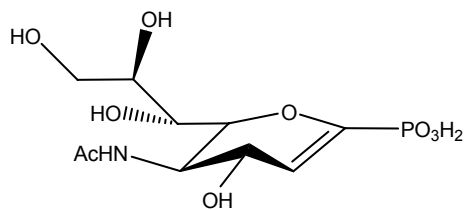


Abb. 2.1.3.: 1-Phospha-Neu5Ac2en

1997 wurde von *Kim et al.*^[44, 45] eine neue Klasse von Übergangzustandsanaloga entwickelt. Hier wurde als Basis ein Cyclohexenderivat verwendet, da man davon ausging, dass ein Carbocyclus chemisch stabiler ist und sich leichter modifizieren lässt.

Ausgehend von China- und Shikimisäure wurden Regioisomere synthetisiert und weiterentwickelt. Ein Derivat, das Oseltamivir (GS4071), zeigte dabei IC₅₀ Werte im nanomolaren Bereich und ist inzwischen als Prodrug-Form (GS4104) unter dem Markennamen Tamiflu™ auf dem Markt erhältlich.

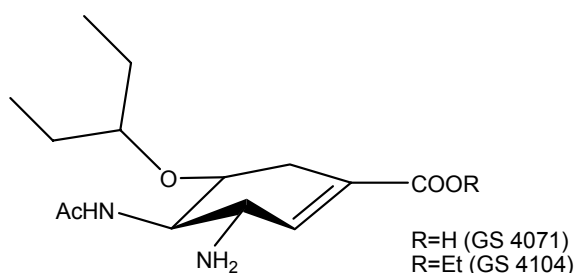


Abb. 2.1.4.: Struktur von GS4071/4104

2.2. Cyclohexenphosphonate als neue Übergangzustandsanaloga

In der Arbeitsgruppe Streicher wurde in den letzten fünf Jahren eine neue Klasse von möglichen Sialidase-Inhibitoren entwickelt. Hierbei wurden ausgehend von D- und L-Xylose Cyclohexenphosphonate synthetisiert, die als Analoga von GS 4104 mit einer Phosphat-Gruppe anstelle des Carboxylats aufgefasst werden können.

Dabei entspricht die Halbsessel-Konformation dem Sialosyl-Kation Neu5Ac2en. Die Phosphorsäuremonoester sind unter physiologischen Bedingungen negativ geladen. Es ist bekannt, dass die negative Ladung eine wichtige Rolle bei der molekularen Erkennung spielt.

Gleichzeitig kann man an dieser Stelle leicht Spacer oder andere Aglycone einführen. Des Weiteren kann das Cyclohexenderivat chemisch leicht modifiziert werden, z.B. mit Seitenketten oder verschiedenen Amidgruppen.

Je nachdem, welchen Zucker man als Startmaterial wählt, erhält man Regioisomere, die die Doppelbindung entweder in Neu5Ac2en oder in GS4104-Orientierung haben.

Damit wurde es ermöglicht, enantiomere Cyclohexenphosphonate herzustellen, die für eine Vielzahl von bakteriellen Sialidasen als mögliche Inhibitoren dienen können.^[46-49]

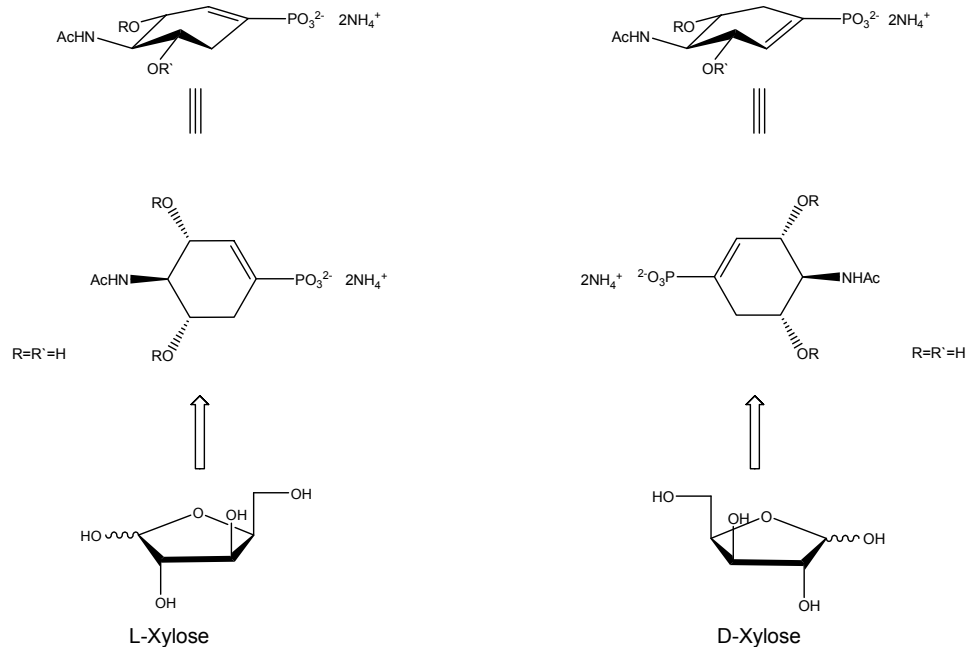


Abb. 2.2.1.: Übersicht der Cyclohexenphosphonate

Erste Tests an verschiedenen mikrobiellen Sialidasen wie z.B. *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* etc. zeigten moderate Inhibitionswerte.^[47]

Ausgehend von diesen positiven Ergebnissen wurden erste Tests an TcTs durchgeführt. Dabei zeigten die Monoethylester Inhibitionskonstanten, die besser als der Referenzinhibitor DANA waren.^[50] Daher sollen weitere Inhibitoren synthetisiert und das Konzept auf pseudo-Disaccharide erweitert werden.

2.3. Konzept für Inhibitor-Design und Leitstrukturen

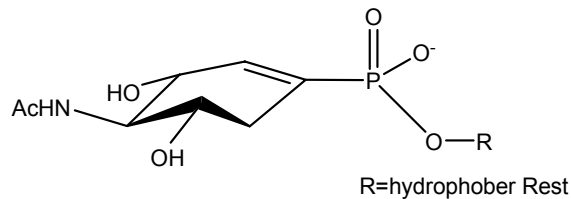
Galaktose wirkt im TsTc-Mechanismus als Akzeptor, daher sollen Cyclohexenphosphonate mit verschiedenen Sacchariden wie Galaktose oder Laktose verknüpft werden.

Diese pseudo-Disaccharide sollten eine deutlich bessere Inhibitionswirkung zeigen.

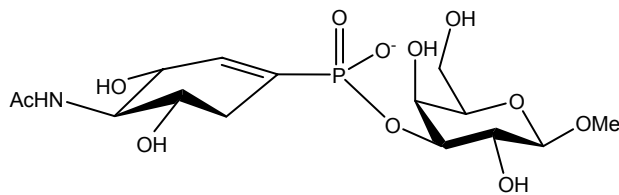
Der Weg zu pseudo-Disacchariden soll über gemischte Diester führen. Dafür sind sowohl Benzyl- als auch Methylester geeignet.

Da Sialinsäure in der Natur entweder 2,6- oder 2,3- mit den entsprechenden Zucker verknüpft ist, sollen diese Bindungen entsprechend geknüpft werden. Folgende Inhibitoren sollen synthetisiert werden:

- Pseudo- Sialoside mit hydrophoben Aglyconmimetika



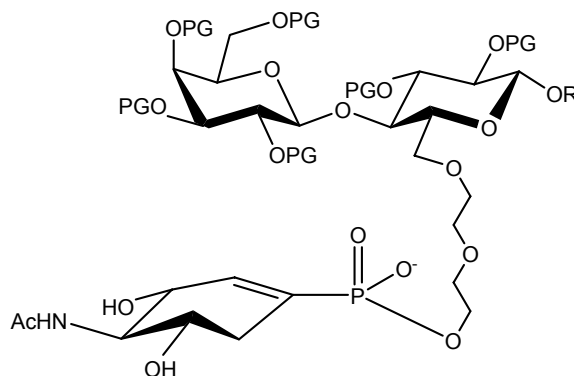
- Pseudo- Sialoside mit Akzeptor-Substratanaloga



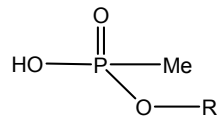
- Pseudo- Sialoside mit Diethylenglycolspacern

Laktosederivate mit Ethylenglycolspacern an verschiedenen Positionen sollen synthetisiert werden und auf den Cyclohexenphosphonatmonoester übertragen werden.

Unter Berücksichtigung der Röntgenstrukturanalyse des Enzyms sollten sich diese Derivate in die Bindungstasche der Sialidase einfügen.



- Für die Verknüpfung von Monoester und Zuckerbaustein stehen verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl, die ausprobiert werden sollen.
- Um in den biologischen Tests die Notwendigkeit des Monoesters für die Inhibition zu beweisen, sollen für alle Pseudo- Sialoside einfache Mimetika mit Methanphosphonsäure synthetisiert werden.



R= Galaktose, Laktose

3. Synthese von Pseudo-Sialosiden

Die Darstellung der Pseudo-Sialoside über gemischte Diester erfolgt aus zwei Bausteinen. Es muss ein Cyclohexenphosphonatmonoester synthetisiert werden, welcher dann mit einem entsprechenden Zucker oder hydrophoben Aclycon verknüpft werden kann. Zuerst wurde der Cyclohexenphosphonatbenzylester ausgewählt, da Benzylgruppen gut unter UV-Licht sichtbar sind und sich außerdem gut mit Mostain anfärben lassen. Damit wurde das Problem der Detektierbarkeit, wie es bei den Ethylestern gegeben war, umgangen.

3.1. Darstellung der Pseudo-Sialoside über die Benzylester-Strategie

3.1.1. Retrosynthese zur Darstellung des Cyclohexenphosphonatmonobenzylesters

Ausgehend von bekannten Vorstufen sollte aus L-Xylose erst das Triflat über sieben Stufen synthetisiert werden.

Für die Einführung des Phosphonats stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, die getestet werden sollten. Nach der anomeren Entschützung würde eine Horner-Wadsworth-Emmons-artige Zyklisierung zum Cyclohexenphosphonat folgen. Abschließend sollte die Einführung des Acetamids und die selektive Abspaltung eines Benzylesters zum Monoester möglich sein.

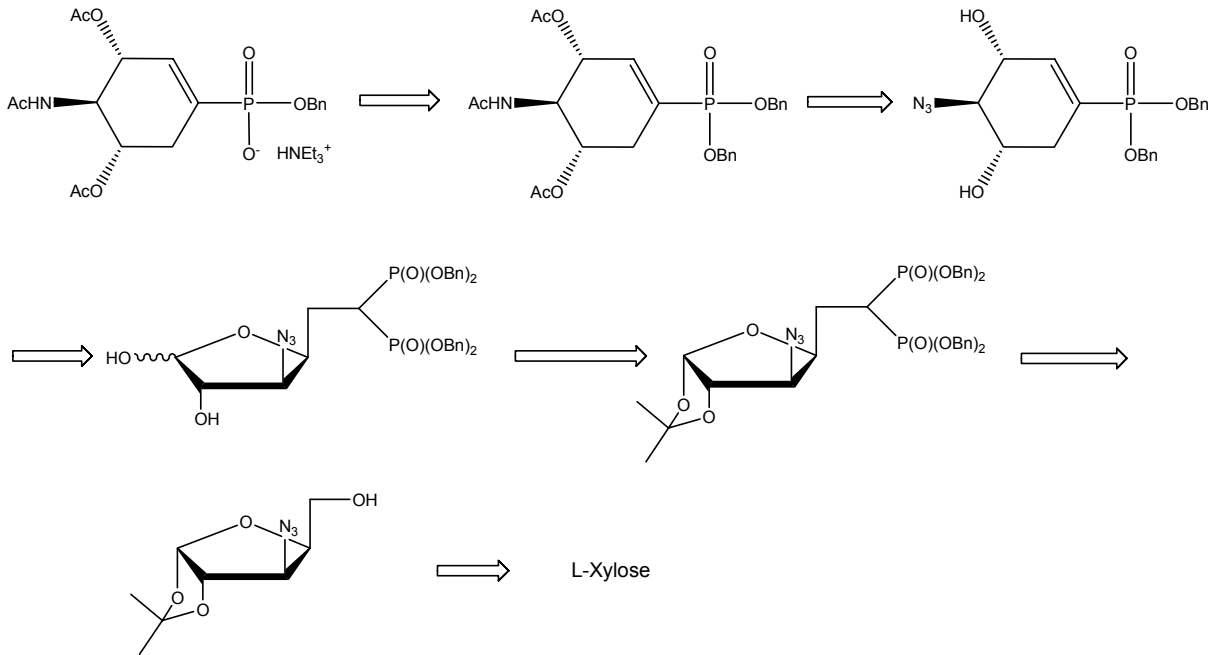


Abb. 3.1.1.: Retrosynthese des Cyclohexenphosphonatmonobenzylesters

3.1.1.1. Darstellung des Alkohols 8

Die Darstellung erfolgte nach einer Vorschrift von *Streicher et al.*^[46] Ausgehend von L-Xylose 1 wurde der Zucker zunächst anomer als Isopropylidenacetal geschützt. Die 1,2-*O*-Isopropyliden-L-Xylofuranose 2 wurde dann selektiv an der primären Alkoholfunktion mit TBDMS-Cl silyliert. 5-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-L-Xylofuranose 3 wurde in einer Swern-Oxidation in das Keton 4 überführt. Es folgte die stereoselektive Reduktion mittels NaBH₄ zur L-Ribofuranose 5. Diese sekundäre Alkoholfunktion wurde in eine bessere Abgangsgruppe, das Triflat 6 überführt. Das 3-*O*-Triflat konnte dann in einer nukleophilen Substitution mit Natriumazid in das gewünschte Isomer 7 überführt werden. Anschließende Spaltung des Silylethers mit TBAF führte zum Alkohol 8.

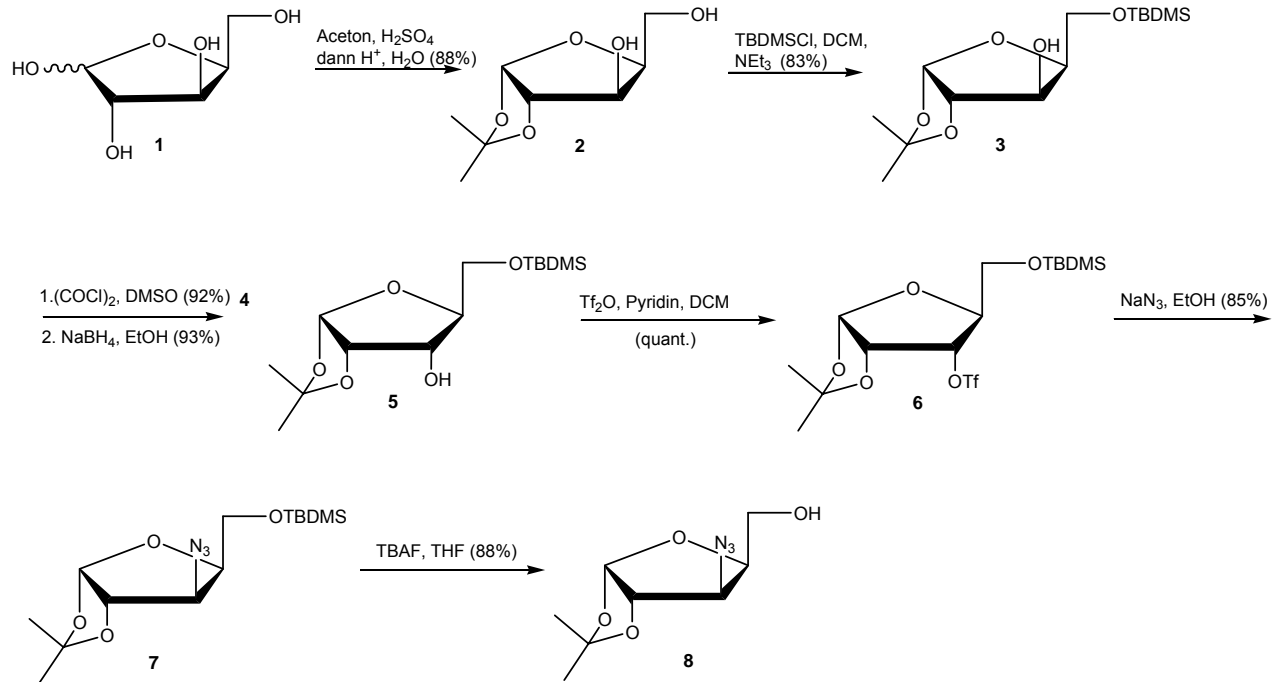


Abb. 3.1.1.1.: Synthese des Alkohols 8

3.1.1.2. Darstellung des Diphosphonats 12

Die Herstellung von Diphosphonaten ist in der Literatur mit verschiedenen Möglichkeiten beschrieben.

Als erste Methode wurde die von *Gil et al.* gewählt.^[51] Hierbei wird über eine Alkylierung von Tetrabenzylmethyldiphosphonat mit einem Bromid das gewünschte Produkt gewonnen.

Dazu wurde der Alkohol 8 in das Triflat 9 überführt. Dieses konnte dann mit Natriumbromid in guter Ausbeute zum Bromid 10 umgesetzt werden.

Die Umsetzung mit dem Tetrabenzylmethyldiphosphonatanion 11 lieferte jedoch keinen Hinweis auf das gewünschte Produkt. Selbst die Variation der Reaktionsbedingungen wie Temperatur, Lösungsmittel usw. zeigte keine Umsetzung zum gewünschten Produkt an.

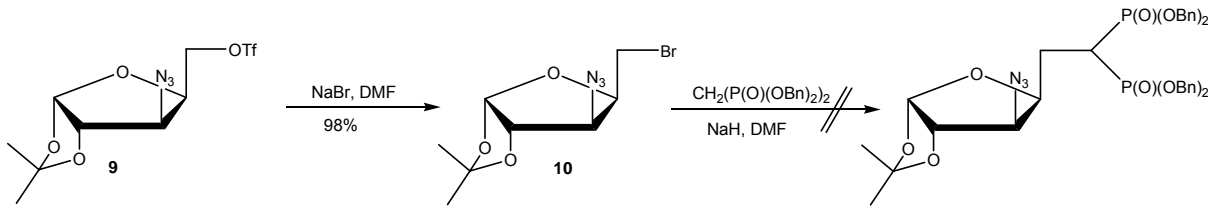


Abb. 3.1.1.2.1.: Syntheseversuch nach Gil et al.

Unter Annahme, dass das Bromid einfach nicht reaktiv genug ist, wurde die Alkylierung direkt mit dem Triflat versucht. Erste Reaktionen mit NaH als Base und DMF als Lösungsmittel zeigten keinen Umsatz an.

Es wurden dann verschiedene Basen wie z.B. Lithiumbistrimethylsilylamid, NaH etc. eingesetzt, aber auch das führte zu keiner Verbesserung.

Erst der Einsatz eines Kronenethers, wie bei Fleet et al.^[52] beschrieben führte zum gewünschten Produkt. Hierbei wurde das Triflat **9** mit 1.6 eq des Tetrabenzylmethylenanions in absolutem DMF und katalytischen Mengen 15-Krone-5 in 4 h zum Diphosphonat **12** umgesetzt. Leider liegt bei dieser Reaktion die Ausbeute im Bereich von 18-25 %. Versuche, die Ausbeute zu steigern, blieben erfolglos. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass es zu einem Angriff am Azid kommt und so Produktgemische entstehen.

Unter anderem fand man etwas Hydrolyseprodukt und das Dimer, welches sich durch teilweise Hydrolyse aus zwei Triflaten bilden kann. Weitere Produkte wurden nicht genauer analysiert.

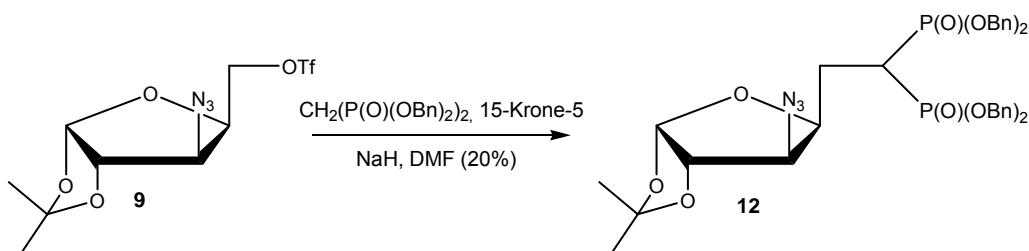


Abb. 3.1.1.2.2.: Synthese nach Fleet et al.

Die Alkylierung wurde ebenfalls mit dem Bromid **10** und Kronenether unter Bedingungen wie bei Fleet et al. beschrieben wiederholt, was jedoch zu keinem Umsatz führte.

Eine weitere Möglichkeit, Diphosphonate herzustellen, wird über eine zweistufige Synthese bei *Berkowitz et al.*^[53] beschrieben. Hier wird im ersten Schritt ein Triflat mit Dibenzylmethylphosphonat umgesetzt. Im zweiten Schritt erfolgt die Alkylierung mit Dibenzylphosphorchlorid zum Diphosphonat.

Der Umsatz von Triflat **9** mit Dibenzylmethylphosphonatanion in DMPU als Lösungsmittel und *n*-BuLi als Base gelang zwar, allerdings nur mit 14 % Ausbeute. Daher wurde der zweite Schritt nicht mehr durchgeführt.

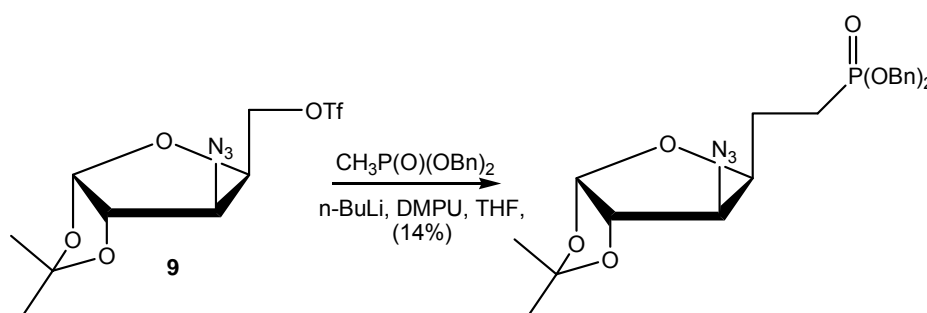


Abb. 3.1.1.2.3.: Syntheseversuch nach *Berkowitz et. al.*

Die Synthese zum Cyclohexenphosphonat wurde daraufhin mit der Reaktion nach *Fleet* durchgeführt, auch wenn dieser Schritt damit die ganze Synthese limitierte.

3.1.1.3. Entschützung des Diphosphonats **12**

Die Spaltung der Isopropylidengruppe mit Amberlite-IR-120 wie bei *Streicher et. al.*^[46, 47] beschrieben führte hier zu keinem Erfolg.

Es wurden daher verschiedene saure Bedingungen getestet. Die Abspaltung in 90 %iger TFA zeigte selbst nach 24 h keinen Umsatz.

Die Abspaltung in 50 % Dioxan mit 5 eq *p*-TsOH unter Rückfluss führte nach einer Reaktionsdauer von 3 Tagen immerhin zu 22 % des gewünschten Produkts.

Das ist für eine Entschützung keine befriedigende Ausbeute, daher wurde der Baustein **12** in einer 5 %igen Lösung von Schwefelsäure in Dioxan bei 80°C gerührt. Nach 1 h war der Umsatz vollständig.

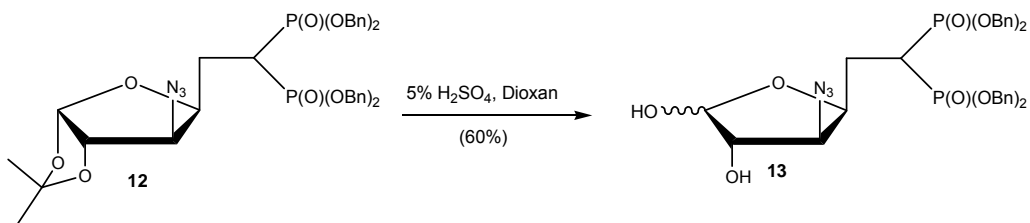


Abb. 3.1.1.3.: Entschützung von Baustein 12

3.1.1.4. Zyklisierung zum Cyclohexenphosphonat 14

Das Hemiacetal 13 wurde unter basischen Bedingungen in einer Horner-Wadsworth-Emmons-artigen Reaktion zum Dibenzylphosphonat 14 umgesetzt.

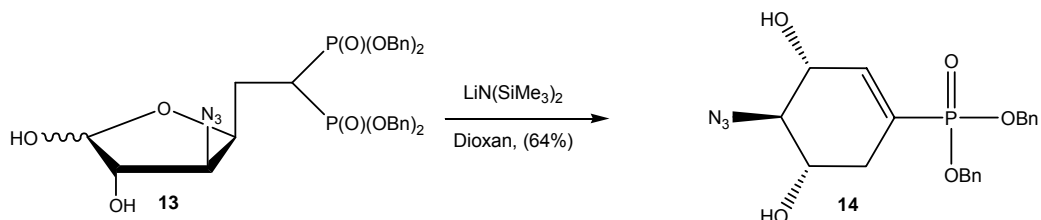


Abb. 3.1.1.4.1.: Zyklisierung zum Cyclohexenphosphonat

Hierbei wird durch die Lithiumbase an C6 deprotoniert, und das Carbanion greift die Carbonylgruppe nukleophil an. Dadurch entsteht ein sogenanntes Betain, welches sofort zu einem Oxaphosphetan weiter reagiert. Dieses zerfällt in das Olefin und Dibenzylhydrogenphosphat.^[54]

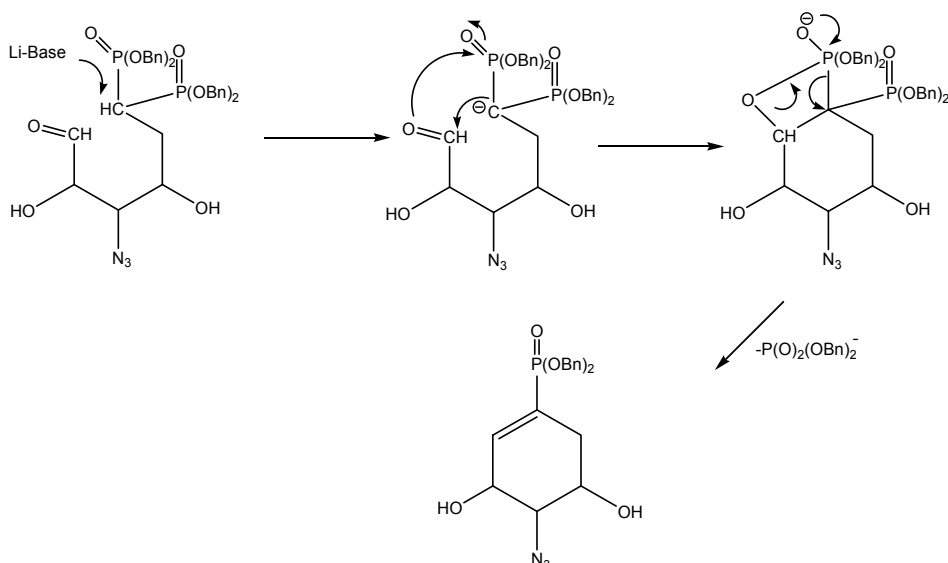


Abb. 3.1.1.4.2.: Mechanismus der Zyklisierung

3.1.1.5. Einführung des Acetamids 15

Die Reduktion des Azids mit Schwefelwasserstoff und anschließende Acetylierung unter Schotten-Baumann-Bedingungen, wie bei *Streicher et al.*^[46, 47] für die Ethylester beschrieben, führte hier zu einer Abspaltung der Benzylester. Damit war diese Methode nicht geeignet.

Eine andere Möglichkeit ist die Reduktion des Azids mit Trimethylphosphin und gleichzeitiger Acetylierung.^[55] Diese Eintopfreaktion lieferte das gewünschte Produkt **15** in guter Ausbeute von 65 %.

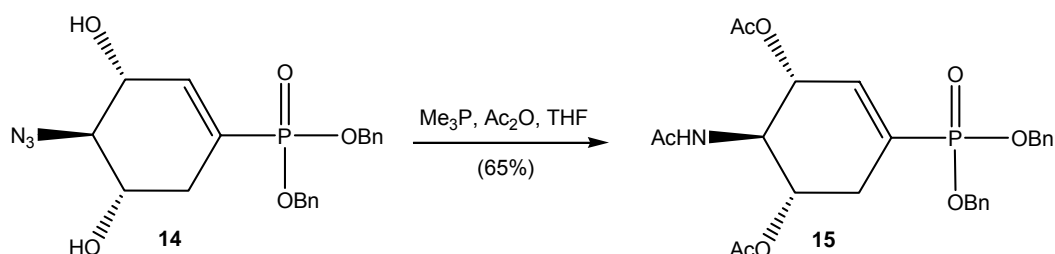


Abb. 3.1.1.5.1.: Synthese von **15**

In der Literatur findet man viele verschiedene Erklärungsversuche für phosphinvermittelte Reaktionen von Aziden mit Anhydriden und der Veresterung alkoholischer Gruppen unter Phosphin-Katalyse.^[56-58] Im folgenden wird ein möglicher Reaktionsweg in Anlehnung an *Aumüller* beschrieben.^[59] Das Azid **14** reagiert mit Trimethylphosphin zum Phosphatriazen, welches unter Bildung des Phosphinimins Stickstoff eliminiert. Das negativ geladene Stickstoffatom kann nun nukleophil am Carbonylkohlenstoff des Anhydrids angreifen. Es bildet sich eine Phosphoniumstruktur mit dem freigesetzten Carboxylat. Gleichzeitig reagiert das Trimethylphosphin mit dem Anhydrid zu einem Ionenpaar, welches ein reaktives Acylierungsmittel darstellt. Dieses acetyliert eine weitere Alkoholfunktion unter Freisetzung von Trimethylphosphin. Das Cyclohexenderivat kann nun selbst als Acylierungsmittel wirken und setzt sich mit weiteren OH-Gruppen unter Abspaltung von Trimethylphosphinoxid um. Das ist in der Darstellung mit der im letzten Schritt entstandenen Carbonsäure verdeutlicht. Auf diese Weise werden alle alkoholischen Gruppen verestert.

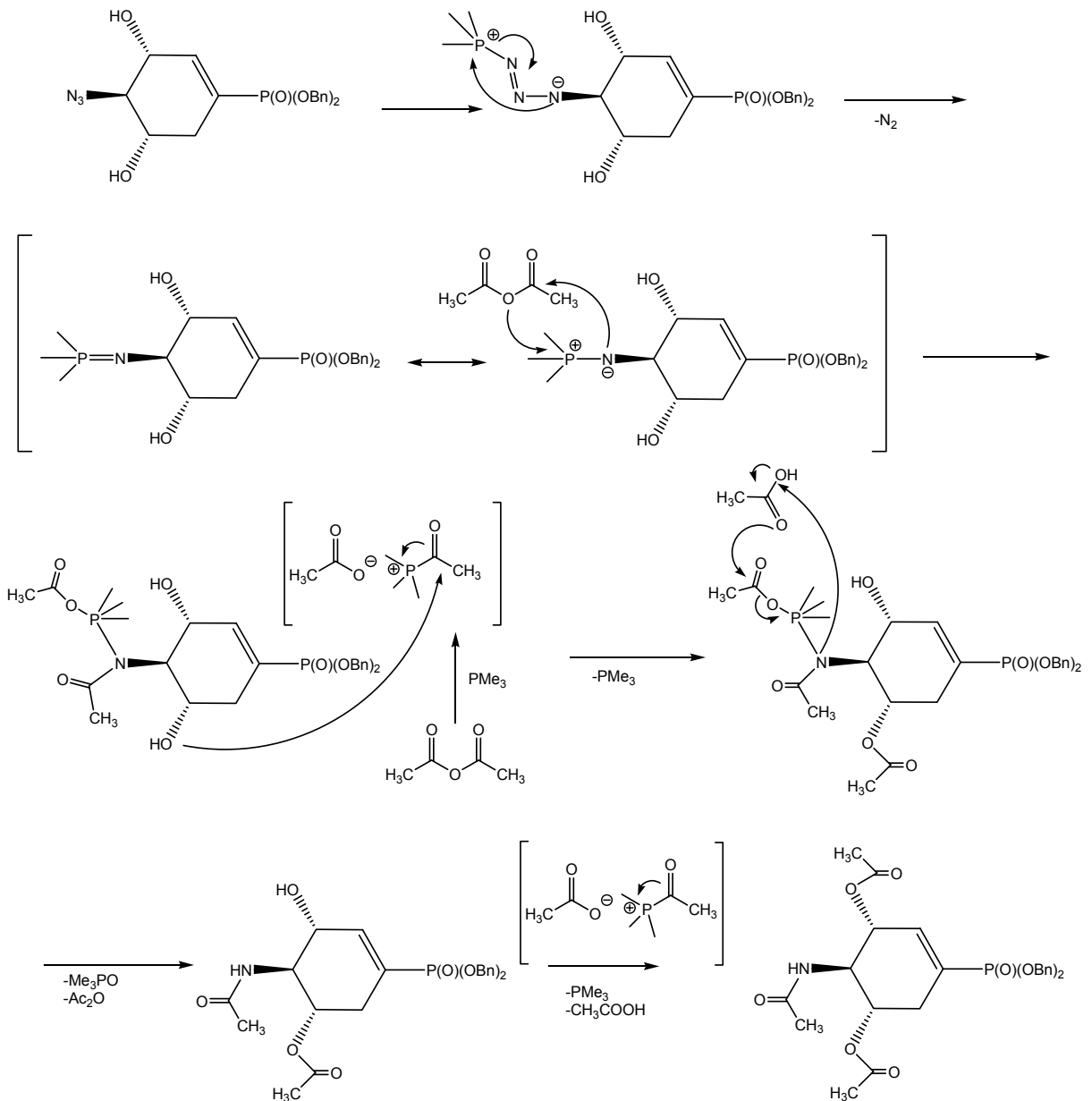


Abb. 3.1.1.5.2: Vorgeschlagener Mechanismus zur Darstellung von 15

3.1.1.6. Spaltung zum Monoester 16

Um zum Monoester zu gelangen, war es notwendig, einen Benzylester zu verseifen. Eine geeignete Methode ist hier die Reaktion von Thiophenol in Gegenwart von Triethylamin. Bei dieser Reaktion wird selektiv nur ein Ester verseift.^[60]

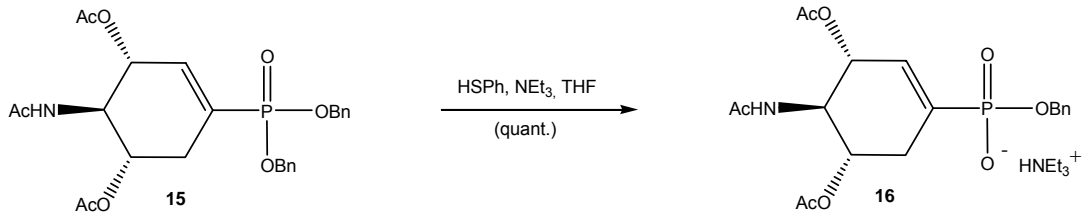


Abb. 3.1.1.6.1.: Synthese von 16

Mechanistisch kann man das sich folgendermaßen erklären. Unter basischen Bedingungen wird hier ein Thiophenolanion generiert. Dieses kann nukleophil an der Methylengruppe angreifen. Es bildet sich unter Abspaltung der Phenylgruppe ein negativ geladener Monoester. Ein weiterer Angriff findet nicht statt, da der Monoester resonanzstabilisiert ist.^[60]

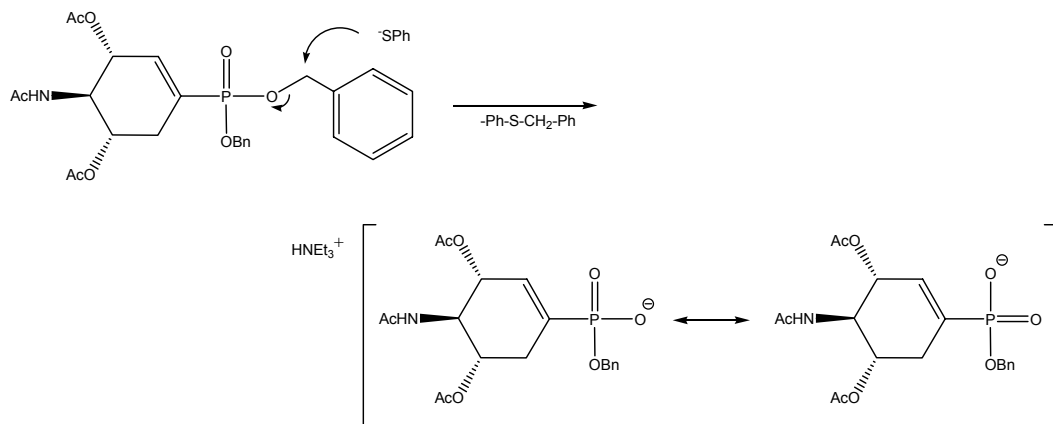


Abb. 3.1.1.6.2.: Vorgeschlagener Mechanismus zur Spaltung

3.1.1.7. Entschützung des Monoesters 17

Um in biologischen Tests die Wirkung möglicher Inhibitoren vergleichen zu können, wurde 16 in ammoniakalischer Methanollösung über vier Tage entschützt.

Das Ammoniumsalz 17 wurde über eine Biogelsäule P2 in 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer gereinigt und stand damit für biologische Tests zur Verfügung.

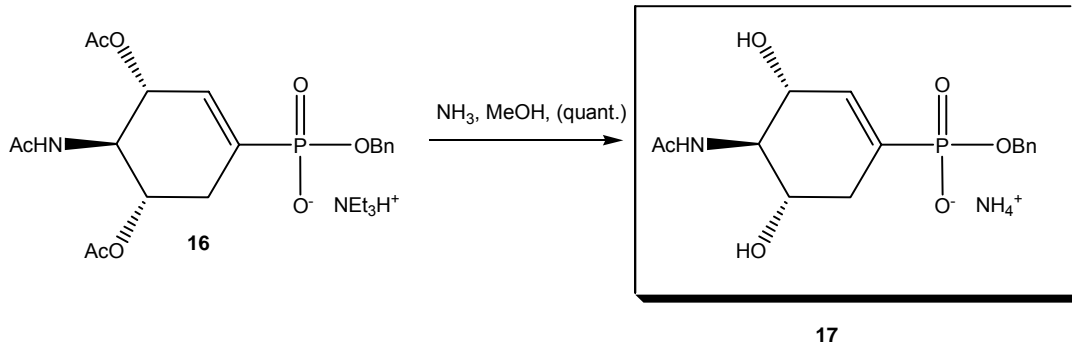


Abb. 3.1.1.7.: Entschützung von **16**

3.1.2. Darstellung der gemischten Diester

Prinzipiell können Ester aus freien Säuren auf verschiedenen Wegen hergestellt werden.

3.1.2.1. Säurechloride

Ester können aus Säurechloriden unter basischen Bedingungen mit den entsprechenden Alkoholen gewonnen werden.

Für die Herstellung der Phosphonsäurechloride kann man verschiedene Chlorierungsreagenzien wie PCl_5 , Thionylchlorid oder Oxalylchlorid verwenden.

Von *Malachowski* wird für Benzylphosphonate Oxalylchlorid oder Thionylchlorid empfohlen, da PCl_5 zu keiner Umsetzung führte.^[61]

Dafür wurde das Triethylammoniumsalz **16** mit Ionentauscher in die freie Säure **18** überführt.

Die Umsetzung von **18** mit Oxalylchlorid in abs. DMF führte zu einem gelben Produkt, das ohne weitere Charakterisierung mit abs. MeOH in Dichlormethan und Triethylamin als Base umgesetzt wurde. Es konnte bei diesem Testansatz jedoch kein Produkt nachgewiesen werden.

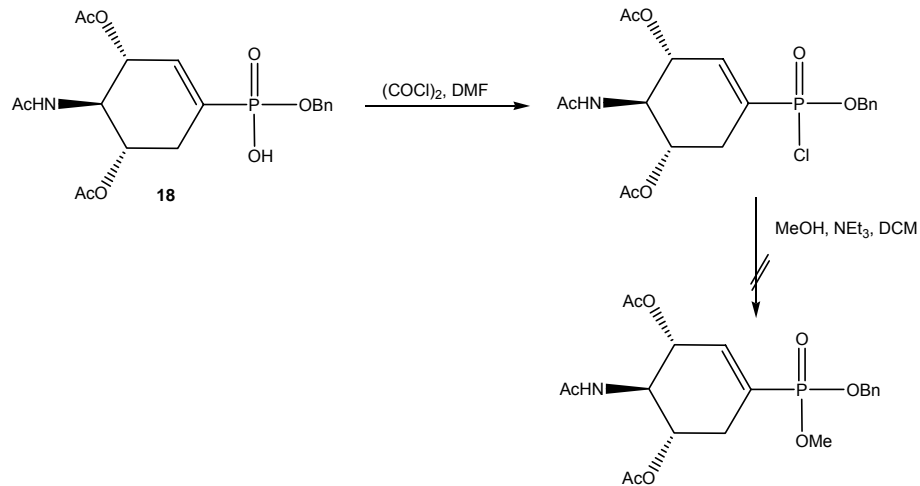


Abb. 3.1.2.1.: Esterdarstellung über ein Säurechlorid

Man kann davon ausgehen, dass das Säurechlorid sofort hydrolysiert ist und es daher zu keiner Reaktion kam. Auch der Versuch, das Säurechlorid mittels Thionylchlorid zu gewinnen, blieb erfolglos.

3.1.2.2. Estersynthese mittels Kupplungsreagenzien

Aus der Peptidchemie sind eine Reihe von Kupplungsreagenzien bekannt, die auch zur Darstellung von Phosphonsäureestern^[62] geeignet sind.

Bei *Ohashi et al.* und *Hum et al.* werden Reaktionen dieser Art mit DCC und EDC als Kupplungsreagenz in guten Ausbeuten beschrieben.^[63, 64]

Die Umsetzung von **18** mit dem Galaktosebaustein **19** in Pyridin mit DCC als Aktivierungsreagenz gelang jedoch nicht.

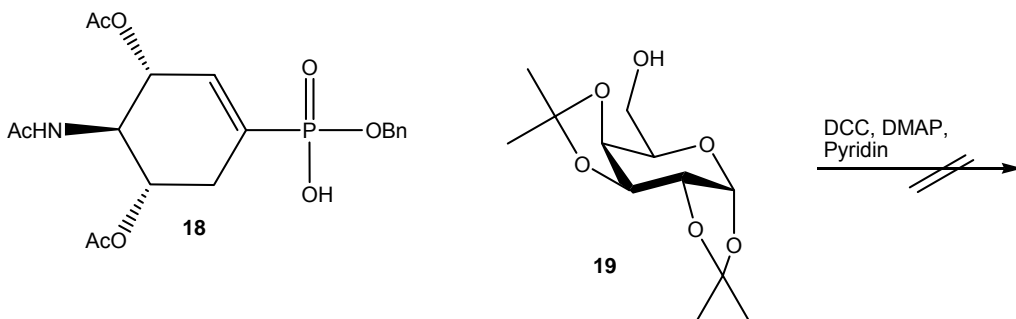


Abb. 3.1.2.2.: Versuch der Kupplung mit DCC

Auch andere Aktivierungsreagenzien wie z.B. TIBSCI^[65] vermochten das Problem nicht zu lösen.

3.1.2.3. Estersynthese mittels Mitsunobu-Reaktion

Eine weitere Möglichkeit zur Esterbildung stellt die Veresterung der Säure **18** mit der 1,2:3,4 -Diisopropylidengalaktose **19** unter Mitsunobu-Bedingungen dar.

1994 wurde von *Campell* die Synthese von Phosphonatestern unter diesen Bedingungen genauer untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass man die Ausbeuten wie sie unter Standardbedingungen (Überschuss Alkohol, DIAD, Phosphin) erhalten werden, drastisch gesteigert werden können, wenn man unter Alkohol-limitierenden Bedingungen arbeitet, also die Säure im Überschuss einsetzt.^[66, 67]

Beide Varianten wurden getestet, führten aber nicht zum Kondensationsprodukt.

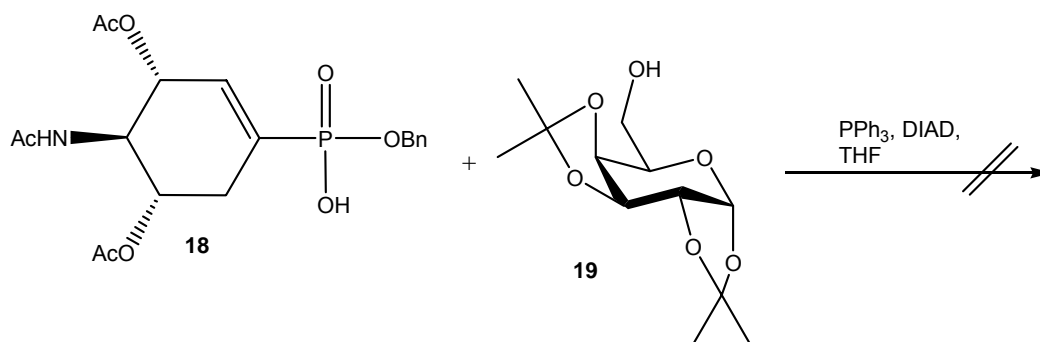


Abb. 3.1.2.3.: Mitsunobu-Kondensation

Da aber in der Literatur zahlreiche Beispiele für Mitsunobu-Kondensationen von Phosphonaten beschrieben sind, kann man hier davon ausgehen, dass der Benzylester sterisch zu anspruchsvoll ist.

3.1.2.4. Estersynthese via Alkylierung

Die Alkylierung einer Phosphonsäure mit einem reaktiven Elektrophil kann ebenfalls zur Estersynthese genutzt werden. Die direkte Umsetzung des Salzes **16** mit Triflat **20** in DMF zeigte schließlich das gewünschte Produkt **21**. Die Reaktion lief unter milden Bedingungen bei Raumtemperatur über mehrere Tage ab. Nicht umgesetztes Startmaterial konnte verlustfrei zurückgewonnen werden, da sich keine Nebenprodukte bildeten. Damit war der Syntheseweg für die Herstellung der gemischten Diester festgelegt.

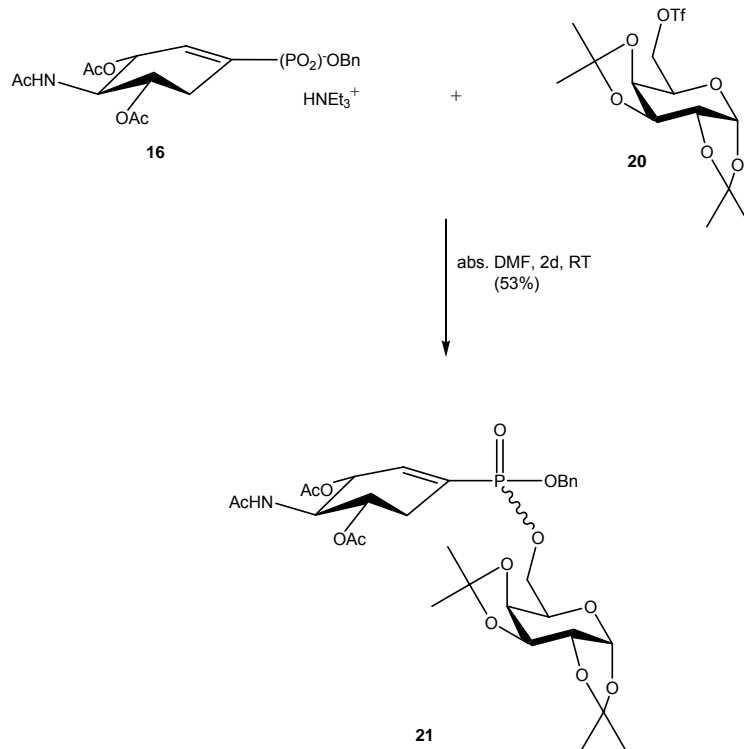


Abb. 3.1.2.4.: Synthese des gemischten Diesters

3.1.3. Synthese eines 1,6- verknüpften Pseudo-Sialosids

3.1.3.1. Retrosynthese des 1,6- verknüpften Pseudo-Sialosids

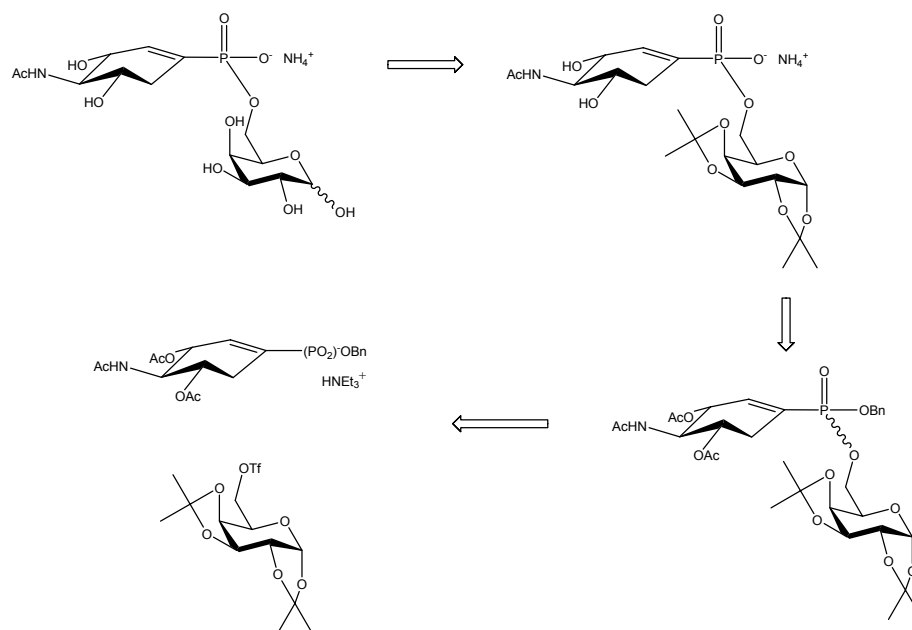


Abb. 3.1.3.1.: Retrosynthese des 1,6- verknüpften Sialosids

Ausgehend von den Bausteinen **16** und **20** sollte der gemischte Diester mittels Alkylierung synthetisiert werden. Anschließend müsste man den Benzylester mittels Hydrierung entfernen. Im letzten Schritt sollte die Entschützung des Moleküls unter möglichst milden Bedingungen erfolgen.

3.1.3.2. Synthese des Pseudo-Sialosids **21**

Die Synthese von **21** erfolgte wie oben beschrieben aus den Bausteinen **16** und **20**. Die beiden Bausteine wurden in äquimolaren Mengen miteinander umgesetzt. Dabei wurde das Cyclohexenphosphonat vorgelegt und der Zuckerbaustein im Abstand von 12 h portionsweise zugegeben. Die Ausbeute dieser Reaktion lag bei 56 %, wobei nicht umgesetztes Startmaterial zurückgewonnen wurde.

3.1.3.3. Entschützung von **21**

Zuerst musste der Benzylester entfernt werden, da die negative Ladung des Phosphonats wichtig für die Bindung des Inhibitors an das Substrat ist.

Bei der Entschützung bietet sich eine Hydrierung an, allerdings musste hier auf eine kurze Reaktionszeit geachtet werden, damit die Doppelbindung erhalten blieb.

Dazu wurde Pd auf Kohle in Methanol suspendiert und unter eine Wasserstoffatmosphäre gesetzt. Anschließend wurde eine Lösung aus **21** in Methanol zugespritzt.

Nach ca 5 min war die Hydrierung vollständig, und der Katalysator konnte abfiltriert werden. Dieses Zwischenprodukt wurde nicht weiter isoliert, sondern umgehend weiter umgesetzt. Man entfernte die Acetylschutzgruppen in ammoniakalischer Methanollösung bei Raumtemperatur über mehrere Tage und erhielt so Produkt **22**.

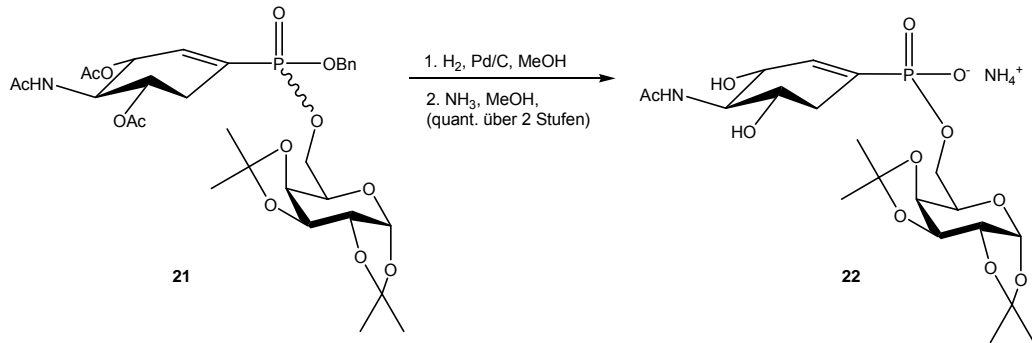


Abb. 3.1.3.3.1.: Entschützung von **21**

Anschließend wurden die Isopropylidengruppen am Zucker unter sauren Bedingungen gespalten. Hierfür wurde **22** in 50%iger TFA aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Die so erhaltene Endverbindung **23** wurde einlyophilisiert und über eine Biogelsäule P2 in 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer gereinigt.

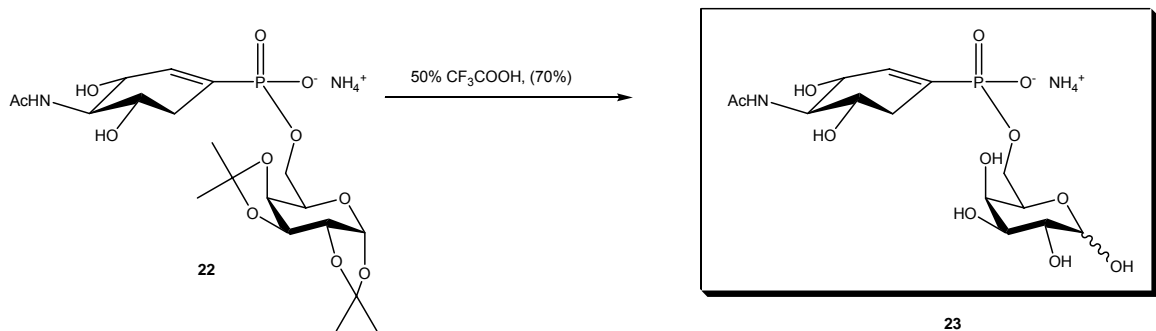


Abb. 3.1.3.3.2.: Entschützung von **22**

3.1.4. Synthese eines unpolaren Aglyconmimetikums

Aus der Literatur^[68] ist bekannt, dass hydrophobe Aglycone bei einigen bakteriellen Sialidasen zu einer deutlichen Verbesserung der Inhibition beitragen. Daher sollte auch ein unpolares Aglycon eingeführt werden.

Als hydrophobes Aglycon wurde eine Oktylkette gewählt.

3.1.4.1. Retrosynthese für ein Oktylcyclohexenphosphonat

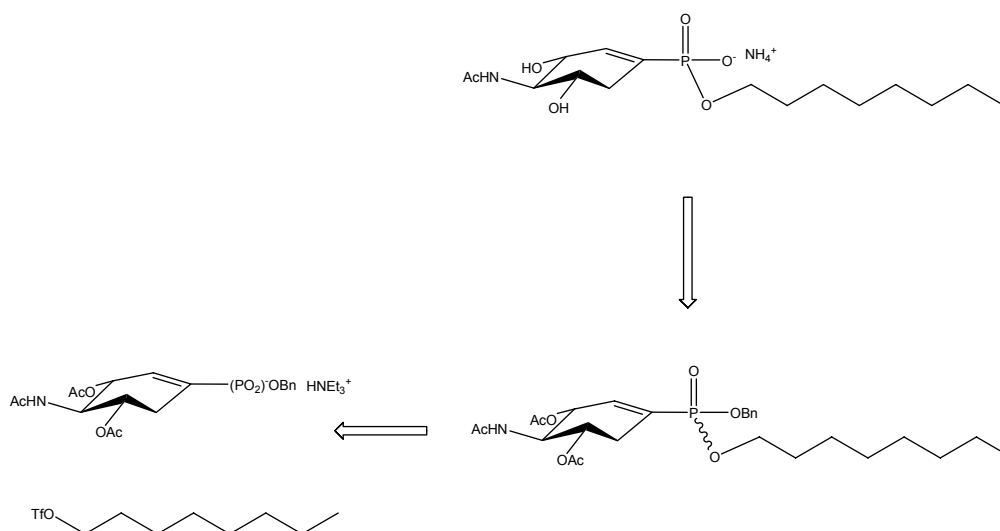


Abb. 3.1.4.1.: Retrosynthese des Oktylcyclohexenphosphonats

Der gemischte Diester sollte aus den Bausteinen **24**^[69] und **16** via Alkylierung hergestellt werden können. Die anschließende Spaltung des Benzylesters und die Entschützung des Zielmoleküls würden nach der gleichen Methode wie für Molekül **23** erfolgen.

3.1.4.2. Synthese des Oktylcyclohexenphosphonats **25**

Die Herstellung des gemischten Diesters verlief analog zu Verbindung **23**. Dafür wurde 1-Oktanol zu der literaturbekannten Verbindung **24**^[69] umgesetzt.

Das Triflat **24** wurde in äquimolarer Menge portionsweise zum Cyclohexenphosphonat in DMF gegeben und mehrere Tage bei Raumtemperatur gerührt. Man erhielt **25** in exzellenter Ausbeute von 80 % und konnte nicht umgesetztes Startmaterial zurück erhalten.

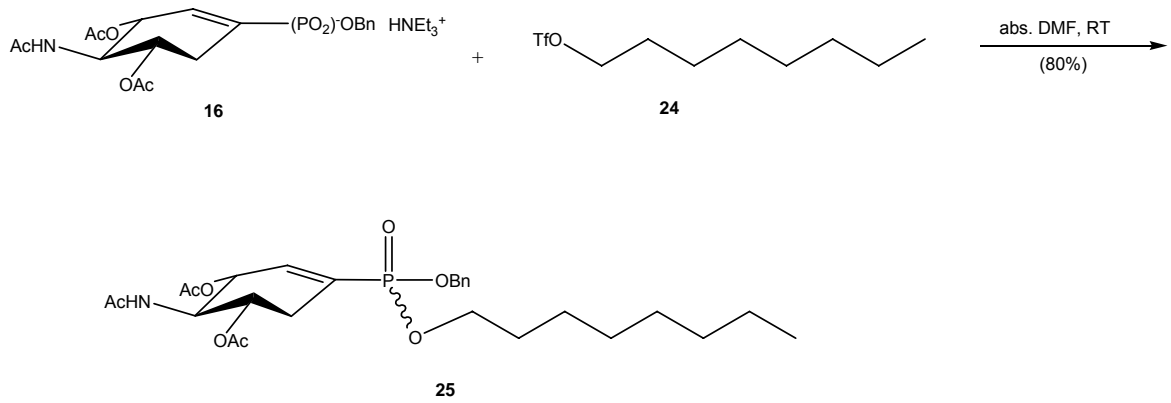


Abb. 3.1.4.2.: Synthese von 25

3.1.4.3. Entschützung von 25

Die Entschützung wurde analog zu Verbindung 23 durchgeführt. Erst wurde der Benzylether über eine Hydrierung gespalten, anschließend wurden in ammoniakalischer Methanollösung die Acetylschutzgruppen entfernt, und man erhielt 26 in quantitativer Ausbeute. Auch hier erfolgte die Endreinigung über eine Biogelsäule in 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer.

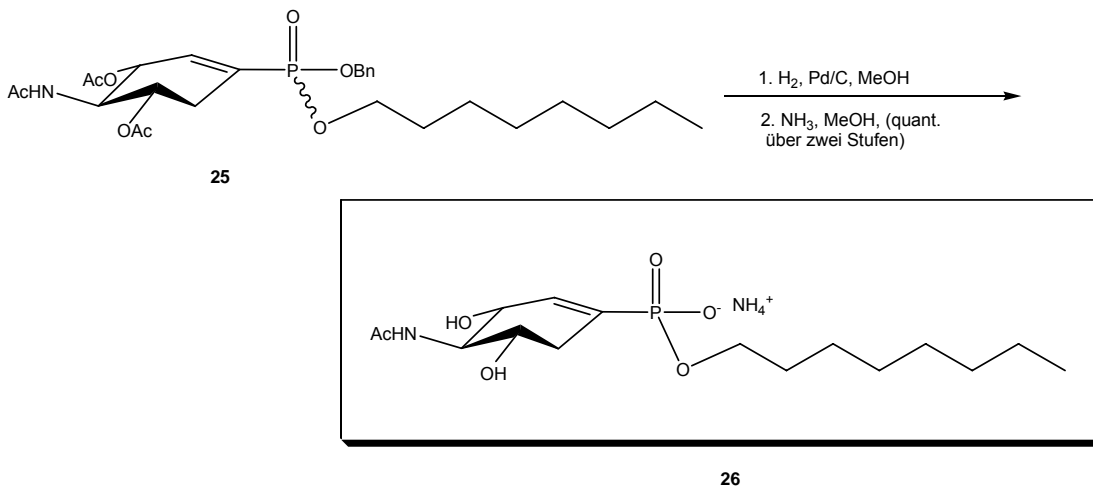


Abb. 3.1.4.3.: Entschützung von 25

3.1.5. Darstellung eines 2,3- verknüpften Sialosids

Da in der Natur Neuraminsäure häufig α -2,3- glycosidisch mit Galaktose verknüpft vorkommt, sollte auch diese Bindung synthetisiert werden.

3.1.5.1. Retrosynthese für ein 2,3- verknüpftes Sialosid

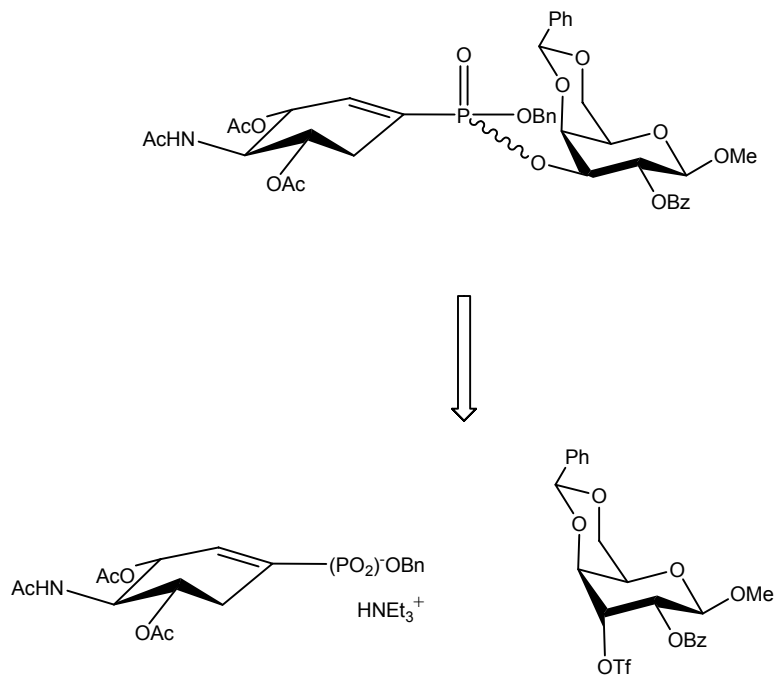


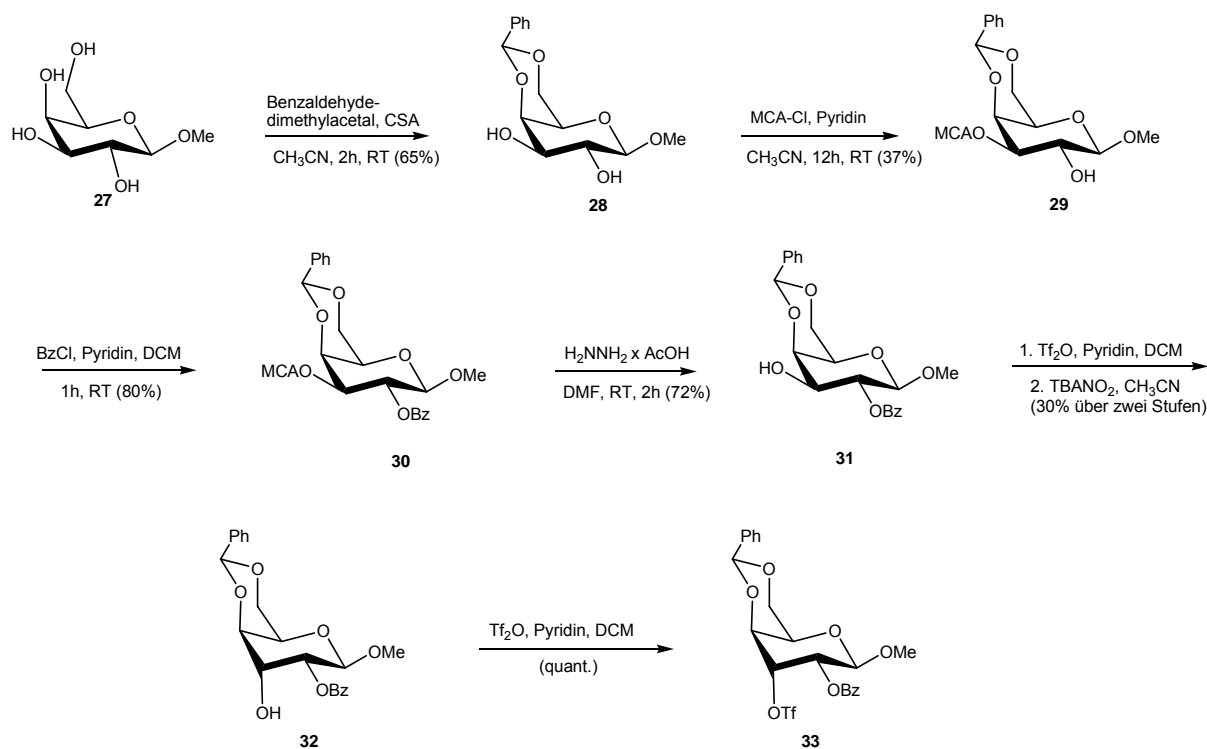
Abb. 3.1.5.1.: Retrosynthese für ein 2,3- verknüpftes Sialosid

Die Synthese des Zielmoleküls sollte aus Baustein **16** und einem entsprechenden Triflat möglich sein. Da die Alkylierung mit einem Triflat eine S_N2 -Reaktion ist, ist es notwendig, die 3-OH- Position der Galaktose vor der Alkylierungsreaktion in die epimere Glucose zu überführen. Anschließend sollte das Molekül nach bekannten Methoden entschützt werden.

3.1.5.2. Synthese des Galaktosebausteins für eine 2,3- Verknüpfung

Diese Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von Eisele.^[70] Ausgangsmaterial war die literaturbekannte Verbindung β -Methylgalaktose **27**.

Diese wurde zuerst mittels Benzaldehyddimethylacetal unter Standardbedingungen in Verbindung **28** überführt. Anschließend wurde die 3-OH-Gruppe selektiv über eine Monochloracetylschutzgruppe zu Baustein **29** geschützt. Es folgte die Benzoylierung an der 2-OH-Gruppe der Galaktose zu Verbindung **30**. Danach konnte die Monochloracetylschutzgruppe aufgrund ihrer höheren Reaktivität mit Hydraziniumacetat in DMF entfernt werden, ohne dass der Benzylester angegriffen wurde (**31**). Um eine 3-OH-freie galakto-Konfiguration im Zielmolekül zu erhalten, musste die Konfiguration an der 3-Position zweimal invertiert werden. Dazu musste **31** in die epimere Gulose überführt werden. Zuerst wurde **31** aktiviert, indem man eine bessere Abgangsgruppe, ein Trifluormethansulfonatester einführt und dieses Triflat sofort in Acetonitril aufnahm und mit TBANO₂ versetzte. Dadurch entstand ein instabiler Salpetrigsäureester, der sofort zum epimeren Alkohol **32** hydrolysierte.^[71, 72] Dieser wurde dann unter Standardbedingungen zum Triflat **33** umgesetzt.

Abb. 3.1.5.2.: Darstellung von **33**

3.1.5.3. Versuch der Umsetzung zum 2,3- verknüpften Sialosid

Die Umsetzung sollte analog zu den Zielverbindungen **23** und **26** in abs. DMF erfolgen. Es konnte jedoch kein Produkt isoliert werden. Auch die Variation der Reaktionsbedingungen (Temperatur, Lösungsmittel) brachten keinen Erfolg.

Man konnte die Edukte nach mehreren Tagen Reaktionszeit nahezu quantitativ reisolieren.

Offensichtlich war dieses sekundäre Triflat einfach nicht reaktiv genug.

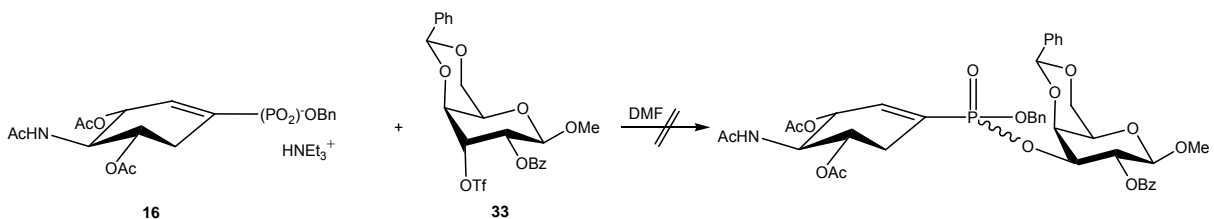


Abb. 3.1.5.3.: Versuch der Umsetzung zum 2,3- verknüpften Sialosid

Da die direkte Verknüpfung des Cyclohexenphosphonats mit Verbindung **33** nicht gelang, wurde eine Alternative gesucht. Da primäre Triflate deutlich reaktiver sind, wurde an die 3-Position ein Linker eingeführt, da dann die Reaktion mit einem primären Triflat möglich sein sollte.

3.1.6. Retrosynthese für ein 2,3- verknüpftes Sialosid mit Ethylenspacer

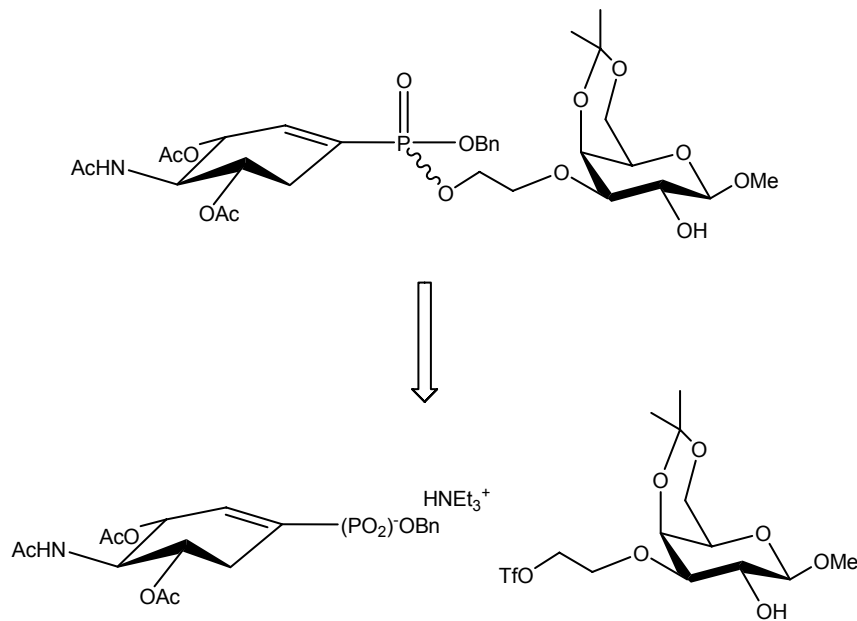


Abb. 3.1.6.: Retrosynthese für 2,3- verknüpftes Sialosid mit Ethylenspacer

Der gemischte Diester sollte über eine Alkylierung aus **16** und einem Galaktosebaustein mit Ethylenlinker an der 3-OH-Position synthetisiert werden.

3.1.6.1. Darstellung des Galaktosebausteins mit Ethylenlinker

Ausgehend von der literaturbekannten Verbindung β -Methylgalaktose **27** wurde mit Dibutylzinnoxid das Zinnacetal synthetisiert und dieses ohne weitere Charakterisierung selektiv mit Allylbromid nukleophil zu Verbindung **34** geöffnet. Anschließend wurden die 4- und 6-OH-Gruppen mit einem Isopropylidenacetal geschützt (**35**). Der allylierte Baustein **35** wurde dann in einer Ozonolyse- Reaktion mit anschließender Reduktion mit NaBH_4 zu Verbindung **36** umgesetzt. Baustein **36** wurde dann unter Standardbedingungen in das Triflat **37** überführt.

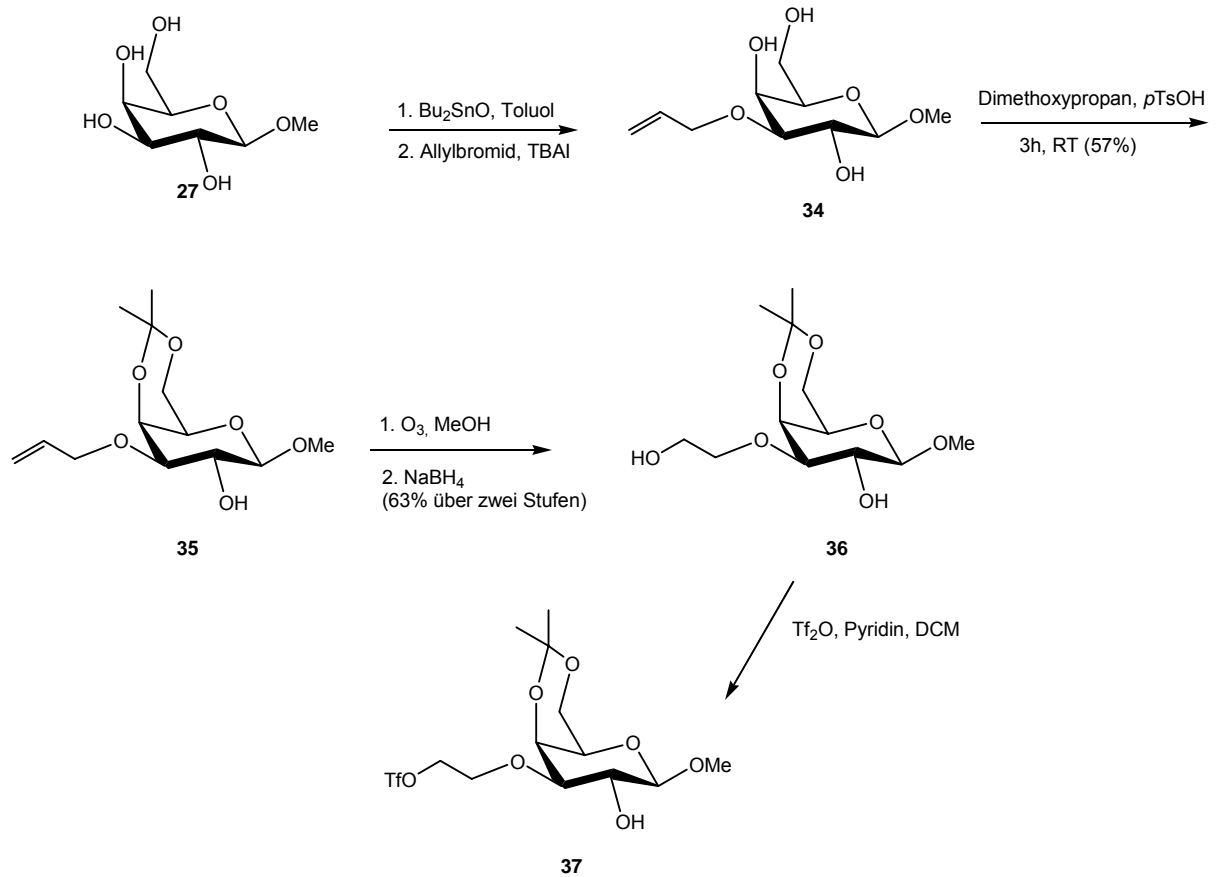


Abb. 3.1.6.1.: Darstellung von 37

Das Triflat **37** war sehr instabil und konnte daher nicht n\u00e4her charakterisiert werden. Es wurde ohne weitere Reinigung sofort umgesetzt.

3.1.6.2. Versuch der Synthese eines 2,3- verkn\u00fcftten Sialosids mit Ethylenspacer

Die Umsetzung in DMF von **37** mit **16** gelang nicht. Auch die Variation der Reaktionsbedingungen vermochten das Problem nicht zu l\u00f6sen. Da die Position 2 an der Galaktose ungesch\u00fctzt war, kam es zudem vermutlich noch zu einer intramolekularen Reaktion mit dem Triflat.

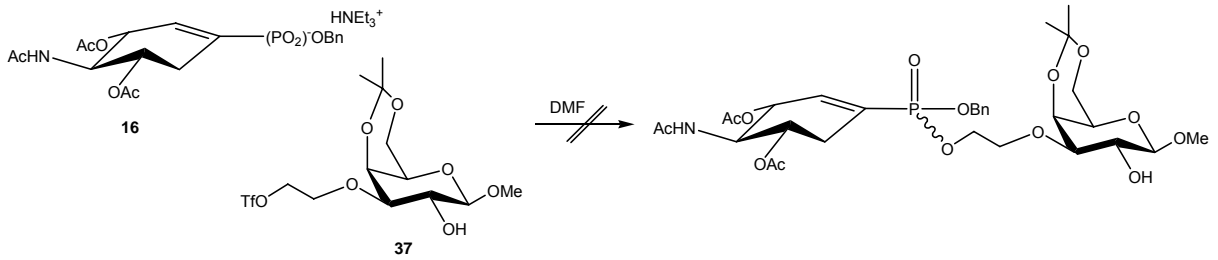


Abb. 3.1.6.2.: Versuch der Synthese eines 2,3- verknüpften Sialosids mit Ethylenspacer

Daher wurde in der folgenden Synthese ein voll geschütztes Galaktosederivat verwendet.

3.1.7. Variierte Retrosynthese für ein 2,3- verknüpftes Sialosid mit Ethylenspacer

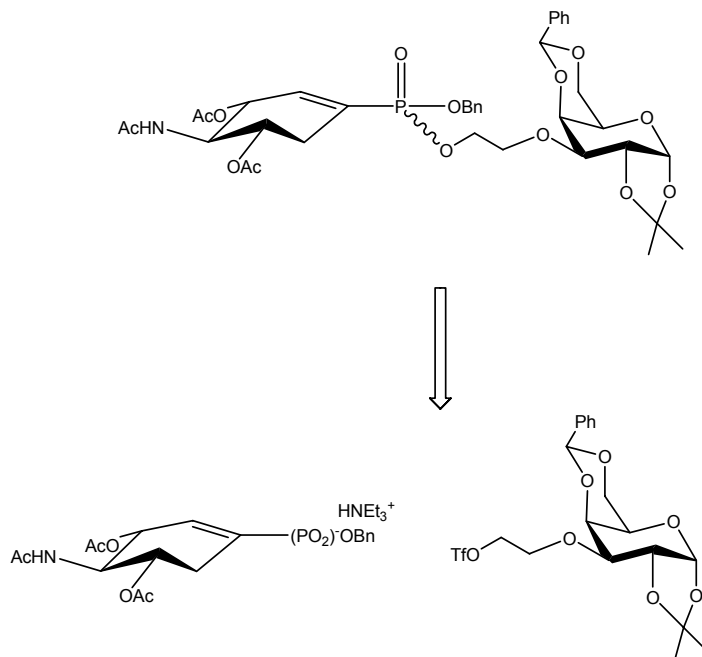


Abb. 3.1.7.: Variierte Retrosynthese für ein 2,3- verknüpftes Sialosid mit Ethylenspacer

Ziel dieser Synthese sollte sein, auf möglichst kurzem Weg zu einem voll geschützten Galaktosebaustein zu gelangen, um zu sehen, ob die Verknüpfung mit 16 machbar ist. Hier wurde ein einfacher Baustein aus der Literatur als Ausgangsmaterial verwendet, auch wenn das am Ende bedeuten würde, dass man ein anomeres Gemisch erhält.

3.1.7.1. Synthese des Galaktosebausteins 42

Ausgehend von Benzylidengalaktose **38**^[73] wurde diese anomer über ein Isopropylidenacetal geschützt. Verbindung **39** wurde dann an der 3-OH-Gruppe mit Allylbromid unter Standardbedingungen zu Baustein **40** allyliert. Es folgte eine Ozonolyse mit anschließender Reduktion mit NaBH₄, so dass Verbindung **41** erhalten wurde. Diese wurde dann zum Triflat **42** umgesetzt.

Das Triflat **42** war sehr instabil und musste sofort mit **16** umgesetzt werden.

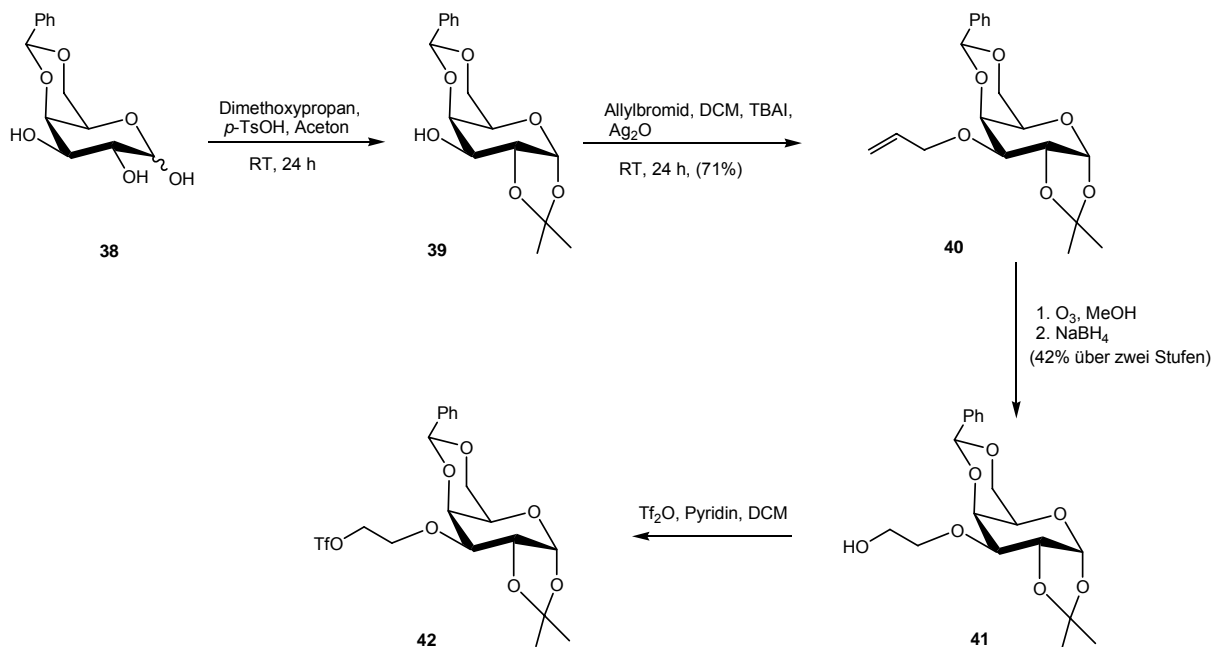


Abb. 3.1.7.1.: Synthese von **42**

3.1.7.2. Versuch der Umsetzung zu einem 2,3- verknüpften Sialosid mit Ethylenspacer

Die Umsetzung von **16** mit **42** gelang nicht, da das Triflat **42** viel zu instabil war und der Reaktionszeit von mehreren Tagen nicht standhielt.

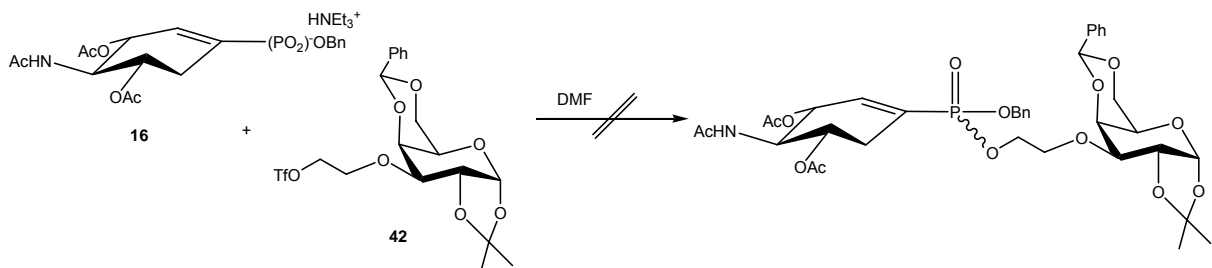


Abb. 3.1.7.2.: Versuchte Umsetzung eines 2,3- verknüpften Sialosids mit Ethylenspacer

Mit diesem Experiment war klar, dass die Alkylierungsreaktion nicht die geeignete Lösung zur Synthese weiterer potentieller Inhibitoren ist. Es musste ein anderer Weg gefunden werden, der auch für die Kupplung sekundärer OH-Gruppen geeignet ist.

3.1.8. Vorüberlegungen für eine neue Synthesestrategie für Pseudo-Sialoside

Zuerst musste eine andere Kupplungsmethode gefunden werden. Die Mitsunobu-Reaktion ist in der Literatur^[74, 75] dafür bekannt, dass sie sowohl für die Veresterung von primären als auch für sekundäre Alkoholgruppen geeignet ist. Da die Mitsunobu-Reaktion mit den Benzylestern nicht gelang, wurde ein sterisch weniger anspruchsvoller Ester gewählt. Gleichzeitig sollte dieser Ester wie schon bei den Dibenzylphosphonaten mit Thiophenol selektiv zum Monoester gespalten werden können. Dafür kam nur ein Methylester in Frage, da er beide Bedingungen erfüllte. Zudem sind in der Literatur^[66, 67, 76] einige Beispiele einer Mitsunobu-Reaktion von Methylphosphonaten beschrieben. Nachteilig am Methylester ist jedoch die schlechtere Detekierbarkeit der Reaktionsprodukte.

Ein weiteres Syntheseproblem war die Darstellung des Tetraalkylphosphonats **12**. Dieser Schritt hatte die doch recht lange Synthese entscheidend limitiert. Eine

Überlegung war, dass das Azid zu Nebenreaktionen neigt. Daher sollte in der neuen Synthese das Azid zu einem späteren Zeitpunkt eingeführt werden.

Bevor die neue Synthese durchgeführt wurde, wurde die Mitsunobu-Reaktion an einfachen Cyclohexenphosphonaten, welche in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden waren, getestet.

3.1.8.1. Test für Mitsunobu-Bedingungen

Um die optimalen Bedingungen für eine Mitsunobu-Kupplung zu finden wurde ein einfacheres Cyclohexenphosphonat **43** gewählt, welches in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden war. Als Alkoholkomponente wurde der Baustein **19** gewählt.

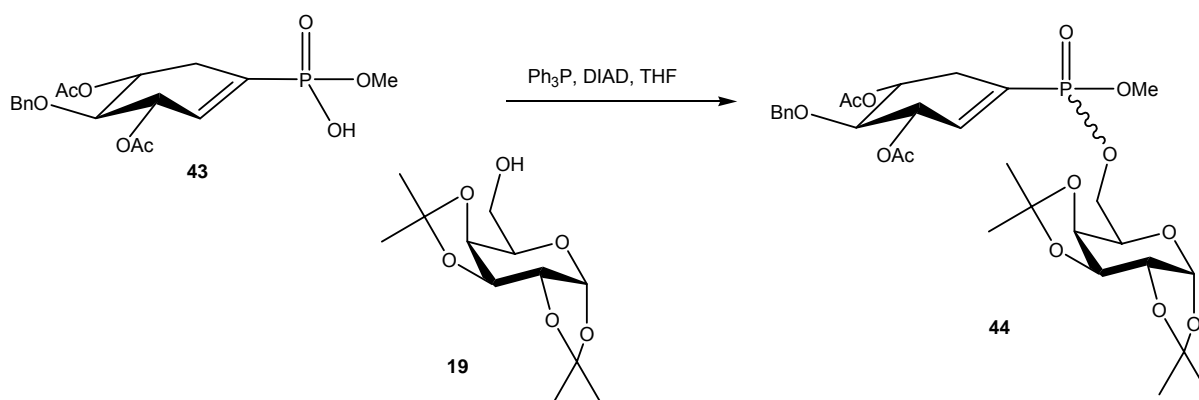


Abb. 3.1.8.: Testreaktion für die Mitsunobu-Kupplung

Die Reaktion wurde immer in abs. THF als Lösungsmittel durchgeführt. Zuerst wurde bei Raumtemperatur gearbeitet. Dabei wurde die Umsetzung unter Standardbedingungen (Überschuss Alkoholkomponente, Ph_3P und DIAD) versucht. Obwohl der Überschuss von 1.3 eq bis 2.5 eq variiert wurde, konnte kein Umsatz festgestellt werden.

Daher wurde die Temperatur zunächst auf 40°C erhöht. Hier konnte in Spuren das gewünschte Produkt nachgewiesen werden. Daraufhin wurde die Reaktion bei 70°C gerührt. Hierbei konnte erstmals das Produkt **44** in 10 % Ausbeute gewonnen werden. Daher wurden die Äquivalente für die Überschusskomponenten variiert. Ein Überschuss von 1.7 eq und eine Reaktionszeit von 12 h bei 70°C brachten dann die beste Ausbeute von 60 % und legten die Reaktionsbedingungen damit fest.

3.2. Darstellung über die Methylester-Strategie

3.2.1. Retrosynthese für die Darstellung eines Methylcyclohexenphosphonats

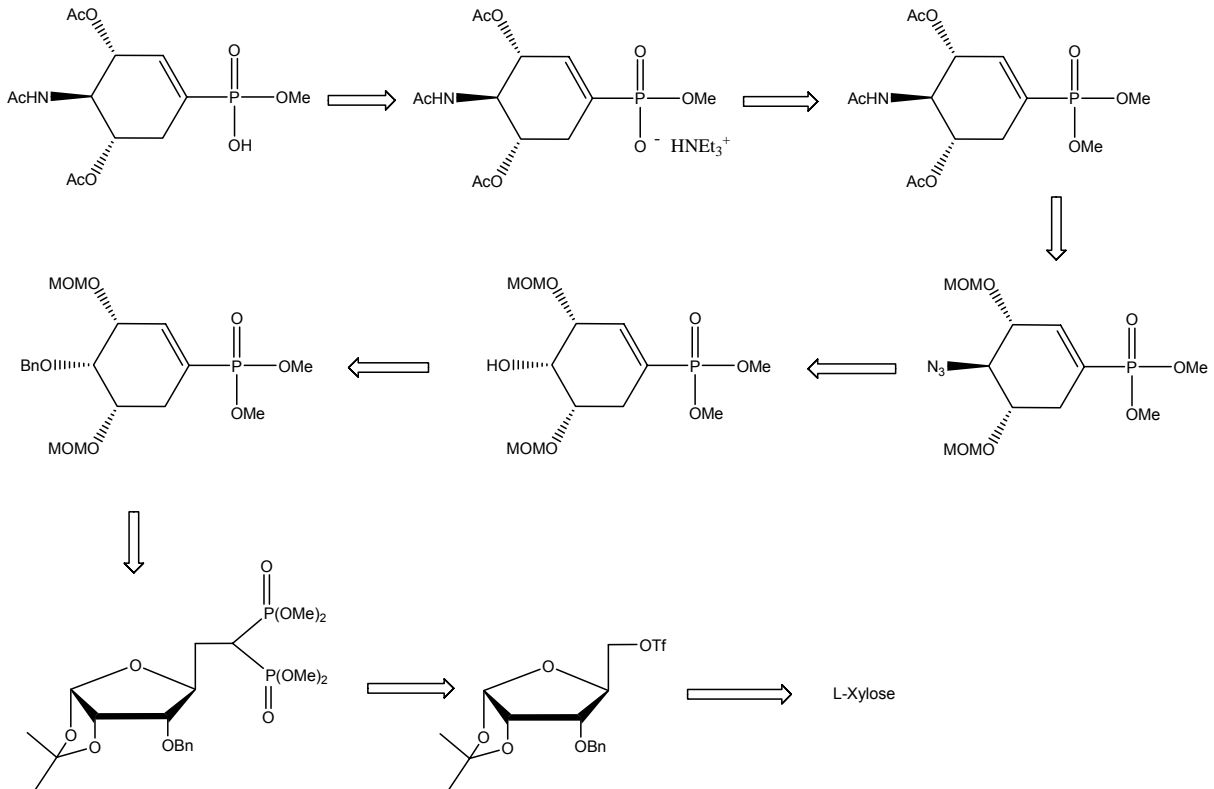


Abb. 3.2.: Retrosynthese für ein Methylphosphonat

Ausgehend von L-Xylose sollte erst ein Triflat mit Ribosekonfiguration hergestellt werden. Die 3-OH-Gruppe könnte als Benzylether geschützt werden. Die Einführung des Methylphosphonats sollte nach bereits beschriebener Methode erfolgen. Nach der Zyklisierung müssten die freien OH-Gruppen mit geeigneten Schutzgruppen geschützt werden. Anschließend sollte der Benzylether entfernt werden, damit das Azid mit einer geeigneten Methode eingeführt werden kann. Die Einführung des Acetamids und die selektive Abspaltung zum Monoester würden nach dem gleichen Syntheseprinzip wie beim Benzylester erfolgen.

3.2.1.1. Darstellung des Triflats 47

Ausgehend von L-Xylose **1** wurde wie auch schon für das Benzylcyclohexenphosphonat der Zucker zunächst anomer mittels Isopropylidenacetal geschützt. Die 1,2-*O*-Isopropyliden-L-Xylofuranose **2** wurde dann selektiv an der primären Alkoholfunktion mit TBDMS-Cl silyliert. 5-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-L-Xylofuranose **3** wurde zuerst mit einer Swern-Oxidation zum Keton oxidiert, welches mit NaBH₄ zur L-Ribofuranose **5** reduziert wurde. Da die Azideinführung erst nach der Zyklisierung erfolgen sollte, musste hier die 3-OH-Gruppe als Benzylether **45** geschützt werden. Anschließend wurde der Silylether mit TBAF zu **46** gespalten. Die 5-OH-freie Verbindung wurde zum Triflat **47** umgesetzt.

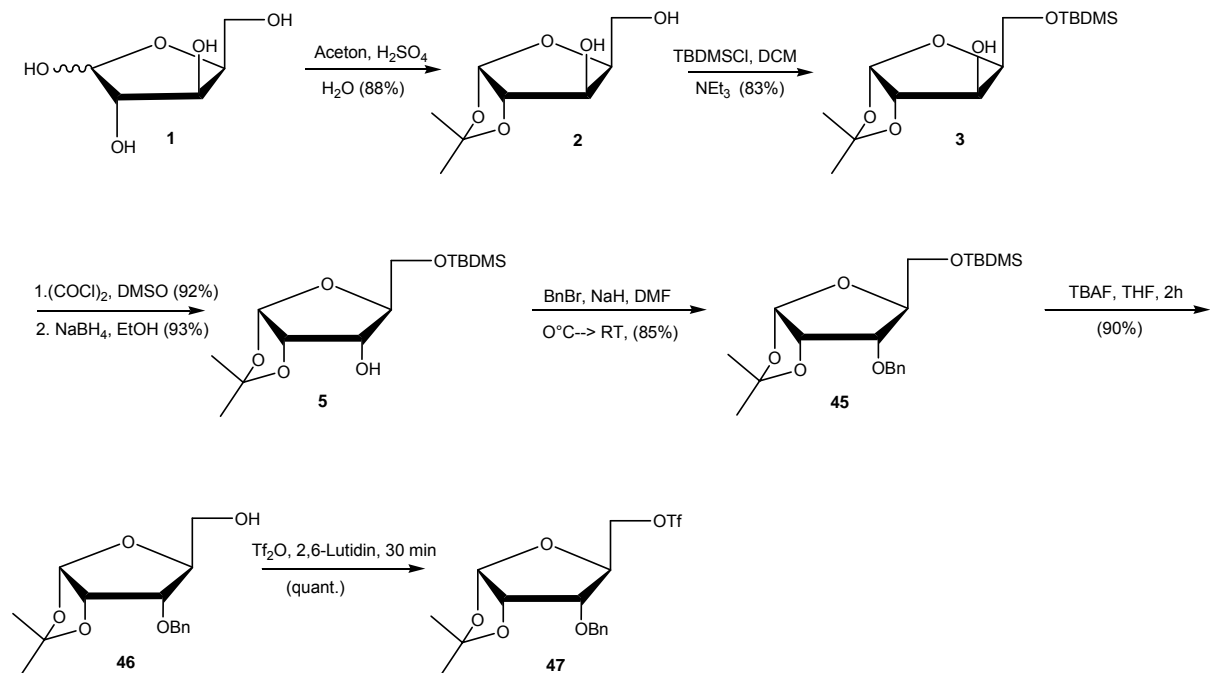


Abb. 3.2.1.1.: Darstellung von **47**

3.2.1.2. Synthese des Diphosphonats 49

Das Triflat **47** wurde mit Tetramethylmethyldiphosphonat **48** in abs. DMF und NaH als Base wie schon bei Baustein **12** beschrieben zu **49** umgesetzt. Die Ausbeute konnte im Vergleich zu **12** verdreifacht werden. Damit hat sich der Verdacht bestätigt, dass das Azid durch Nebenreaktionen die Ausbeute verringert.

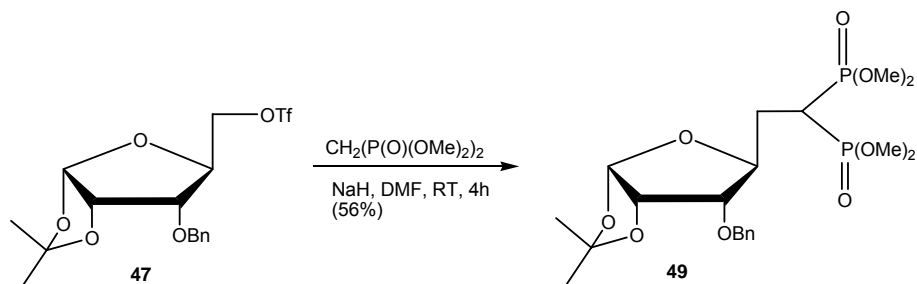


Abb. 3.2.1.2.: Synthese von 49

3.2.1.3. Darstellung des Cyclohexenphosphonats 51

Verbindung 49 wurde mit 5%iger Schwefelsäure in Dioxan bei 80°C zu Baustein 50 entschützt. Dieser wurde wie schon beschrieben mit Lithiumbistrimethylsilylamid in abs. Dioxan zu 51 cyclisiert.

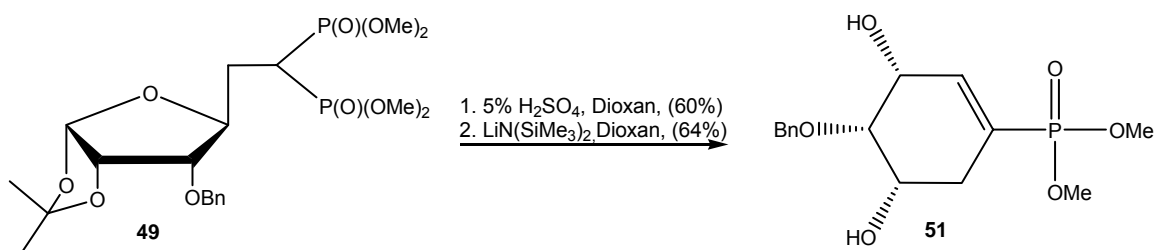


Abb. 3.2.1.3.: Darstellung von 51

3.2.1.4. Wahl der geeigneten Schutzgruppe

Cyclohexenphosphonat 51 musste jetzt mit geeigneten Schutzgruppen vollständig geschützt werden. Wichtig war, dass diese Schutzgruppen die Hydrierung im nächsten Schritt aushalten und dabei sterisch nicht zu anspruchsvoll sind. Ferner müssen diese Schutzgruppen selektiv in Gegenwart der Methyl ester entfernt werden können.

Es wurden zuerst Acetylschutzgruppen gewählt, da sich diese bei Hydrierungen der Benzylester bewährt hatten. Leider zeigte sich in der folgenden Transferhydrierung, dass die Acetylgruppen zur Wanderung neigten und so nicht trennbare Produktgemische erhalten wurden.

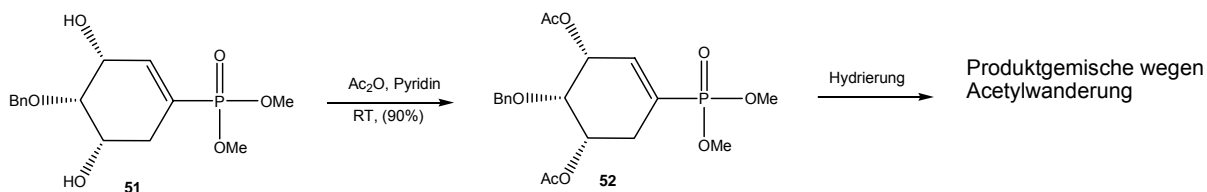


Abb. 3.2.1.4.1.: Acetylierung und Hydrierung

Dann wurden die OH-Gruppen mittels verschiedener Silylether geschützt. Hier zeigte sich in der nachfolgenden Transferhydrierung, dass diese Schutzgruppen offensichtlich sterisch zu anspruchsvoll sind. Man konnte zwar debenzyliertes Produkt erhalten, allerdings war die Doppelbindung ebenfalls hydriert worden.

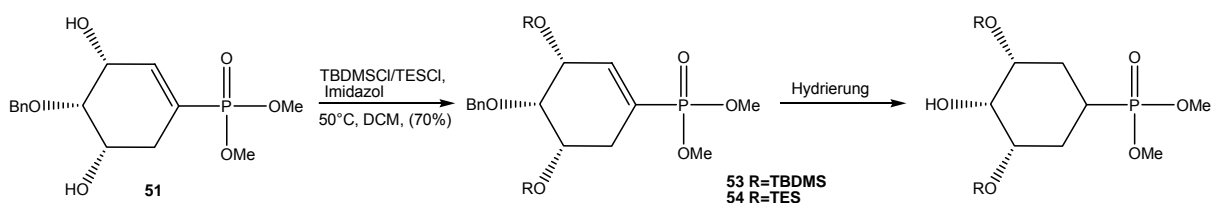


Abb. 3.2.1.4.2.: Veretherung und Hydrierung

Der Versuch, die beiden OH-Gruppen über ein Acetal zu schützen, schlug fehl. Obwohl verschiedene Reagenzien (Dimethoxypropan, 2-Methoxypropan) und diverse Säuren (CSA, *p*-TsOH) eingesetzt wurden, konnte nie das 3,5-geschützte Produkt nachgewiesen werden. Offensichtlich ist der Cyclohexenring für eine Acetalbildung an dieser Stelle zu starr.

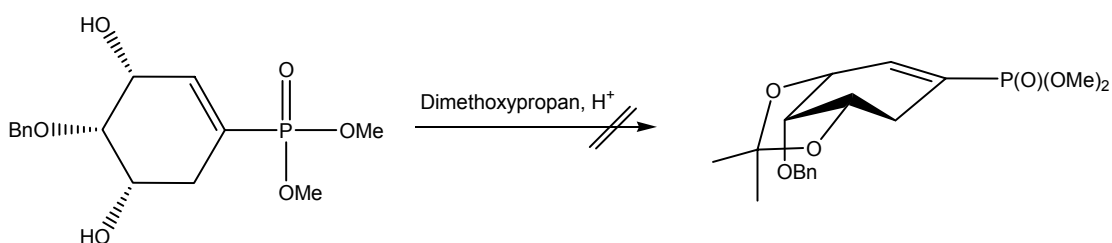


Abb. 3.2.1.4.3.: Schützungsversuch als Acetal

Daraufhin wurden Methoxymethylester als Schutzgruppen gewählt, diese sind sterisch nicht sehr anspruchsvoll und unter sauren Bedingungen leicht zu spalten. Die Synthese^[77] erfolgte in Dimethoxymethan unter katalytischer Zugabe von Trifluormethansulfonsäure bei Raumtemperatur über Nacht zu Verbindung 55. Diese Methode wird in der Literatur für die Darstellung von 1,3-Methylenacetalen

beschrieben. Dieses Produkt konnte nicht nachgewiesen werden, da der Cyclohexenring die Acetalbildung offensichtlich unterbindet.

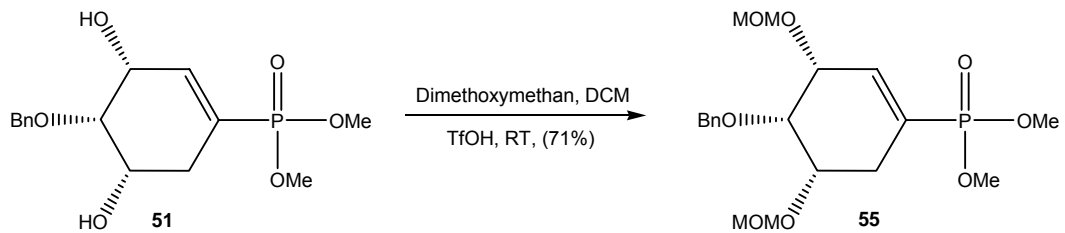


Abb. 3.2.1.4.4.: Einführung der MOM-Gruppen

3.2.1.5. Entschützung des Benzylethers 55

Baustein **55** sollte hydriert werden, um den Benzylether zu entfernen. Es musste eine Methode gewählt werden, bei der die Doppelbindung erhalten bleibt.

Eine milde Methode ist die Transferhydrierung mit 1,4- Cyclohexadien als Wasserstoffquelle.^[78-81]

Die Reaktion wurde in Ethanol mit Palladium auf Aktivkohle bei 50°C durchgeführt. Nach drei Tagen war kein Startmaterial mehr vorhanden. Es konnten zwei Produkte nachgewiesen werden, zum einen das gewünschte Produkt **56** (32 %) und zum anderen das teilentschützte Produkt (ca 20 %). Offensichtlich wurde das Medium über die Reaktionszeit sauer genug, um eine MOM-Gruppe abzuspalten.

Um das Problem der Teilentschützung in den Griff zu bekommen, wurde der Pearlman-Katalysator eingesetzt. Das Palladiumhydroxid sollte verhindern, dass die Reaktionslösung zu sauer wird. Man erhielt bei sonst gleichen Reaktionsbedingungen das gewünschte Produkt in 77 % Ausbeute und lediglich zu 5 % das Nebenprodukt.

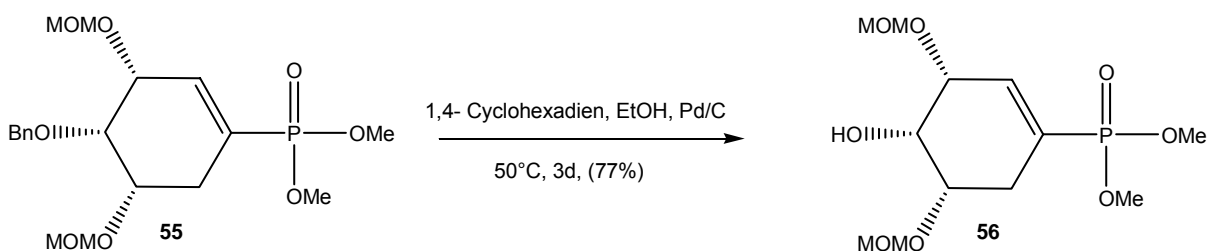


Abb. 3.2.1.5.: Hydrierung von **53**

3.2.1.6. Die Einführung des Azids

In der Literatur sind zahlreiche Möglichkeiten zur Azideinführung beschrieben. Wichtig war hier die Beachtung der Stereochemie. Das Azid sollte über eine S_N2 -Reaktion eingeführt werden, weil nur so am Ende das Cyclohexenphosphonat die richtige Konformation aufweist.

Die Mitsunobu-Reaktion verläuft nach einem S_N2 -Mechanismus und war daher für die Azideinführung geeignet. Die Reaktion wurde mit Dibenzylphosphorylazid in THF und Ph_3P und DIAD bei 50 °C durchgeführt.^[82] Man erhielt Azid **57** in 45 % Ausbeute. Nachteilig bei dieser Reaktion war die etwas schwierige Aufreinigung.

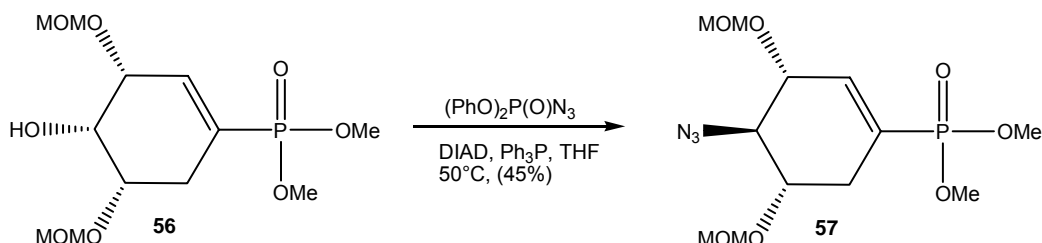


Abb. 3.2.1.6.1: Azideinführung nach Mitsunobu

Eine weitere Möglichkeit der Azideinführung unter Retention der Konfiguration ist die Darstellung des Triflats mit anschließender Azideinführung. Das Triflat wurde unter Standardbedingungen hergestellt. Als Reagenz für die Azideinführung wurde Tetramethylguanidiniumazid^[83] gewählt. Die Reaktion erfolgte in DMF bei 50°C. Es konnte nach 12 h das Azid **57** in 43 % Ausbeute isoliert werden.

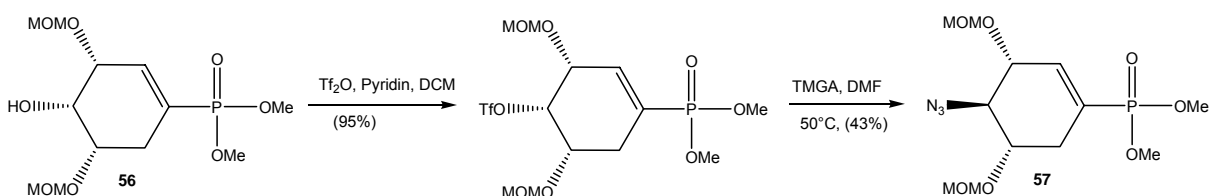


Abb. 3.2.1.6.2.: Azideinführung mit Tetramethylguanidiniumazid

Da die Ausbeute nur moderat war, wurde ein anderes Reagenz, Natriumazid, gewählt. Hier konnte das Triflat in DMF und katalytischer Zugabe von $tBuNH_4Cl$ ^[84] bei

50°C über Nacht zum Azid **57** in 86 % Ausbeute umgesetzt werden. Diese Methode wurde dann gewählt, da die Ausbeute gut und die Reinigung einfach war.

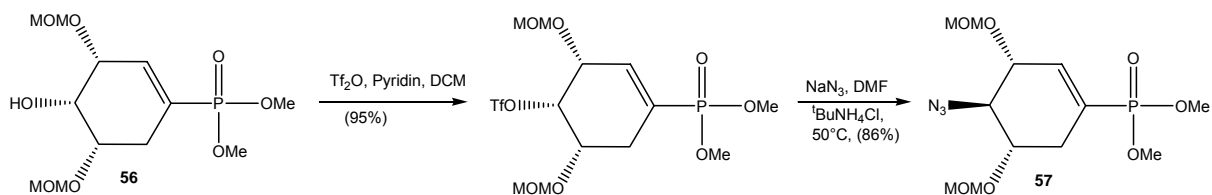


Abb. 3.2.1.6.3.: Azideinführung mit Natriumazid

3.2.1.7. Synthese des Acetamids **59**

Zunächst wurden die MOM-Schutzgruppen entfernt. Dazu wurde Azid **57** in 50 %iger TFA über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Man erhielt Baustein **58** in quantitativer Ausbeute.

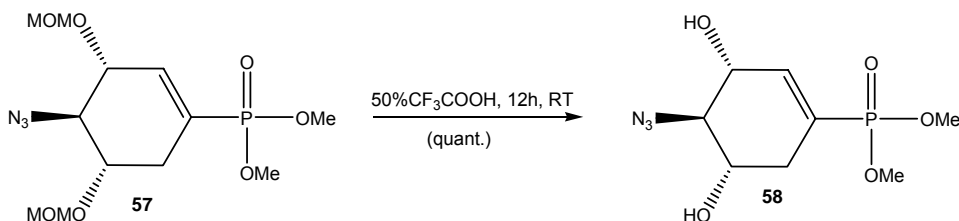


Abb. 3.2.1.7.1.: MOM-Entschützung

Anschließend wurde in der bereits beschriebenen Eintopfreaktion mit Me_3P und Ac_2O Baustein **59** hergestellt.

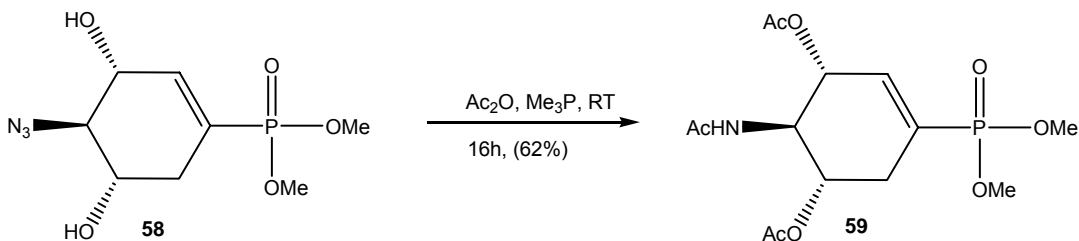


Abb. 3.2.1.7.2.: Darstellung von **59**

3.2.1.8. Synthese der Säure 61

Acetamid **59** wurde mit Thiophenol und Triethylamin selektiv zum Monoester umgesetzt.

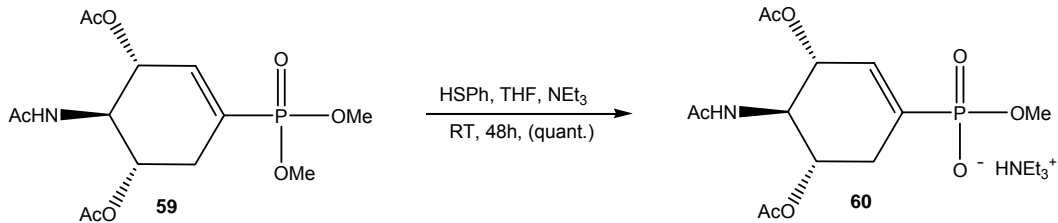


Abb. 3.2.1.8.1.: Spaltung zum Monoester **60**

Monoester **60** wurde anschließend mit Amberlite-IR-120 in die freie Säure **61** überführt. Diese wurde dann für alle Mitsunobu-Veresterungen eingesetzt.

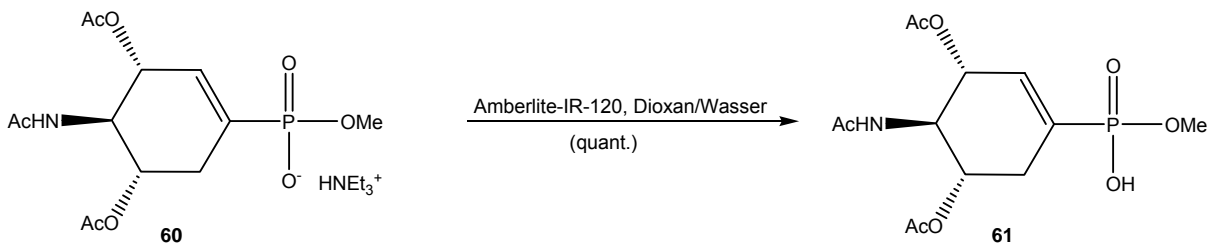


Abb. 3.2.1.8.2.: Umsalzen zur Säure **61**

3.2.1.9. Entschützung des Monoesters 60

Um in biologischen Tests die Wirkung möglicher Inhibitoren vergleichen zu können, wurde **60** in ammoniakalischer Methanollösung über vier Tage entschützt.

Das Ammoniumsalz **62** wurde über eine Biogelsäule P2 in 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer gereinigt und stand damit für biologische Tests zur Verfügung.

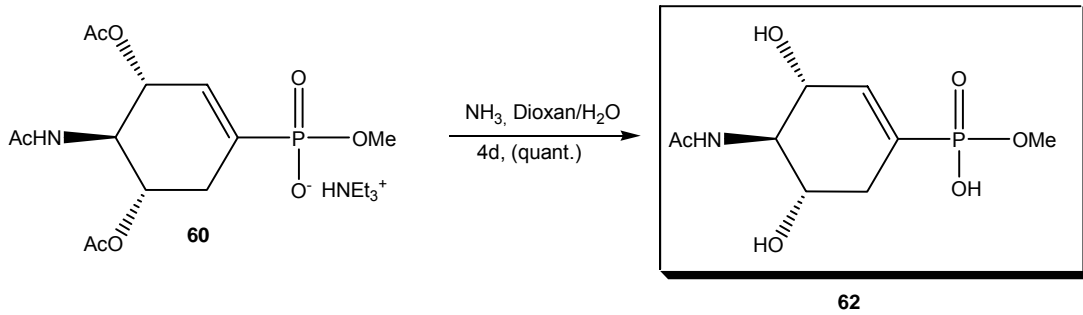


Abb. 3.2.1.9.: Entschützung von 60

3.2.2. Darstellung von 2,3- verknüpften Pseudo-Sialosiden

3.2.2.1. Retrosynthese für ein 2,3- verknüpftes Sialosid mit Ethylenspacer

Die Darstellung des gemischten Diesters sollte über eine Mitsunobu-Kondensation aus Baustein 41 und 61 möglich sein. Die Verseifung des Methylrests und die anschließende Entschützung sollten nach bereits beschriebener Methode erfolgen.

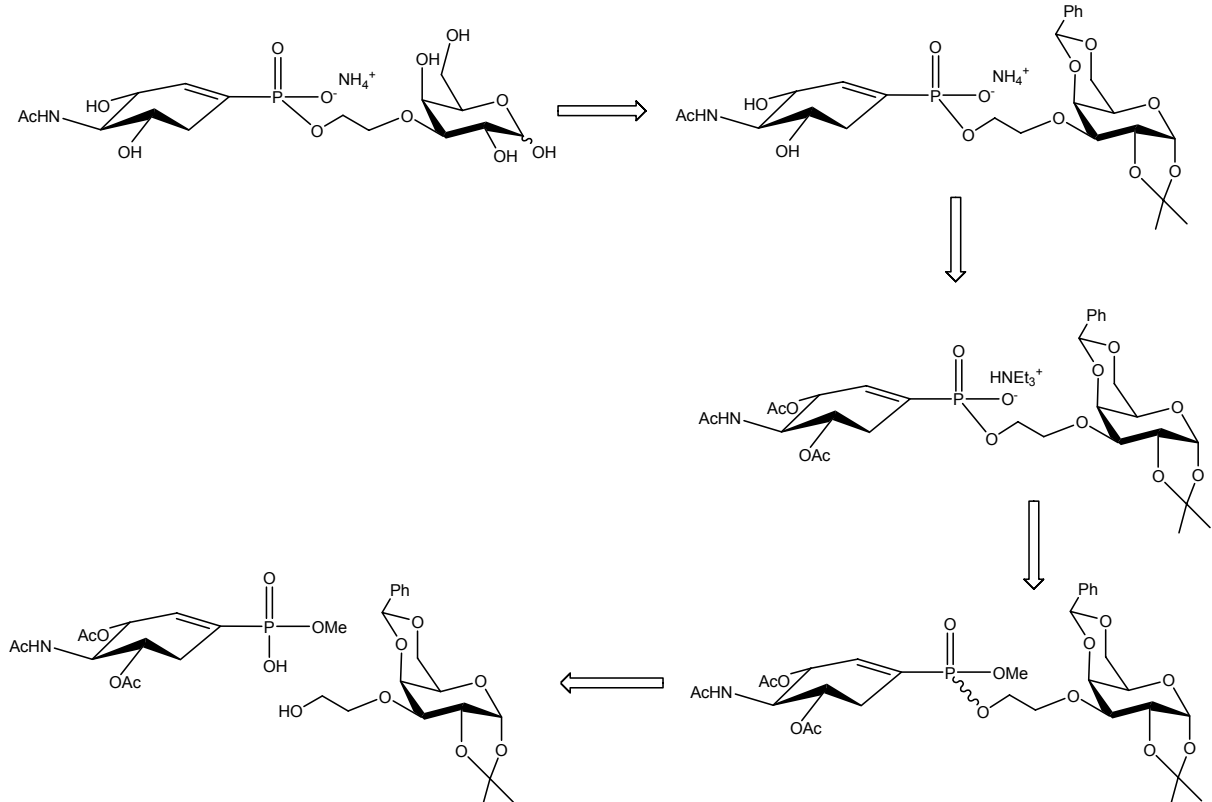


Abb. 3.2.2.1.: Retrosynthese für 2,3- verknüpftes Sialosid mit Ethylenspacer

3.2.2.2. Darstellung des gemischten Diesters via Mitsunobu-Kupplung

Die Bausteine **61** und **41** wurden mit 1.7 eq DIAD und Ph_3P in THF bei 60°C zu **63** umgesetzt.

Die Reaktionsbedingungen entsprachen denen in Vergleichsverbindung **44**.

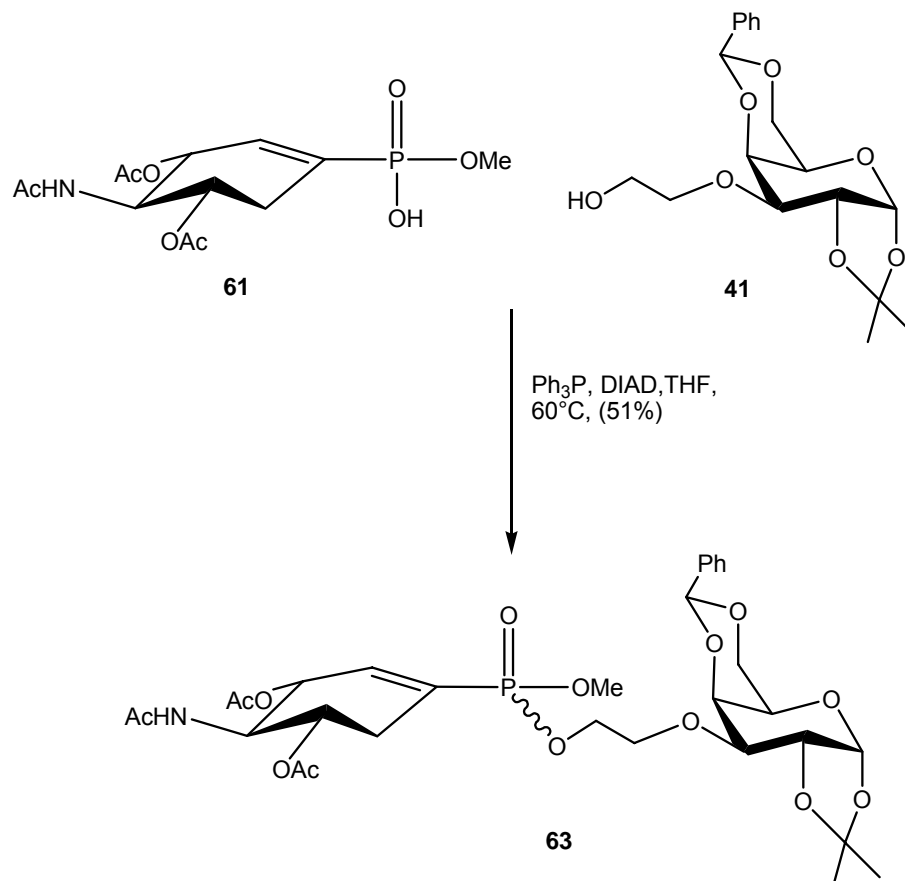


Abb. 3.2.2.2.: Veresterung zu **63**

3.2.2.3. Entschützung von **63**

Zuerst wurde mit Thiophenol der Methylester gespalten. Anschließend wurden von Verbindung **64** die Acetylgruppen in ammoniakalischer Methanollösung entfernt, und man erhielt Baustein **65**. Im letzten Schritt wurden in 50 %iger TFA die Isopropylidenacetale gespalten, und man erhielt das Anomerengemisch **66**. Die

Endreinigung dieses möglichen Inhibitors über ein Biogelsäule konnte hier aus labortechnischen Gründen nicht durchgeführt werden. Die Reinigung erfolgte in der Arbeitsgruppe Streicher an der Universität Sussex.

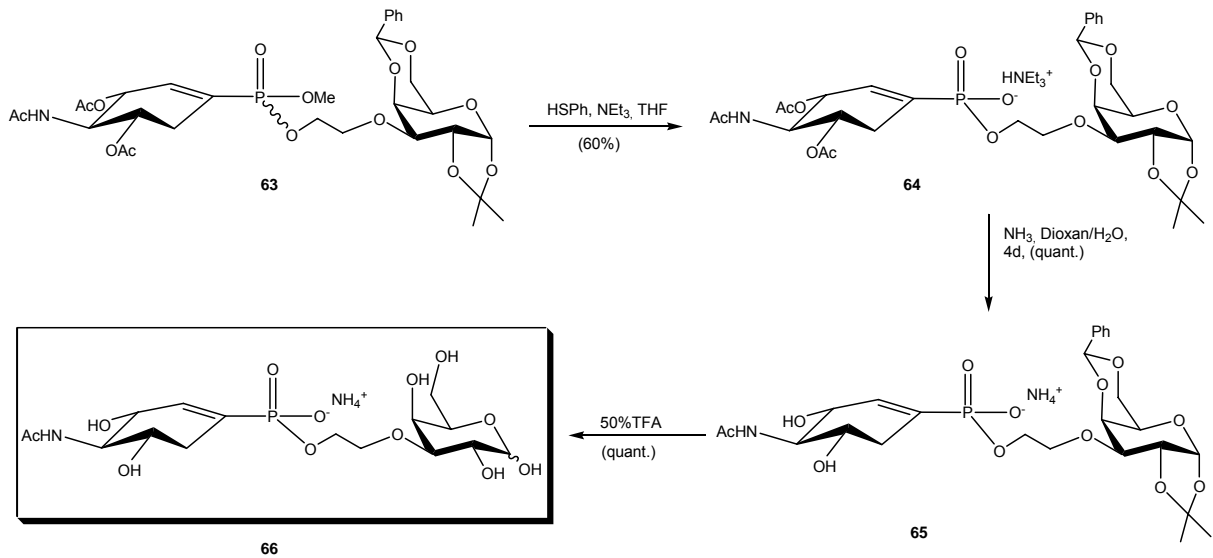


Abb. 3.2.2.3.: Entschützung zu Molekül 66

3.2.2.4. Versuch zur Darstellung eines 2,3- verknüpften Sialosids via Mitsunobu-Kupplung

Mitsunobu-Veresterungen sollten auch mit sekundären Alkoholen funktionieren. Daher wurde Cyclohexenphosphonat 61 mit Galaktosebaustein 32 unter Mitsunobu-Bedingungen umgesetzt. Es konnte trotz Variation der Reaktionsbedingungen kein Produkt nachgewiesen werden.

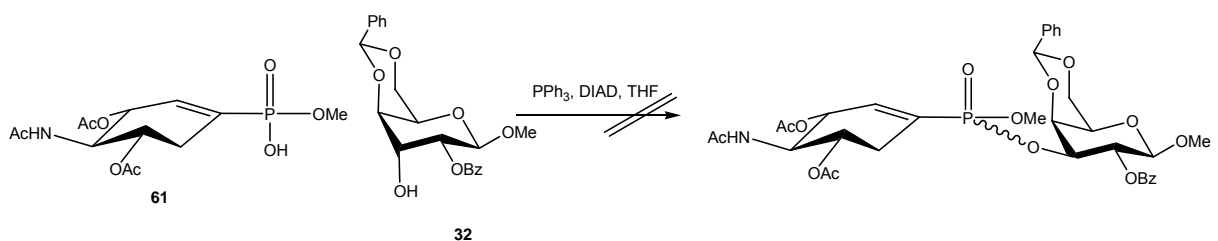


Abb. 3.2.2.4.: Versuch der Mitsunobu-Kondensation mit einem sekundären Alkohol

3.3. Darstellung von einfachen Aglyconmimetika

Zusätzlich zu den Cyclohexenphosphonaten wurden einfache Mimetika mit Methanphosphonsäure hergestellt. Diese sollen in biologischen Tests als Vergleichsubstanzen für die Pseudo-Sialoside mit dem Cyclohexenphosphonat dienen. Im Vergleich von beiden Substanzklassen könnte man anhand der Inhibition sehen, in wieweit das Cyclohexenphosphonat bei der Inhibition eine Rolle spielt.

3.3.1. Synthese eines 1,6- verknüpften Mimetikums

Hier wurde Baustein **19** unter Mitsunobu-Bedingungen mit Methanphosphonsäure **67** umgesetzt. Man erhielt in einer Ausbeute von 63 % Produkt **68**. Dieses wurde anschließend mit 50 %iger TFA zum Produkt **69** entschützt.

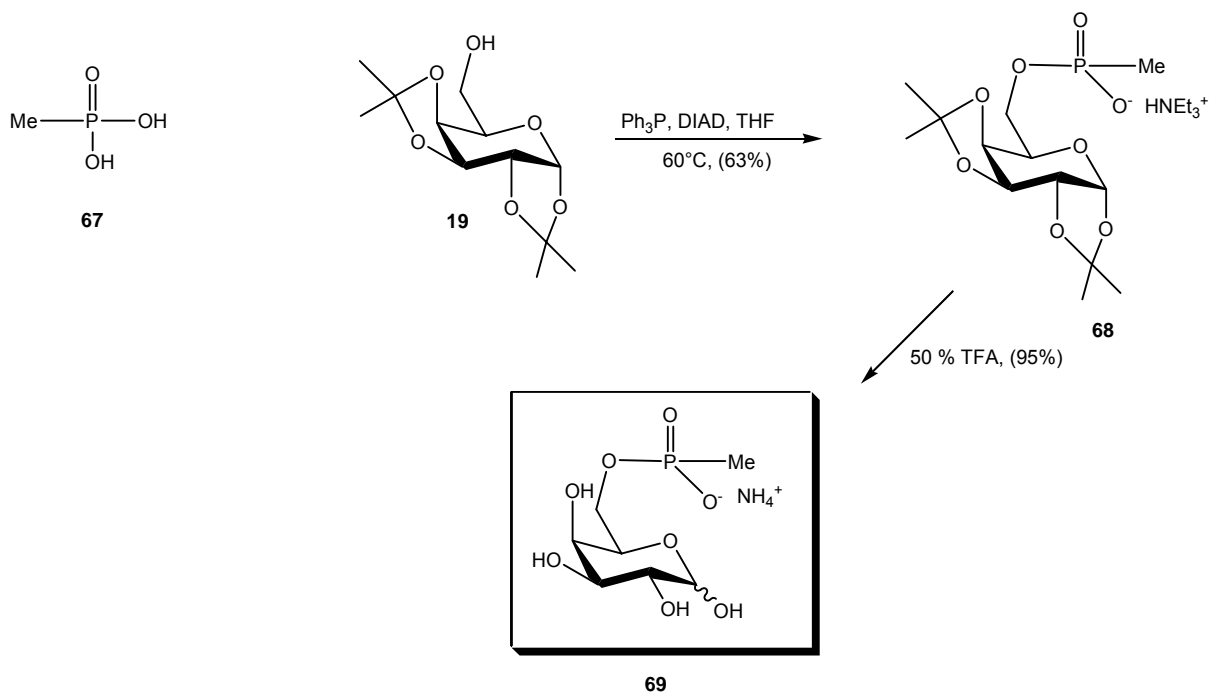


Abb. 3.3.1.: Darstellung von **69**

3.3.2. Synthese eines 2,3- verknüpften Mimetikums mit Ethylenspacer

Baustein **39** wurde mit Methanphosphonsäure **67** unter Mitsunobu-Bedingungen zu Vergleichsverbindung **70** umgesetzt und anschließend sauer zu **71** entschützt.

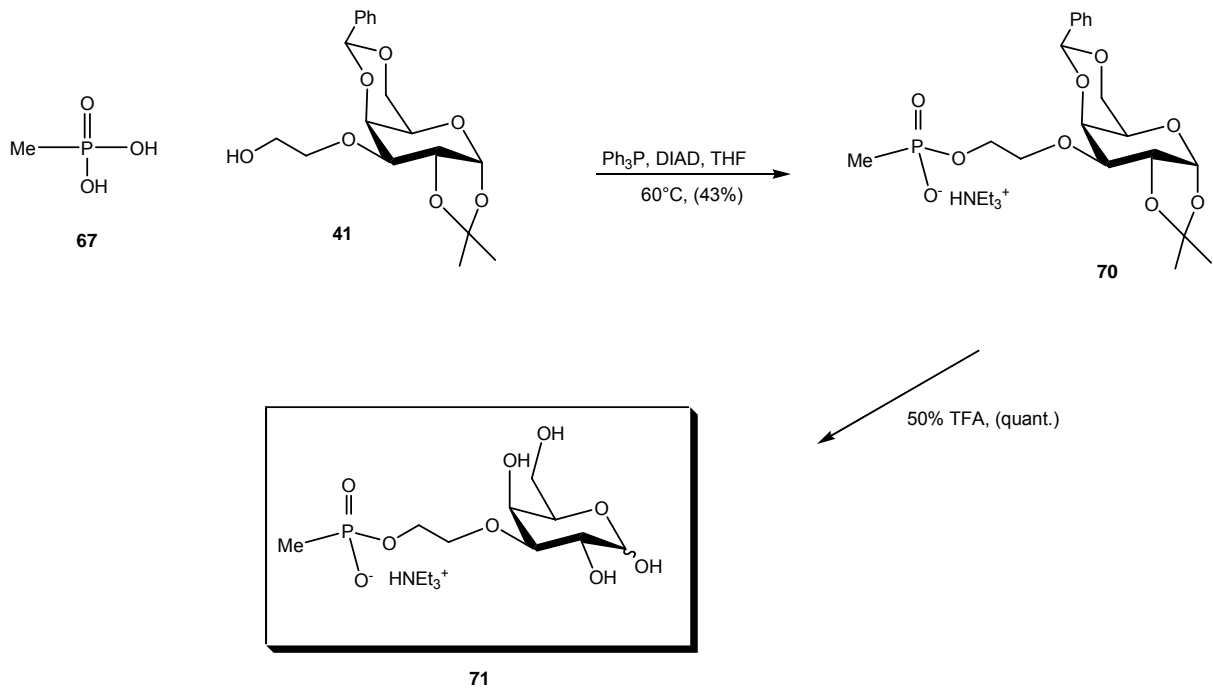


Abb. 3.3.2.: Synthese von Verbindung **71**

3.4. Synthese von laktose-basierten Pseudo-Sialosiden mit Diethylenglycolspacern

Laktosederivate mit Ethylenglycolspacern an verschiedenen Positionen sollten synthetisiert und auf den Cyclohexenphosphonatmonoester übertragen werden.

Mögliche Bausteine, wie in Abb 3.4. zu sehen, sollten über eine Etherbrücke aus einem substituierten Diethylenglycol und einem Laktosederivat synthetisiert werden.

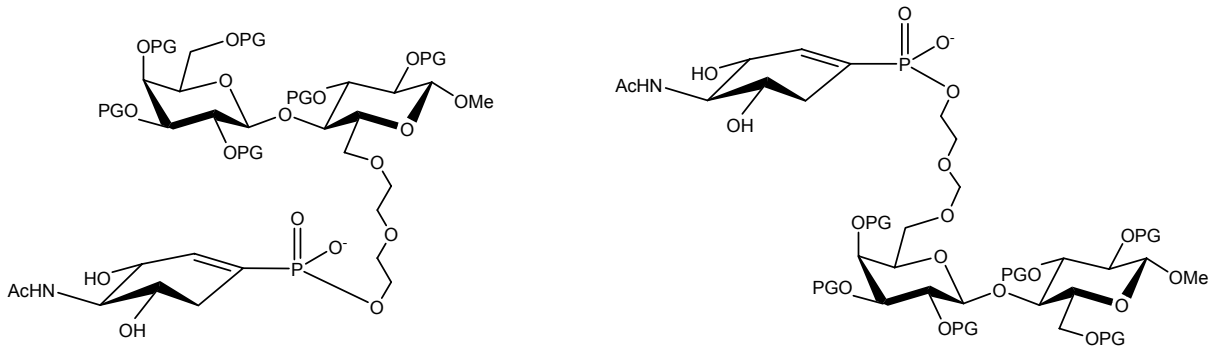


Abb. 3.4.: Mögliche Zielstrukturen

3.4.1. Retrosynthese des Laktosebausteins für ein 1,6-Glc-verknüpftes Laktoseanalogon

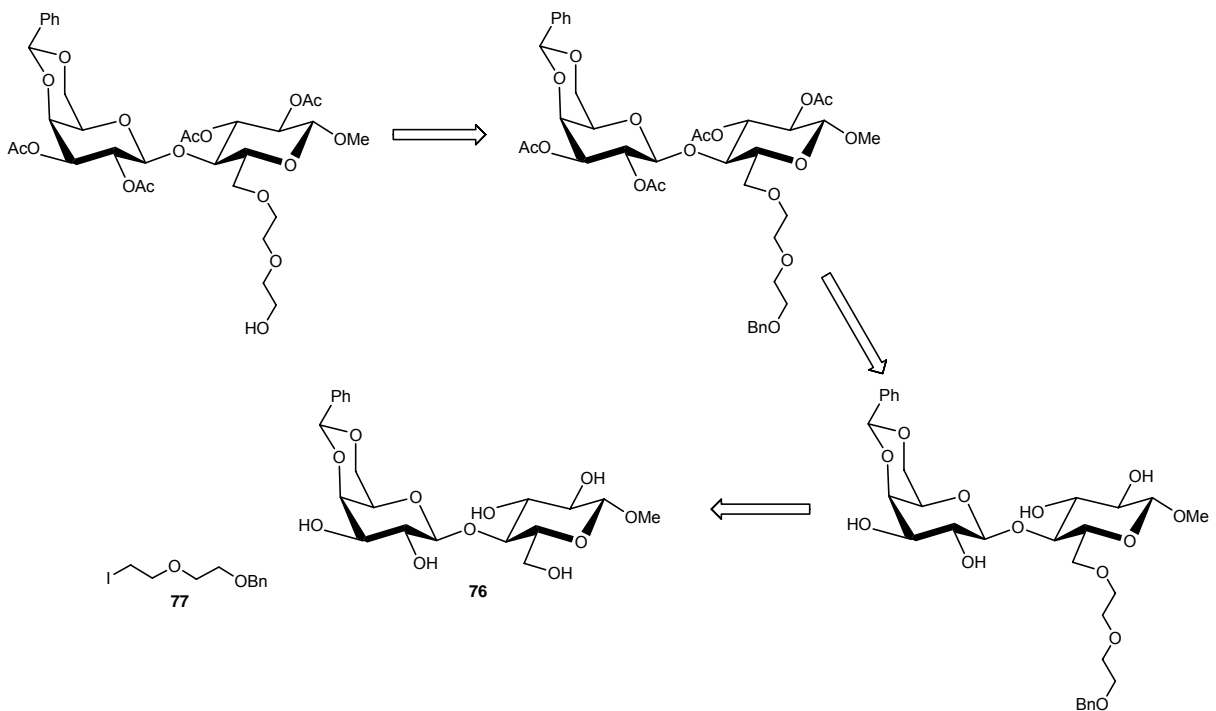


Abb. 3.4.1.: Retrosynthese zu einem Laktosederivat

Die Einführung des Diethylenglycolspacers an der Position 6 des literaturbekannten Bausteins **76**^[85] sollte über eine Substitution möglich sein. Anschließend müsste der Zucker noch mit Acetylgruppen geschützt werden. Das würde eine kurze Synthese zum gewünschten Zuckerbaustein darstellen. Die Schutzgruppen könnten am Ende unter bekannten Bedingungen abgespalten werden.

3.4.1.1. Syntheseversuch zur Darstellung des Laktosebausteins für ein 1,6-Glc verknüpftes Laktoseanalogon

Linker **77** wurde über drei Stufen wie bei *Collie*^[86] beschrieben hergestellt. Verbindung **76** wurde ausgehend von Laktose **72** hergestellt. Zuerst wurde die Bromoacetyllaktose **73** synthetisiert, welche dann unter Koenigs-Knorr-Bedingungen zur β -Methyl-Laktose **74** umgesetzt wurde. Deacetylierung unter Zemplen-Bedingungen lieferte Baustein **75**, welcher anschließend zu **76** nach Literatur umgesetzt wurde.^[85]

Die Umsetzung von **77** mit Zuckerbaustein **76** in abs. DMF und NaH als Base gelang nicht. Man erhielt etwas Eliminierungsprodukt des Linkerbausteins und den Zucker quantitativ zurück. Offensichtlich wirkten hier die sekundären OH-Gruppen als Basen und führten so zur Eliminierung.

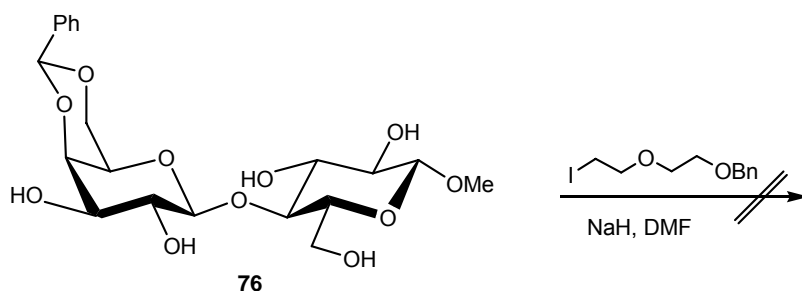


Abb. 3.4.1.1.1.: Versuch zur Umsetzung von **76**

Eine weitere Möglichkeit der Veretherung von Ethylenglycollinkern mit ungeschützten Zuckern ist die Reaktion in einem Gemisch aus THF und KOH in Gegenwart eines Phasentransferkatalysators wie TBAHS durchzuführen. Diese Methode ist bei *Miethchen et al.*^[87] beschrieben und führte dort zu guten Ausbeuten.

Der Umsatz von **76** mit **77** unter diesen Bedingungen gelang jedoch ebenfalls nicht.

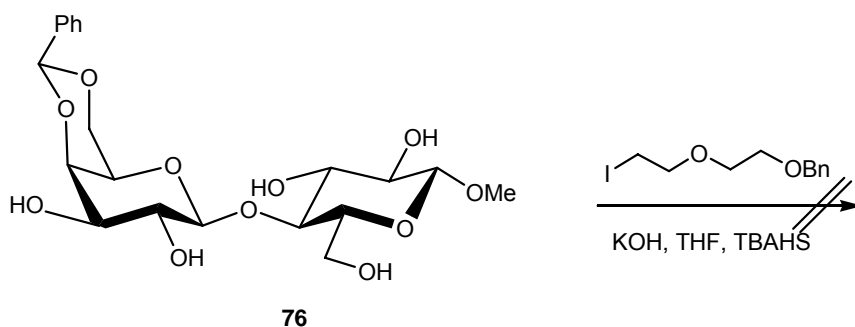


Abb. 3.4.1.1.2.: Versuch der Umsetzung nach *Miethchen*

Es musste nach einem anderen Syntheseweg gesucht werden. Daher sollte die Veretherung an geschützten Laktosederivaten untersucht werden. Das bedeutete zwar am Ende ein Umschützen des Bausteins über drei Stufen, aber es stellte eine gute Alternative dar.

3.4.2. Alternative Retrosynthese für einen Laktosebaustein

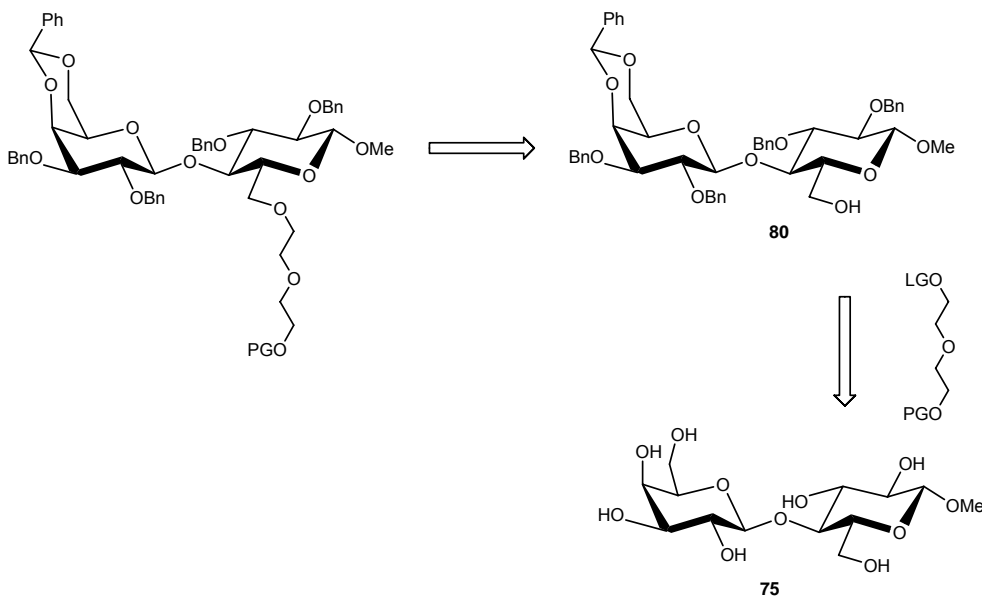


Abb. 3.4.2.: Retrosynthese

Der Veretherung des literaturbekannten Bausteins **80**^[85] sollte mit verschiedenen Diethylenglycollinkern getestet werden. Anschließend müsste über drei Stufen das Zielmolekül hergestellt werden.

3.4.2.1. Synthese des geschützten Laktosebausteins 80

Baustein **80** wurde ausgehend von β -Methylgalactose **75** synthetisiert. Zuerst wurde ein 4,6-Benzylidenacetal eingeführt (**76**). Anschließend wurde die 6-OH-Gruppe mit einem Silylether geschützt zu **78**. Es folgte die Benzylierung der verbleibenden OH-Gruppen (**79**) mit anschließender Abspaltung der TBDMS-Gruppe zu Verbindung **80**.

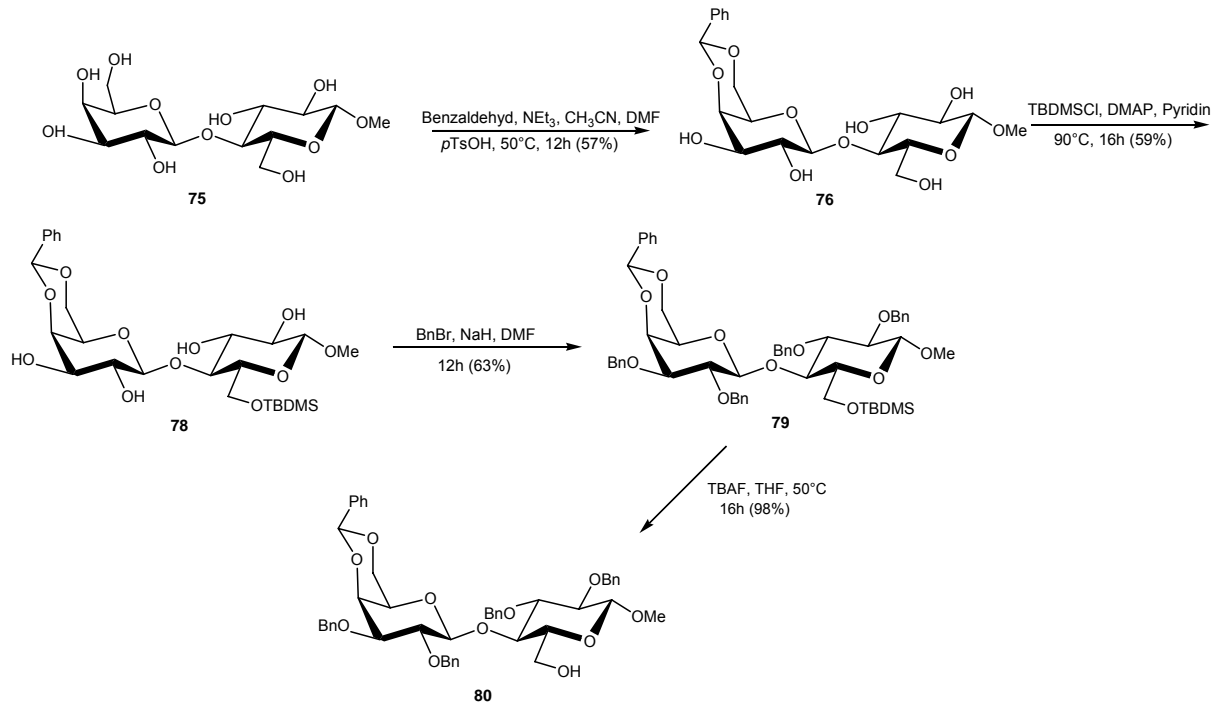


Abb.3.4.2.1.1.: Synthese von 80

3.4.2.2. Synthese der Linker

Für den Diethylenglycollinker wurden verschiedene Abgangsgruppen getestet. Als Schutzgruppe für die zweite Hydroxygruppe wurde TBDMS verwendet.

In der nachfolgenden Abbildung sind die verschiedenen Diethylenglycolderivate aufgelistet.

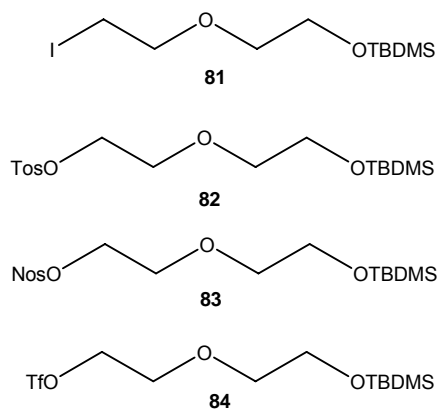


Abb. 3.4.2.2.: Linkerbausteine

3.4.2.3. Verknüpfung der Linker mit dem Laktosebaustein

Die Reaktion von **80** mit **81** in DMF mit NaH als Base führte in 70 % Ausbeute zum TBDMS-geschützten Laktosebaustein **79**.

Offensichtlich ist die Wanderung der TBDMS-Schutzgruppe schneller als die Substitution des Iodids.

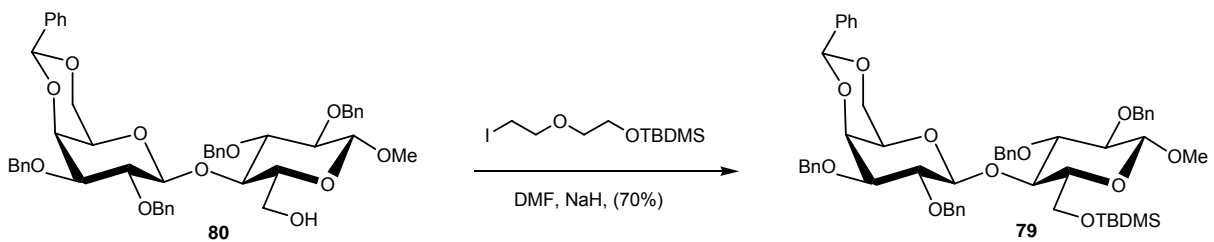


Abb. 3.4.2.3.1.: Umsetzung von **80** mit **81**

Es wurde daher im nächsten Versuch eine andere Abgangsgruppe, das Tosylat **82**, gewählt. Hier konnte bei gleichen Reaktionsbedingungen das gewünschte Produkt **85** gefunden werden. Allerdings konnten trotz mehrmaliger Wiederholung dieses Experiments keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden.

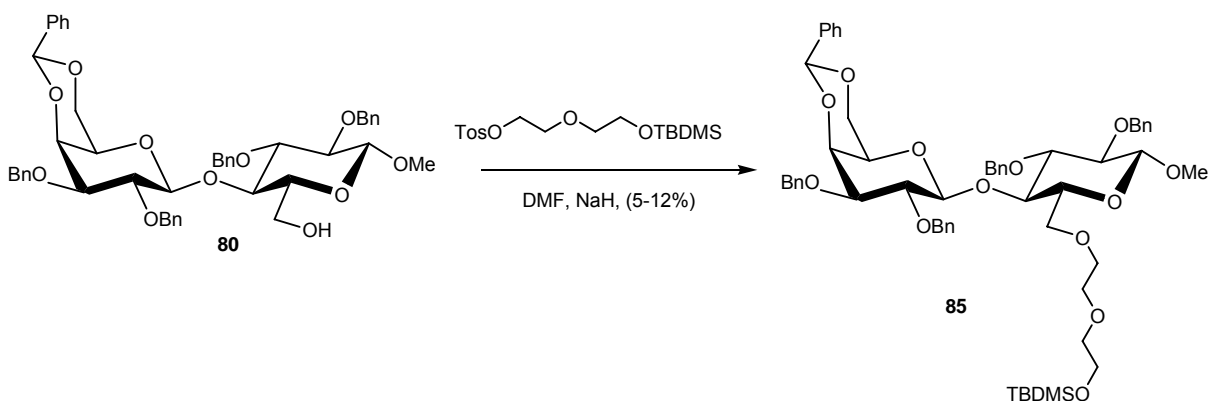


Abb. 3.4.2.3.2.: Darstellung von **85**

In der Literatur werden Nosylate ebenfalls als gute Abgangsgruppen beschrieben.^[88] Daher wurde **80** mit **83** in DMF und NaH als Base umgesetzt. Allerdings konnte hier kein Produkt nachgewiesen werden.

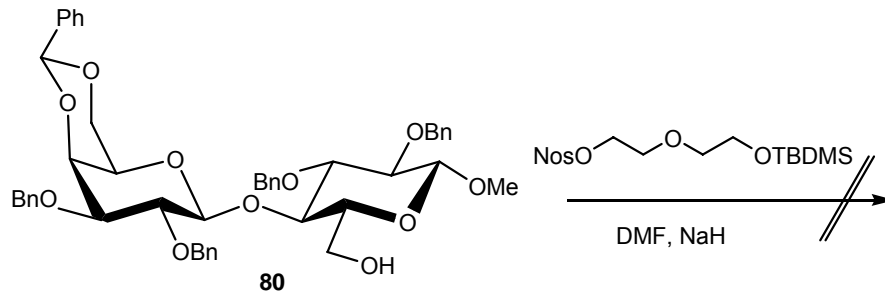


Abb. 3.4.2.3.3.: Umsetzung von **80** mit **83**

Abschließend wurde das Triflat **84** hergestellt. Dieses war so reaktiv, dass es sofort eliminierte. Auch die Variation der Reaktionsbedingungen (Triflat zur Laktose geben, oder Laktose zum *in situ* hergestellten Triflat) führte zu keiner Umsetzung zum gewünschten Produkt.

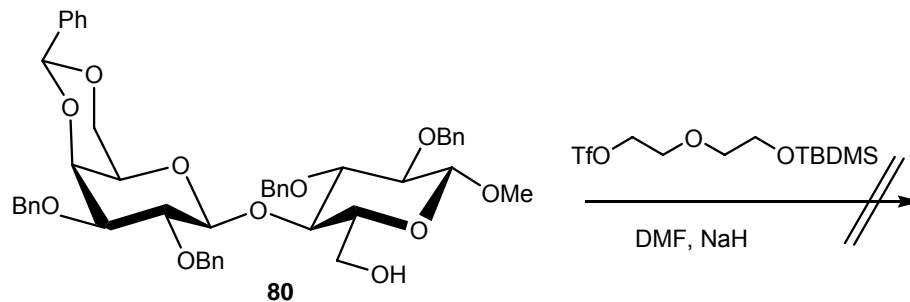


Abb. 3.4.2.3.4.: Versuch zur Umsetzung mit einem Triflat

Da die einzige Möglichkeit der Darstellung von **85** in nicht reproduzierbaren Ausbeuten verlief, wurde beschlossen, die Reaktivität der Reaktion umzukehren.

3.4.2.4. Alternative Verknüpfung von Linker und Laktosebaustein

Prinzipiell kann man auch das Triflat am Zucker einführen und dann mit einem Diethylenglycolderivat umsetzen. Dafür wurde Diethylenglygolspacer **87** hergestellt. Als Schutzgruppe wurde diesmal TIPS verwendet, da dieser Silylether weniger zum Wandern neigt.

Hierfür wurde der Laktosebaustein **80** zum Triflat **86** unter Standardbedingungen umgesetzt. Allerdings war dieses Triflat nicht sehr stabil und musste daher ohne

weitere Reinigung direkt zum Linker **87** gegeben werden. Es konnten zwei Produkte isoliert werden: Das Eliminierungsprodukt und das gewünschte Produkt **88**. Die Trennung dieser zwei Produkte erfolgte erst über eine Kieselgelsäule und anschließend über eine RP-Säule mit Acetonitril/Wasser. Diese Trennung ging sehr zu lasten der Ausbeute. Insgesamt erhielt man Produkt **88** in 5 % Ausbeute über zwei Stufen.

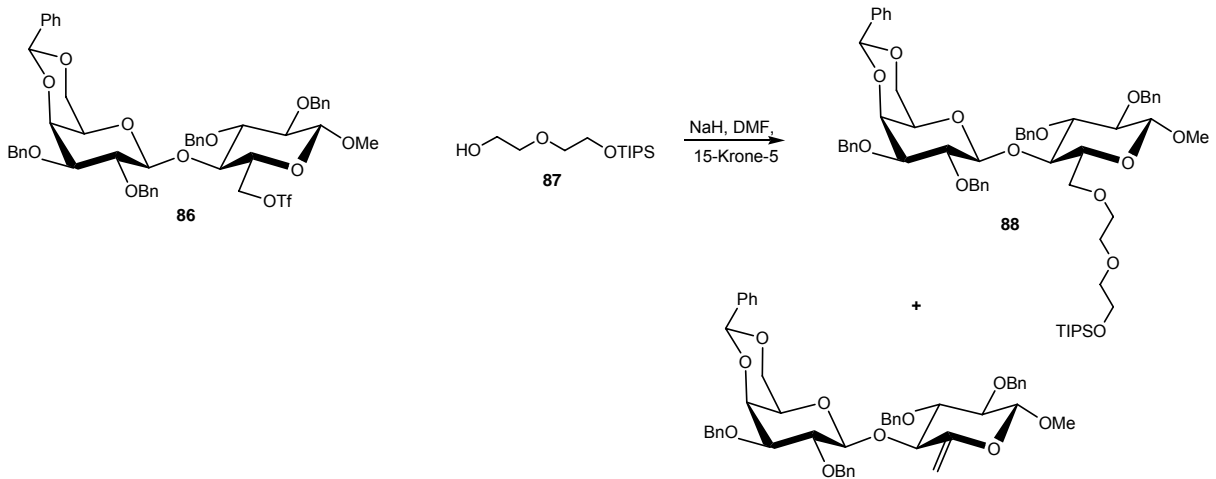


Abb. 3.4.2.4.: Darstellung von **88**

3.4.3. Darstellung eines Laktosebausteins für ein 1,6- Gal- verknüpftes Laktoseanalogon

3.4.3.1. Retrosynthese für den Laktosebaustein

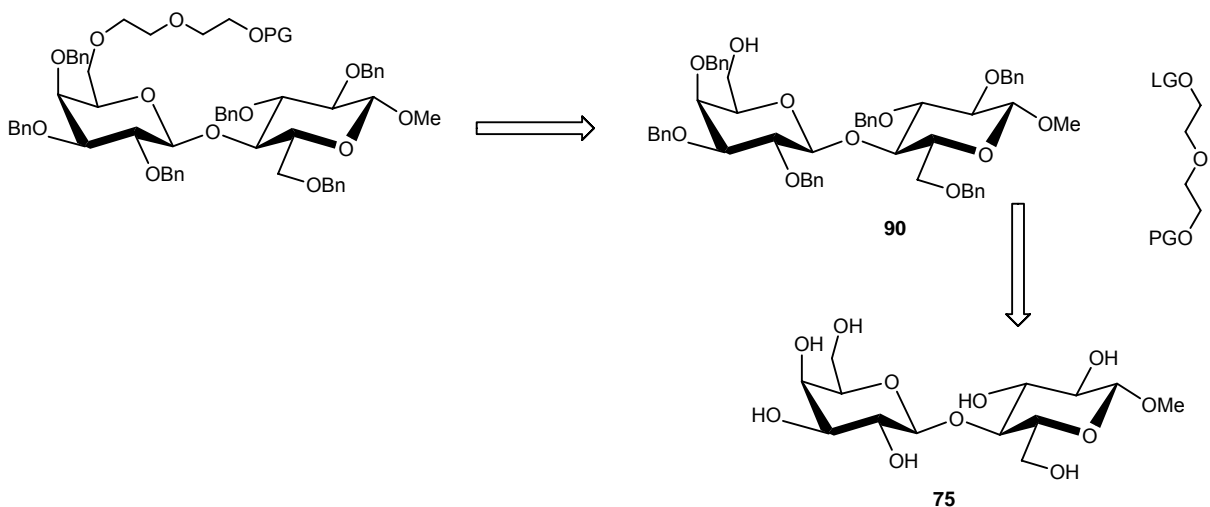


Abb. 3.4.3.1.: Retrosynthese für **90**

Ausgehend von Laktosebaustein **75** sollte über drei Stufen Baustein **90** synthetisiert werden.

Die Verknüpfung würde über eine Veretherung mit verschiedenen Linkern erfolgen.

3.4.3.1.1. Synthese von **90**

Ausgehend von Verbindung **75** wurde zuerst Baustein **76** hergestellt, der anschließend mit Benzylbromid und NaH als Base in DMF zu **89** benzyliert wurde. Die selektive Öffnung des Benzylidenacetals mit Boran lieferte die 6-OH-freie Verbindung **90**.

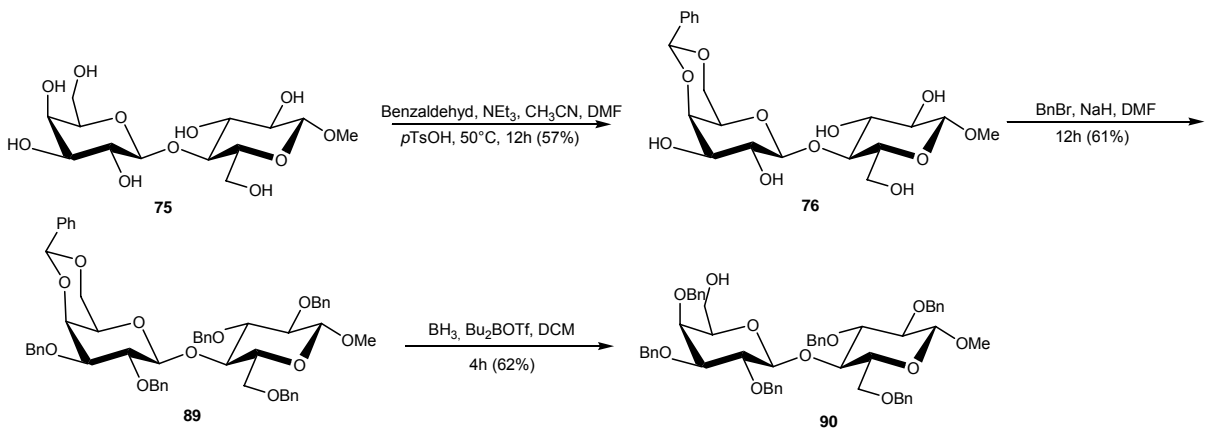


Abb. 3.4.3.1.1.: Darstellung von **90**

3.4.3.2. Versuche zur Verknüpfung des Linkers mit dem Laktosebaustein

Auch hier wurden zuerst versucht, verschiedene Linker mit **90** in DMF und NaH als Base umzusetzen. Diese Reaktionen gelangen nicht.

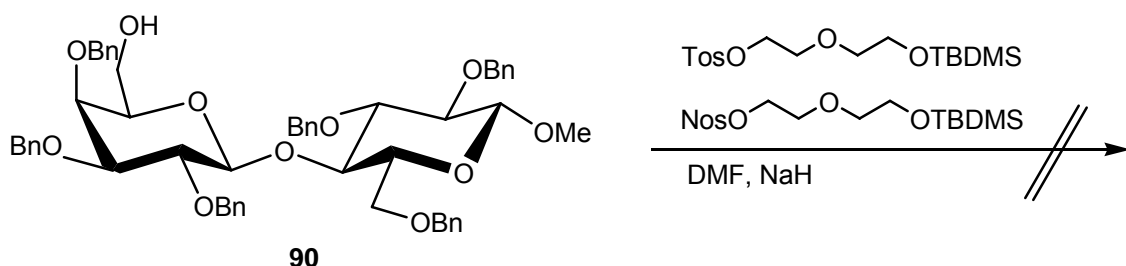


Abb. 3.4.3.2.1.: Versuche zur Linkerverknüpfung

Auf die Umsetzung von Triflat **84** und Iodid **81** wurde wegen der schlechten Ergebnisse aus den vorangegangenen Reaktionen verzichtet.

Die Überführung des Laktosebausteins **90** in ein Triflat lieferte ein unerwünschtes Nebenprodukt. Man kann annehmen, dass das Triflat so instabil ist, dass es noch *in situ* mit der benachbarten Benzylgruppe reagiert. Somit war eine Darstellung wie bei Laktoseverbindung **88** nicht möglich.

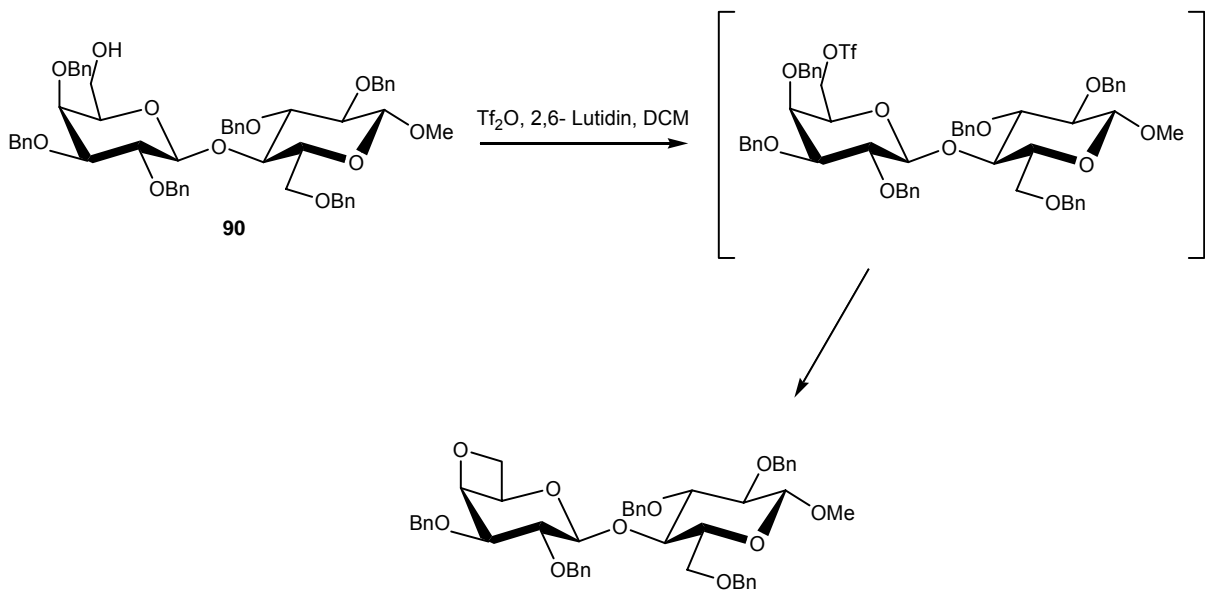


Abb. 3.4.3..2.2.: Syntheserversuch zur Darstellung eines Triflats

3.4.4. Retrosynthese für ein einfaches Laktoseanalogon

Da die Herstellung von Baustein **88** mit sehr schlechten Ausbeuten verlief und diese auch nicht gesteigert werden konnten, wurde das einfache Mimetikum mit Methanphosphonsäure hergestellt.

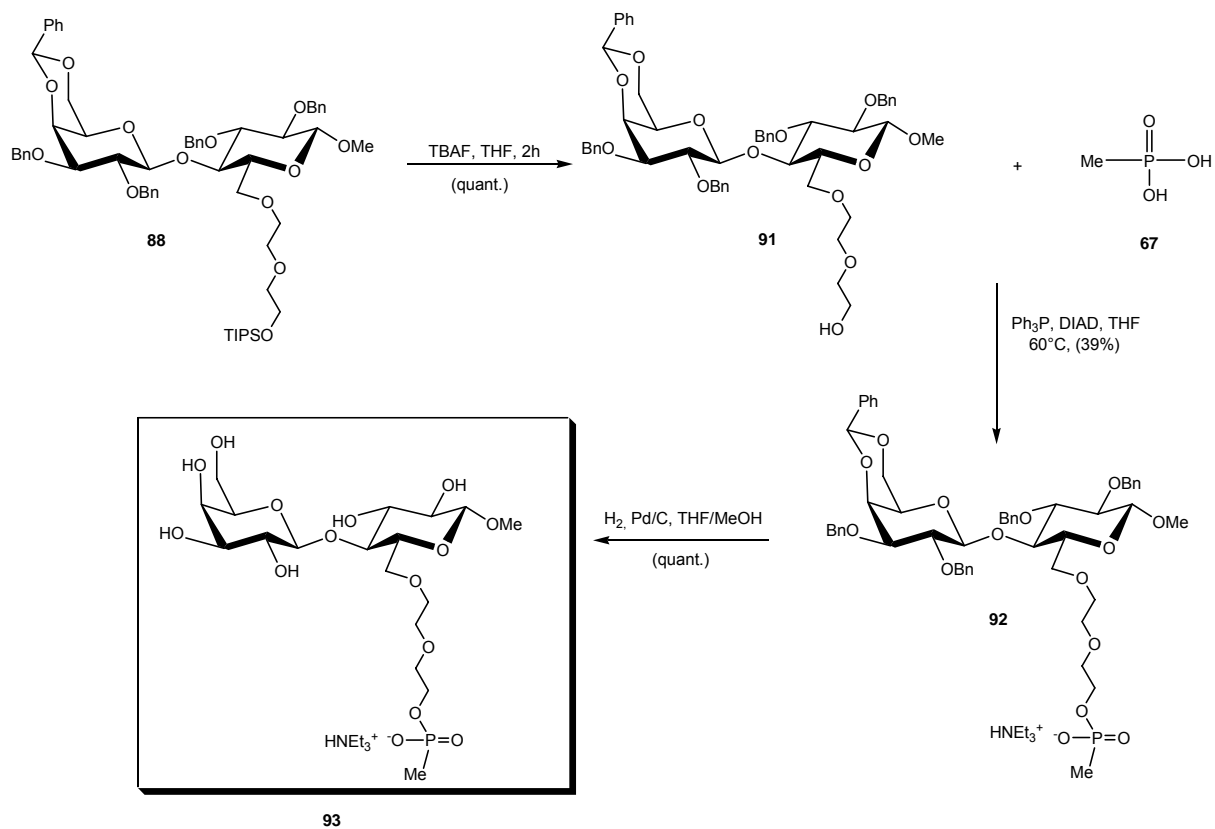


Abb. 3.4.4.1.: Darstellung von **93**

3.5. Inhibitionsstudien

3.5.1. Inhibitionstest mit bakteriellen Sialidasen

Die Targetmoleküle **17**, **23** und **26** wurden nach *Schauer et. al.*^[89] an verschiedenen bakteriellen Sialidasen getestet.

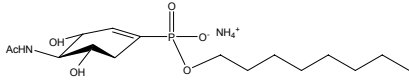
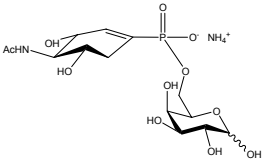
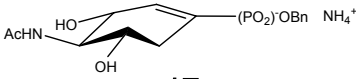
Es zeigt sich, dass die Sialidase von *C. perfringens* im getesteten Bereich von allen drei Inhibitoren überhaupt nicht inhibiert wird. Dieses Ergebnis ist etwas überraschend, da aus früheren Versuchen bekannt ist, dass diese Sialidase von der freien Cyclohexenphosphonsäure mit der gleichen Orientierung der Doppelbindung inhibiert wurde.

Die Sialidase von *V. cholerae* wird von allen drei Inhibitoren gehemmt. Dabei zeigt sich, dass **26** mit dem langen unpolaren Oktylrest offensichtlich etwas zu gross ist, um sich gut ins katalytische Zentrum einzufügen. Der Inhibitor **23** hingegen hemmt mit einem IC₅₀-Wert von 0.8 mM etwas besser. Der Benzylester **17** zeigt die beste Inhibition von 0.5 mM.

Die Sialidase von *S. typhimurium* wird von **23** und **26** gleichermaßen gut inhibiert. Der Inhibitor **17** zeigt eine sehr gute Inhibition mit einem IC₅₀-Wert von 0.09 mM. Damit ist die bisher beste Inhibition aus dem Bereich der Cyclohexenphosphonate erreicht worden. Dieses Ergebnis ist doch sehr erstaunlich, da man theoretisch damit gerechnet hatte, dass die Galaktoseverbindung **23** dem natürlichen Substrat sehr ähnlich sein und damit eine bessere Inhibition zeigen sollte. Inwieweit hier sterische oder elektronische Effekte eine Rolle spielen, kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht gesagt werden.

Tabelle 3.5.1. fasst die Ergebnisse zusammen.

Tab. 3.5.1.: Übersicht über alle getesteten Moleküle

	<i>C. perfringens</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>S. typhimurium</i>
 <p style="text-align: center;">26</p>	k.l.	3mM	0.2 mM
 <p style="text-align: center;">23</p>	k.l.	0.8 mM	0.2 mM
 <p style="text-align: center;">17</p>	k.l.	0.5 mM	0.09 mM

3.5.2. Vergleich mit bekannten Inhibitoren

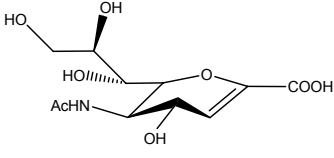

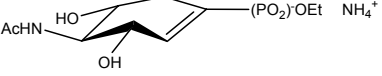
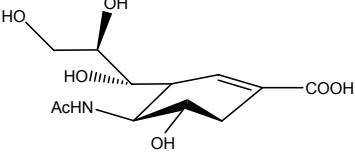
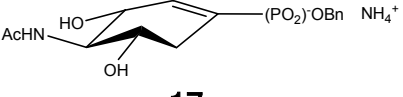
Wie man im Vergleich mit dem bekannten Inhibitor DANA (A) sehen kann, zeigen alle getesteten neuen Moleküle die gleiche, wenn nicht eine bessere Inhibition mit Ausnahme von *C. perfringens*.

Die freie Cyclohexenphosphonsäure (B) dagegen hemmt auch diese Sialidase, allerdings in nur moderater Weise.

Der Vergleich mit dem Monoethylester aus der D-Xyloserie (C) zeigt, dass die getesteten Moleküle die Sialidasen von *V. cholerae* und *S. typhimurium* gleich gut oder besser inhibieren, allerdings mit einer deutlich höheren Selektivität. So wird die Sialidase von *C. perfringens* überhaupt nicht inhibiert.

Monoester 17 zeigt im Vergleich mit der Isocarba-DANA,^[90] (D) dem besten bekannten Inhibitor für *S. typhimurium*, eine Inhibition im gleichen Bereich und stellt somit eine interessante neue Molekülklasse für Inhibitoren der *S. typhimurium* dar.

Tab. 3.5.2.: Vergleich mit bekannten Inhibitoren

	<i>C. perfringens</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>S. typhimurium</i>
 <p style="text-align: center;">A</p>	0.04 mM	3 mM	0.4 mM
 <p style="text-align: center;">B</p>	2 mM	3 mM	0.3 mM
 <p style="text-align: center;">C</p>	0.6 mM	3 mM	0.3 mM
 <p style="text-align: center;">D</p>	Nicht getestet	Nicht getestet	0.04 mM
 <p style="text-align: center;">17</p>	K.I.	0.5 mM	0.09 mM

3.6. Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl die Röntgenstruktur der TcTS seit kurzem bekannt ist, gibt es keine neu synthetisierten Inhibitoren für diese Sialidase. Bekannte Inhibitoren für virale Neuraminidasen sind für bakterielle Sialidasen oft ungeeignet. Mit dieser Arbeit wurden neue, auf Cyclohexenphosphonaten basierende Inhibitoren entwickelt. Hierbei wurden erstmals Cyclohexenphosphonate mit verschiedenen Aglyconen synthetisiert.

Nach dem Prinzip der „Mixed-Diesterstrategie“ wurden Akzeptor-Substratanaloga, sogenannte Pseudo-Disaccharide, synthetisiert.

Es wurden zwei Synthesewege für eine „Mixed-Diester-Strategie“ entwickelt.

Im Falle der Benzylesterstrategie konnte man ausgehend von L-Xylose ein Cyclohexenphosphonat aufbauen, welches über eine einfache Alkylierung mit verschiedenen polaren und unpolaren Aglyconen zu gemischten Diestern umgesetzt wurde.

Theoretischer Teil

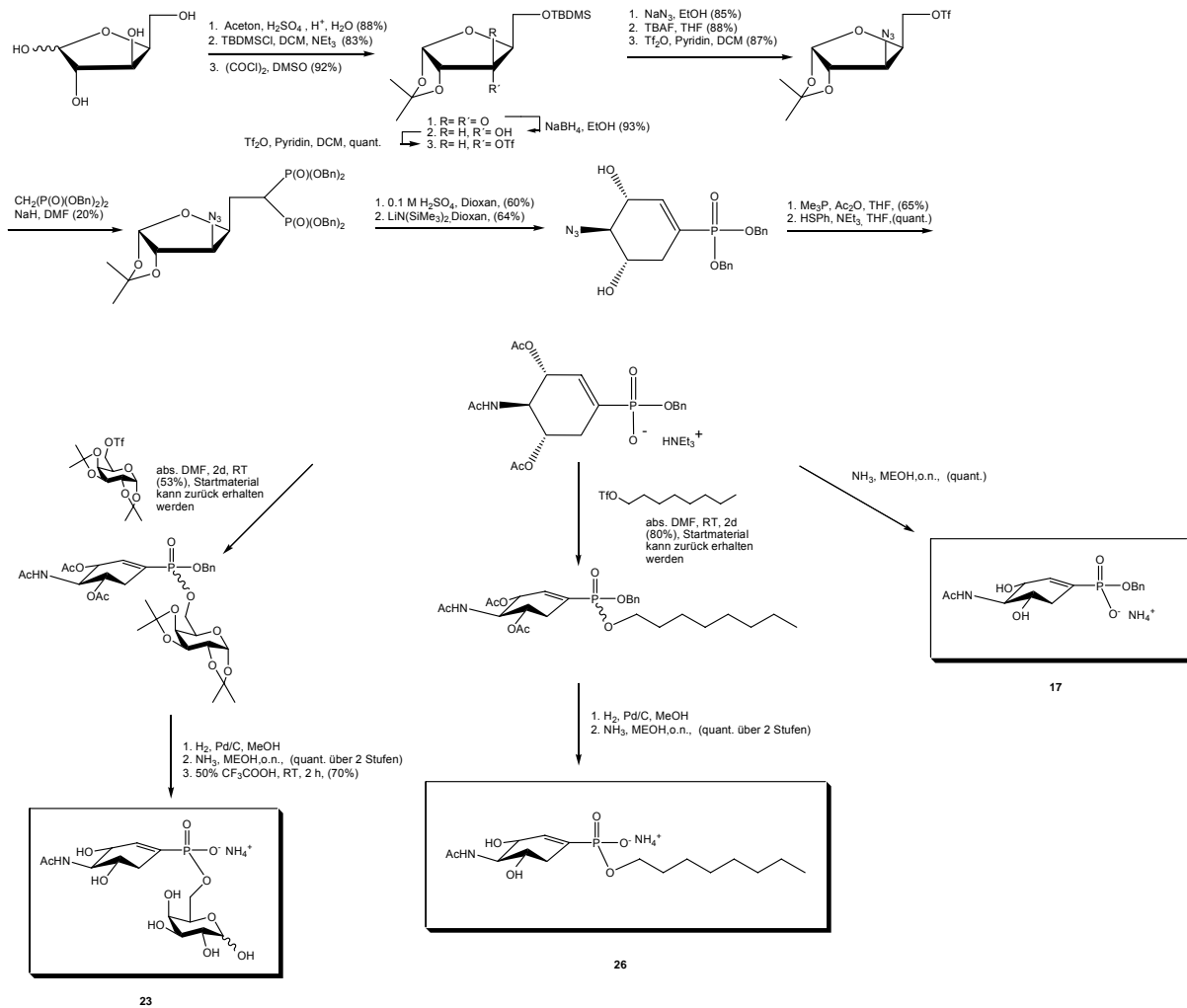


Abb. 3.6. 1.: Übersicht zur Benzylester-Strategie

Dieser Syntheseweg führte zu den drei neuen Inhibitoren **17**, **23** und **26**, welche in ersten Tests an verschiedenen Sialidasen gute Inhibitionswerte zeigten.^[50]

Ein limitierender Faktor an dieser Synthesestrategie war jedoch die Darstellung des Dibenzylesters. Bei dieser Reaktion gab es viele Nebenreaktionen, die nicht zuletzt auch durch das Azid bedingt waren. Die Ausbeute dieser Reaktion lag somit bei 20 %.

Auch der Alkylierungsreaktion waren Grenzen gesetzt. Nicht jedes Triflat war für diese Reaktion geeignet. Syntheseveruche mit sehr instabilen Triflaten haben gezeigt, dass hier die Eliminierung schneller abläuft als die Alkylierung. Auch sekundäre Triflate waren offensichtlich nicht geeignet. Hier fand überhaupt kein Umsatz statt.

Aus diesem Grund wurde ein weiterer Syntheseweg, die Methylester-Strategie, entwickelt. Ziel dieser Syntheseroute war, die Darstellung des Diesters zu verbessern, indem man die Azideinführung erst nach der Zyklisierung durchführte. Damit konnte dieses Syntheseproblem aus der Benzylesterstrategie einfach gelöst werden. Die Synthese des Diesters lieferte eine Ausbeute von 60 %, d.h., man konnte mit der Änderung von Benzyl- auf Methyl und der späteren Azideinführung die Ausbeute dieser Reaktion auf das dreifache steigern. Für die Veresterung wurde diesmal die Mitsunobu-Reaktion gewählt. Diese Methode ist sowohl für primäre als auch sekundäre Alkohole geeignet. Sie funktionierte mit dem Methylmonoester in recht guten Ausbeuten von 50-65 %. Damit konnten zwei weitere potenzielle Inhibitoren **62** und **66** dargestellt werden. Die biologischen Tests für diese Moleküle stehen noch aus.

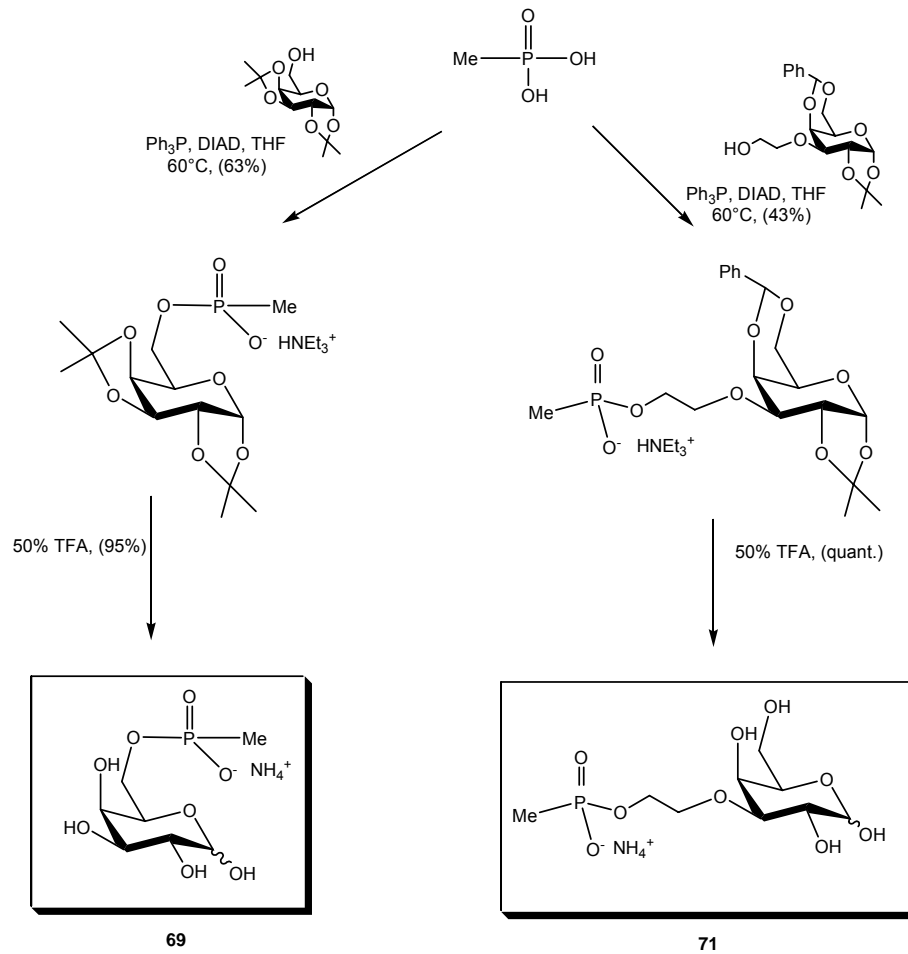
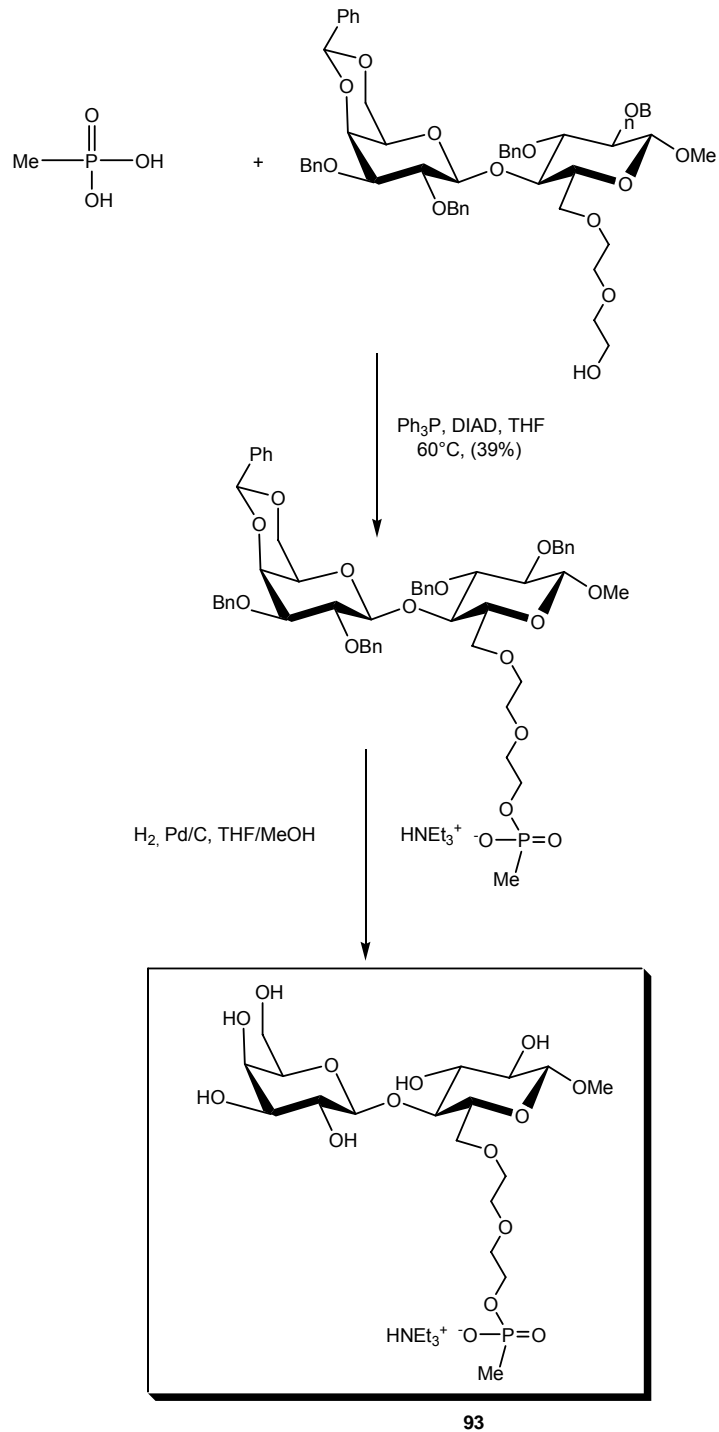


Abb. 3.6.3.: Überblick über einfache Mimetika

Die Verbindungen **69** und **71** können als Vergleichsmoleküle in späteren Sialidasetests herangezogen werden.

Diese Synthese konnte auch auf Laktosebausteine angewendet werden, auf diese Weise wurde **93** erhalten.



93

Abb. 3.6.4.: Überblick über das Laktosemimetikum

Die Übertragung der Laktosebausteine auf den Monoester steht noch aus. Jedoch sollte dies kein Problem darstellen, da der Laktosebaustein nach bekannten Vorschriften lediglich umgeschützt werden muss. Die Veresterung nach Mitsunobu wurde etabliert und sollte nach der hier beschriebenen Vorschrift durchgeführt werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass verschiedene neue pseudo-disaccharidische

Sialylmimetika, welche als "lead compounds" für neue anti-mikrobielle Wirkstoffe dienen könnten, hergestellt wurden. Für diese Sialylmimetika wurden zwei Synthesestrategien entwickelt. Damit wurde ein neuer Strukturraum zur Inhibition Sialinsäure-metabolisierender Enzyme erschlossen. Erste Tests an verschiedenen Sialidasen zeigten gute Inhibitionswerte. Daher ist es denkbar, dass solche Verbindungen zu Pharmaka weiterentwickelt werden können.

4. Experimental Part

4.1. General Methods

Reactions sensitive to air or moisture were carried out under an inert atmosphere of argon. Solvents for chromatography were distilled prior to use. Chemicals and dry solvents were either purchased purris. p.a. from commercial suppliers or prepared and purified as described: Dichloromethane, pyridine and triethylamine were refluxed over calcium hydride for 6 hours and distilled.

Methanol was stirred with magnesium turnings over night and then refluxed for 6 hours and distilled. Tetrahydrofuran was stirred over potassium hydroxide for two days, refluxed over sodium sand until added benzophenone turned the solution blue, and distilled.

Hydrogenations were carried out at ambient pressure.

Optical rotations were determined using a Perkin-Elmer Polarimeter 241MC (1 dm cell, temperature 21°C, $\lambda = 589$ nm).

Chromatography

For analytical thin layer chromatography (TLC) silica plastic plates Merck 60 F₂₅₄ were used. The compounds were visualized by UV light (254 nm) and/or by staining with one of the following reagent solutions followed by heating:

- ammonium molybdate solution: 20 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4 H₂O, 400 mg Ce(SO₄)₂ in 400 ml 10 % H₂SO₄ (carbohydrates and cyclohexene phosphonates).
- potassium permanganate solution: 1.5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, 2.5 ml 5 % NaOH, 150 ml water (diethylene glycole derivatives).

Preparative flash column chromatography was performed at a pressure of 0.3 bar using Merck silica gel F60 (40-63 μ m, 230-400 mesh ASTM).

Preparative medium performance liquid chromatography was performed at pressures of 5-7 bar using Merck *LiChroprep Si 60* silica gel (15-25 μ m), column size 2,5 x 30 cm. Compounds were detected using a Knauer differential refractometer.

Gel permeation chromatography was carried out in the 1-5 mg scale on a XK 16/70 column (bed volume 130 ml) from Amersham packed with Biogel P2 fine (particle size 45-90 μ m) and 0.1 M NH_4HCO_3 as buffer. Detection was performed with a Knauer differential refractometer.

4.2. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

NMR spectra were recorded using one of the following instruments:

- Bruker AC 250 Cryospec (250 MHz for ^1H spectra)
- Jeol JNM-GX 400 (400 MHz for ^1H spectra, 162 MHz for ^{31}P spectra)
- Bruker DRX 600 (600 MHz for ^1H spectra, 151 for ^{13}C spectra and 243 MHz for ^{31}P spectra)

Chemical shifts are given in δ relative to tetramethylsilane (TMS), coupling constants are given in Hz. Internal standard used for ^1H -NMR spectra were TMS ($\delta = 0.00$ ppm), CDCl_3 ($\delta = 7.24$ ppm), CD_3OD ($\delta = 3.31$ ppm) and D_2O ($\delta = 4.63$ ppm).

Internal standards used for ^{13}C -NMR spectra were CDCl_3 ($\delta = 77.0$ ppm) and CD_3OD ($\delta = 49.00$ ppm). If D_2O was used as solvent, the reference signal for CD_3OD ($\delta = 49.00$ ppm) served as external standard. For ^{31}P -NMR spectra 85% phosphoric acid was used as external standard. Assignment of peaks and stereochemistry are based upon multidimensional NMR experiments (COSY, HMQC, HSQC and SED). Abbreviations used are: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, bs = broad singlet, pt = pseudo triplet, dd = double doublet, m = multiplet.

In pseudo-disaccharidic systems, the cyclohexene ring is indicated by suffix "a", the sugar by suffix "b". Diastereomeric mixtures of mixed diesters are distinguished by *h* and *l*, respectively, referring to the corresponding R_f values (high/low).

4.3. Mass Spectrometry

MALDI-ToF measurements were performed using a Kratos Kompact MALDI 2 and a Bruker Biflex III spectrometer in positive mode. 2, 5 dihydroxybenzoic acid (DHB) and cyanohydroxy cinnamic acid (CHCA) were used as matrices, dioxane, THF or acetonitrile were used as solvent for sample preparation.

HR-ESI-MS spectra were recorded on a Bruker Daltonics Apex III in positive mode with MeOH/H₂O as solvent.

4.4. Fluorescence Spectrophotometry

The sialidase assays were measured on a Wallac Victor fluorescence spectrophotometer.

4.5. Experiments

L-Xylose (1)

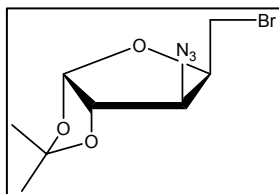
L-Xylose was purchased from Sigma and used without further purification.

(2-9)

Compounds **2-9** were synthesized as described in *Streicher, H. et al.*^[46, 47]

The analytical data correspond to those reported.

3-Azido-5-bromo-3,5-dideoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -L-xylofuranose (10)



500 mg (1.44 mmol) of triflate **9** were dissolved in DMF. NaBr (1.72 g, 14.4 mmol) was added and the reaction was stirred at room temperature over night. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was washed with DCM and water, dried over MgSO₄ and filtered through a short column with DCM to give 391 mg (1.41 mmol, 98 %) of bromide **10** as a colourless syrup.

TLC (EA:Tol 1:25): $R_f = 0.46$

$[\alpha]_D^{20} = +94.6^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.90$ (dd, 1H, $J_{1-2} = 3.6$ Hz, H-1); 4.69 (d, 1H, $J_{1-2} = 3.6$ Hz, H-2); 4.47 (ddd, 1H, $J_{3-4} = 3.2$ Hz, $J_{4-5} = 5.2$ Hz, $J_{4-5'} = 8.8$ Hz, H-4); 4.16 (d, 1H, $J_{3-4} = 3.2$ Hz, H-3); 3.52 (dd, 1H, $J_{4-5} = 5.2$ Hz, $J_{5-5'} = 10.0$ Hz, H-5); 3.44 (dd, 1H, $J_{4-5'} = 8.8$ Hz, $J_{5-5'} = 10.0$ Hz, H-5'); 1.54, 1.36 (2s, 6H, C(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): $\delta = 112.0$ (C(CH₃)₂); 105.5 (C-1); 83.6 (C-2); 79.5 (C-4); 66.6 (C-3); 27.2 (C-5); 26.9, 26.6 ((CH₃)₂) ppm.

C₈H₁₂BrN₃O₃ (M 277.0)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [M + K]^+ = 316.0$; m/z obtained: 316.7

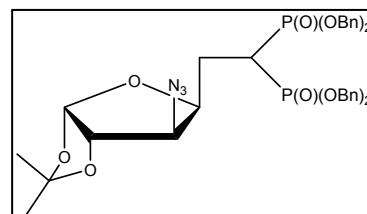
Tetrabenzyl methylenebisphosphonate (11)

Compound **11** was synthesized as described in *Bulman Page, P. et al.* [91]

The analytical data correspond to those reported.

Tetrabenzyl [3-azido-1,2-*O*-isopropylidene-3,5,6-trideoxy- α -L-xylofuranos-6,6'-diyl] bisphosphonate (12)

Alcohol **8** (3.3 g, 0.15 mol) was dissolved in 60 ml of abs. DCM. 2.47 ml (0.030 mol) pyridine were added and the mixture was cooled to - 30°C. A solution of 3.02 ml (0.018 mol) triflic anhydride in 30 ml of abs. DCM was



added dropwise via canula. The reaction was stirred for 2h at this temperature and quenched with saturated NaHCO₃- solution, KH₂PO₄- solution (50 ml) and dried over MgSO₄. The organic phase was evaporated *in vacuo* and the triflate was purified by column filtration with DCM. This afforded triflate as an orange syrup (5.5 g, 0.015 mol) in quantitative yield.

1.00 g (2.88 mmol) triflate was dissolved in 10 ml of abs. DMF.

2.47 g (4.61 mmol) of tetrabenzyl methylenediphosphonate were dissolved in 10 ml of dry DMF under argon and 121 mg (5.10 mmol) NaH and 25 μ l crown ether 15-crown-5 were added at 0°C.

After stirring for 30 min the triflate solution was added to the mixture via a syringe. The mixture was stirred in the melting ice bath over 4 h. The reaction was quenched by addition of solid NH₄Cl. The DMF was removed *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM and washed several times with water. The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (EA:Tol 1:2 \rightarrow 3:1) to give 452 mg (0.610 mmol, 21 %) of bisphosphonate **12** as a yellow syrup.

TLC (EA:Tol 1:2): R_f = 0.2

$[\alpha]_D^{20}$ = -5.3° (c = 1, CHCl₃)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.36-7.25 (m, 20H, 4 C₆H₅); 5.80 (d, 1H, J_{1-2} = 3.70 Hz, H-1); 5.13-5.01(m, 8H, 4 CH₂Ph); 4.62 (d, 1H, J_{1-2} = 3.70 Hz, H-2); 4.58 (pd,

^1H , $J_{3-4} = 1.86$ Hz, H-4); 3.68 (d, 1H, $J_{3-4} = 1.86$ Hz, H-3); 2.74 (pt, 1H, H-6); 2.37 (m, 1H, H-5); 2.16 (m, 1H, H-5'), 1.37, 1.26 (2s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 136.6$ (C-Ph); 128.5-128.0 (C_6H_5); 112.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 104.2 (C-1); 83.9 (C-2); 77.2 (C-4); 68.4 (CH_2Ph); 66.6 (C-3); 34.1 (C-6); 26.5, 26.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 25.7 (C-5) ppm.

^{31}P -NMR (243 MHz, CDCl_3): $\delta = 22.4, 22.0$ (2s, 2 PO_3Bn_2) ppm.

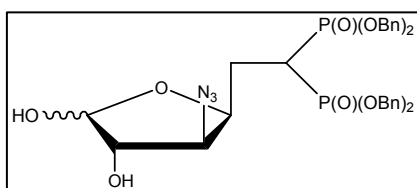
$\text{C}_{37}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}_2$ (M 733.2)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [M + Na] $^+$ = 756.2; m/z obtained: 756.0

m/z [M + K] $^+$ = 772.2; m/z obtained: 772.1

Tetrabenzyl [3-azido-3,5,6-trideoxy- α,β -L-xylofuranos-6,6'-diyl] bisphosphonate (13)



920 mg (1.25 mmol) of **12** were dissolved in 40 ml dioxane/ 5% H_2SO_4 - solution and stirred at 80°C until TLC indicates the absence of starting material. After neutralization with saturated NaHCO_3 - solution the

mixture was extracted several times with DCM. The organic phases were combined and dried over MgSO_4 . The solution was filtered, evaporated and purified by flash chromatography (EA:Tol 10:1) to yield in **13** as a colourless syrup (480 mg, 0.69 mmol, 56 %, anomeric mixture)

TLC (EA:Tol 10:1): $R_f = 0.5$

^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3): major anomer $\delta = 7.27$ -7.25 (m, 20H, 4 C_6H_5); 5.32 (d, 1H, $J_{1-2} = 4.2$ Hz, H-1); 4.98-4.90 (m, 8H, 4 CH_2Ph); 4.59 (dd, 1H, $J_{4-5} = 4.5$ Hz, $J_{4-5'} = 9.4$ Hz, H-4); 4.08 (dd, 1H, $J_{1-2} = 4.2$ Hz, $J_{2-3} = 7.7$ Hz, H-2); 3.80 (dd, 1H, $J_{2-3} = 7.7$ Hz, $J_{3-4} = 4.1$ Hz, H-3); 2.80 (m, 1H, H-6); 2.19 (m, 1H, H-5); 2.10 (m, 1H, H-5') ppm.

^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 135.8$ (C-Ph); 128.5-128.0 (C_6H_5); 95.2 (C-1); 76.0 (C-2); 74.7 (C-4); 68.3 (CH_2Ph); 68.1 (C-3); 32.5 (C-6); 26.4 (C-5) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, CDCl_3): $\delta = 24.6, 24.2$ (2s, $2\text{PO}_3\text{Bn}_2$) ppm.

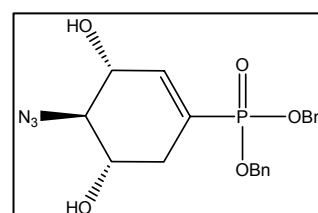
$\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}_2$ (M 693.2)

MALDI-MS (positive mode, matrix DHB, THF):

m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 716.2$; m/z obtained: 716.2

Dibenzyl (3R,4R,5S)-4-azido-3,5-dihydroxy-1-cyclohexenephosphonate (14)

To a solution of 450 mg (0.65 mmol) **13** in 20 ml of abs. dioxane 970 μl (0.97 mmol) was added lithium bis(trimethylsilyl)amide (1M in THF) at 0°C . The reaction was stirred at room temperature for 4h. The reaction was



neutralized with Amberlite-IR-120. The ion exchange resin was removed by filtration and solvent was evaporated. Purification by flash chromatography (Tol:EA 1:5) afforded 134 mg (0.32 mmol, 50 %) of **14** as a colourless syrup.

TLC (EA:Tol 5:1): $R_f = 0.42$.

$[\alpha]_D^{20} = -26.8^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.28-7.17$ (m, 10H, 2 C_6H_5); 6.43 (d, 1H, $J_{2-p} = 21.8$ Hz, H-2); 4.99-4.92 (m, 4H, 2 CH_2Ph); 4.05 (dd, 1H, $J_{2-3} = 2.4$ Hz, $J_{3-4} = 8.3$ Hz, H-3); 3.51 (ddd, 1H, $J_{4-5} = 9.9$ Hz, $J_{5-6} = 5.8$ Hz, $J_{5-6'} = 15.5$ Hz, H-5); 3.25 (dd, 1H, $J_{3-4} = 8.3$ Hz, $J_{4-5} = 9.9$ Hz, H-4); 2.51 (m, 1H, H-6); 2.05 (m, 1H, H-6')

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 142.7$ (C-2); 135.6 (C-Ph); 128.6-126.8 (C_6H_5); 71.7 (C-3); 69.3 (C-4); 68.5 (C-5); 67.7 (CH_2Ph); 32.2 (C-6) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, CDCl_3): $\delta = 18.25$ (1s, PO_3Bn_2) ppm.

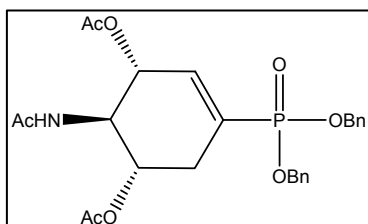
$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$ (M 415.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 438.1$; m/z obtained: 438.4

m/z $[\text{M} + \text{K}]^+ = 454.1$; m/z obtained: 454.4

Dibenzyl (3R,4R,5S)-4-acetamido-3,5-diacetoxy-1-cyclohexenephosphonate (15)



To a solution of 64 μl (0.67 mmol) acetic anhydride and 1.0 ml (1.0 mmol) of PMe_3 (1M in THF) in 1.5 ml of dry THF were added 70 mg (0.17 mmol) of **14** in 1 ml of dry THF. The mixture was stirred at room temperature for 24 h. The solvents were removed and the residue was

purified by flash chromatography (EA:Tol 10:1 \rightarrow EA:MeOH 10:1) to give 53 mg (0.11 mmol, 61 %) of **15** as yellow syrup.

TLC (EA:Tol 5:1): $R_f = 0.1$

$[\alpha]_D^{20} = -49.5^\circ$ ($c=1$, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.38\text{-}7.26$ (m, 10H, 4 C_6H_5); 6.38 (d, 1H, $J_{2\text{-p}} = 21.4$ Hz, H-2); 5.49 (d, 1H, $J_{\text{NH-4}} = 9.7$ Hz, NH); 5.39 (bd, 1H, $J_{3\text{-4}} = 10.5$ Hz, H-3); 5.06-5.01 (m, 4H, 2 CH_2Ph); 4.85 (ddd, 1H, $J_{4\text{-5}} = 10.2$ Hz, $J_{5\text{-6}} = 5.4$ Hz, $J_{5\text{-6}'} = 16.2$ Hz, H-5); 4.26 (dd, 1H, $J_{4\text{-5}} = 10.2$ Hz, $J_{3\text{-4}} = 10.5$ Hz, H-4); 2.59 (m, 1H, H-6); 2.31 (m, 1H, H-6'), 2.06, 2.03 (2s, 6H, OAc); 1.91 (s, 3H, NHAc) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.0\text{-}170.3$ (COOCH_3); 139.6 (C-2); 135.5 (C-Ph); 129.2-128.0 (C_6H_5); 71.8 (C-3); 68.7 (C-5); 68.3 (CH_2Ph); 53.3 (C-4); 31.1 (C-6); 23.2 (NHCOCH_3); 20.8, 20.7 (COOCH_3) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, CDCl_3): $\delta = 15.03$ (1s, PO_3Bn_2) ppm.

$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{NO}_8\text{P}$ (M 515.2)

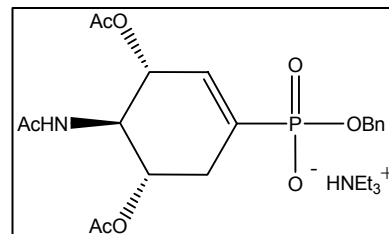
MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 538.2$; m/z obtained: 539.1

m/z $[\text{M} + \text{K}]^+ = 554.2$; m/z obtained: 555.2

Triethylammonium [(benzyl (3R,4R,5S)-4-acetamido-3,5-diacetoxy-1-cyclohexene-phosphonate] (16)

40 mg (0.080 mmol) **15** were dissolved in 1 ml of abs. THF. 140 μ l (1.00 mmol) NEt₃ and 54 μ l (0.54 mmol) HSPPh were added and the reaction was stirred for two days at room temperature. The solvents were evaporated. Purification by flash chromatography (MeOH:EA 1:4, 1% NEt₃) yielded 37 mg (0.080 mmol, quantitative) of **16** as white triethylammonium salt.



TLC (EA:MEOH 4:1): $R_f = 0.1$

$[\alpha]_D^{20} = -36.8^\circ$ ($c = 1$, CHCl₃)

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 7.37$ - 7.26 (m, 5H, C₆H₅); 6.21 (d, 1H, $J_{2-p} = 19.2$ Hz, H-2); 5.45 (bd, 1H, $J_{3-4} = 8.4$ Hz, H-3); 4.97-4.95 (m, 1H, H-5); 4.81 (2d, 2H, CH₂Ph); 4.16 (pt, 1H, $J_{4-5} = 10.2$ Hz, $J_{3-4} = 8.4$ Hz, H-4); 3.19 (q, 6H, N(CH₂CH₃)₃); 2.76 (m, 1H, H-6); 2.28 (m, 1H, H-6'); 2.08, 2.02 (2s, 6H, OAc); 1.88 (s, 3H, NHAc); 1.31 (t, 9H, N(CH₂CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD): $\delta = 173.6$ - 171.9 (COCH₃); 134.0 (C-2); 133.9 (C-Ph); 129.3-128.6 (C₆H₅); 73.3 (C-3); 70.5 (C-5); 67.2 (CH₂Ph); 53.7 (C-4); 47.6 (N(CH₂CH₃)₃); 31.9 (C-6); 22.5 (NHCOCH₃); 20.8, 20.7 (COCH₃); 9.1 (N(CH₂CH₃)₃) ppm.

³¹P-NMR (243 MHz, CD₃OD): $\delta = 12.5$ (1s, PO₃ Bn⁻) ppm.

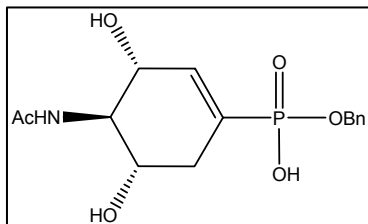
C₁₉H₂₄NO₈P (M 425.1) (free acid)

MALDI-MS (positive mode, matrix DHB, THF):

m/z [M + Na]⁺ = 448.1; m/z obtained: 448.2

m/z [M + K]⁺ = 464.1; m/z obtained: 464.2

Benzyl [(3R,4R,5S)-4-acetamido-3,5-dihydroxy-1-cyclohexene] phosphonic acid (17)



13 mg (0.024 mmol) of salt **16** were dissolved in 2 ml dioxane/water. 10 drops of 25 % NH_3 - solution were added and the reaction was stirred for 4 days at room temperature. The solvents were removed *in vacuo* and the product was lyophilized from water. Purification via gel permeation chromatography with 0.1M NH_4HCO_3 - buffer resulted in 8 mg (quantitative) of **17** as a white lyophilisate.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ = 7.31-7.24 (m, 5H, C_6H_5); 6.11 (d, 1H, $J_{2-p} = 19.2$ Hz, H-2); 4.78 (d, 2H, CH_2Ph); 4.01 (m, 1H, H-3); 3.58 (pt, 1H, $J_{3-4} = 9.0$ Hz, H-4); 3.32 (m, 1H, H-5); 2.38 (m, 1H, H-6); 1.98 (m, 1H, H-6'); 1.95 (s, 3H, NHAc) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, D_2O): δ = 174.5-174.3 (COCH_3); 139.7 (C-2); 133.8 (C-Ph); 129.3-128.4 (C_6H_5); 72.7 (C-3); 68.3 (C-5); 67.0 (CH_2Ph); 60.2 (C-4); 35.3 (C-6); 23.0 (NHAc) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, D_2O): δ = 15.7 (1s, PO_3Bn^-) ppm.

$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{NO}_6\text{P}$ (M 341.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix DHB, THF) (free acid):

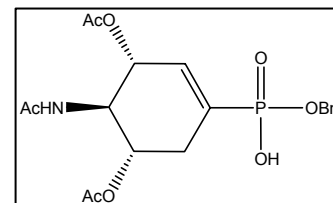
m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 364.1$; m/z obtained: 364.1

HR-ESI-MS

m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 364.0920$; m/z obtained: 364.0924

Benzyl [(3R,4R,5S)-4-acetamido-3,5-diacetoxy-1-cyclohexene-]phosphonic acid (18)

31 mg (0.06 mmol) of **16** were dissolved in 2 ml of dioxane/water. Dowex-IR-120⁺ was added until a pH-value of 2 was reached. The resin was removed by filtration and the solvent was evaporated. Lyophilisation from dioxane gave 22 mg (0.05 mmol, 90 %) of **18** as a white lyophilisate.



$[\alpha]_D^{20} = -58.7^\circ$ (C = 1, CHCl₃)

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 7.38-7.34$ (m, 5H, C₆H₅); 6.33 (d, 1H, J_{2-p} = 21.0 Hz, H-2); 5.45 (bd, 1H, J₃₋₄ = 9.0 Hz, H-3); 5.01 (d, 2H, CH₂Ph); 4.95 (ddd, 1H, J₄₋₅ = 9.6 Hz, J₅₋₆ = 5.4 Hz, J_{5-6'} = 16.2 Hz, H-5); 4.15 (pt, 1H, J₄₋₅ = 9.6 Hz, H-4); 2.69 (m, 1H, H-6); 2.24 (m, 1H, H-6'); 2.04, 2.02 (2s, 6H, OAc); 1.98 (s, 3H, NHAc) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD): $\delta = 171.8$ (COCH₃); 138.8 (C-2); 129.7-128.3 (C₆H₅); 72.7 (C-3); 69.8 (C-5); 68.6 (CH₂Ph); 53.4 (C-4); 31.1 (C-6); 22.6 (NHCOCH₃); 20.7 (COCH₃) ppm.

³¹P-NMR (243 MHz, CD₃OD): $\delta = 16.45$ (1s, PO₃ Bn⁻) ppm.

C₁₉H₂₄NO₈P (M 425.1) (free acid)

MALDI-MS (positive mode, matrix DHB, THF):

m/z [M + Na]⁺ = 448.1; m/z obtained: 448.2

m/z [M + K]⁺ = 464.1; m/z obtained: 464.2

1,2:3,4-Di-O-isopropylidene- α -D-galactopyranose (19)

Compound **19** was synthesized according to the literature.^[92]

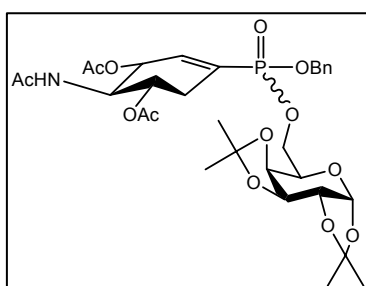
The analytical data correspond to those reported.

1,2:3,4-Di-*O*-isopropylidene-6-*O*-trifluormethansulfonyl- α -D-galactopyranose (20)

The triflate **20** was synthesized according to the literature.^[92]

The analytical data correspond to those reported.

Benzyl1,2:3,4-di-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranos-6-yl-[(3*R*,4*R*,5*S*)-4-acetamido-3,5-diacetoxy-1-cyclohexenephosphonate] (21) (h,l)



39 mg (0.074 mmol) of **16** were dissolved in 1 ml of abs. DMF. 116 mg (0.29 mmol) triflate **20** were added. The reaction was stirred at room temperature for two days. The solvents were evaporated and the crude product was purified by flash chromatography (EA:Tol 10:1 → EA:MeOH 4:1, 1 % NEt₃) to afford the diastereoisomers

21(h,l) (52 mg, 0.078 mmol, 56 %) as a white powder. The starting material could be recovered.

TLC (EA:Tol 10:1): R_f = 0.19

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 7.43 -7.36 (m, 10H, C₆H₅); 6.40 (pd, 2H, J_{2-p} = 22.2 Hz, H-2a); 5.53 (m, 2H, H-1b); 5.50 (m, 2H, H-3a (h,l)); 5.14 (m, 4H, 2CH₂Ph); 5.08 (m, 1H, H-5a (h)); 4.97 (m, 1H, H-5a (l)); 4.64 (m, 2H, H-3b); 4.38 (m, 3H, H-2b, H-4a (l)); 4.25-4.07 (m, 7H, H-4a (h), H-6b, H-6b', H-4b); 4.05 (m, 2H, H-5b); 2.75 (m, 1H, H-6a (h)); 2.65 (m, 1H, H-6a (l)); 2.46 (m, 1H, H-6a' (l)); 2.27 (m, 1H, H-6a' (h)); 2.04 (s, 6H, OAc); 1.99 (s, 6H, OAc); 1.89 (s, 6H, NHAc); 1.50-1.28 (m, 24H, C(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD): δ = 173.7-171.8 (COCH₃); 140.5 (C-2a (h,l)); 138.2 (C-Ph); 129.8-128.7 (C₆H₅); 110.7 (C(CH₃)₂); 97.3 (C-1b); 72.6 (C-3a (h,l)); 71.9 (C-3b); 71.7 (C-4b); 71.5 (C-2b); 70.0 (C-5a (l)), 69.4 (CH₂Ph); 68.8 (C-5a (h)); 68.6 (C-5b); 67.4 (C-6b (hl)); 53.2 (C-4a (h)); 52.9 (C-4a (l)); 30.8 (C-6a (hl)); 26.4-22.6 (OAc, NHAc, C(CH₃)₂) ppm.

³¹P-NMR (243 MHz, CD₃OD): δ = 19.6, 18.4 (2s, PO₃R₂ (h,l)) ppm.

$C_{31}H_{44}NO_{13}P$ (M 667.2)

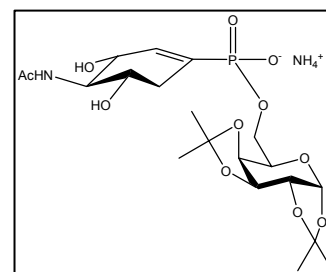
MALDI-MS (positive mode, matrix DHB, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 690.2$; m/z obtained: 690.1

$m/z [M + K]^+ = 706.2$; m/z obtained: 706.1

Ammonium[1,2:3,4-di-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranos-6-yl-(3R,4R,5S)-4-acetamido-3,5-dihydroxy-1-cyclohexenephosphonate] (22)

8 mg of Pd/C were suspended in 2 ml MeOH and the reaction flask was charged with hydrogen. A solution of 20 mg (0.030 mmol) of **21** in 4 ml MeOH was added via canula. The mixture was hydrogenated for 10 minutes. The catalyst was removed by filtration and the solvent was



removed *in vacuo*. The crude debenzylated product was used in the next step without further purification.

This syrup was dissolved in 4 ml MeOH and 2 ml 25 % NH_3 - solution was added. The reaction was stirred for two days. The solvents were evaporated and the product was purified by gel permeation chromatography with 0.1M NH_4HCO_3 - buffer to result in 17 mg (quantitative) of **22** as a white salt.

1H -NMR (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 6.14$ (d, 1H, $J_{2-p} = 19.8$ Hz, H-2a); 5.54 (d, 1H, $J_{1-2} = 4.8$ Hz, H-1b); 4.63 (m, 1H, H-3b); 4.41 (bd, 1H, $J_{2-3} = 8.4$ Hz, H-2b); 4.35 (m, 1H, H-4b); 4.13 (m, 1H, H-3a); 3.97 (m, 1H, H-5b); 3.77-3.65 (m, 4H, H-4a, H-5a, H-6b, H-6b'); 2.54 (m, 1H, H-6a); 2.13 (m, 1H, H-6a); 1.94 (s, 3H, NHAc); 1.46-1.16 (m, 12, $C(CH_3)_2$) ppm.

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD): $\delta = 175.7$ ($COCH_3$); 138.8 (C-2a); 109.8 ($C(CH_3)_2$); 97.0 (C-1b); 72.0 (C-3a); 71.4 (C-3b); 71.4 (C-4b); 71.1 (C-2b); 68.9 (C-5a); 68.6 (C-5b); 64.1 (C-6b, b), 34.5 (C-6a); 26.4, 26.3 ($C(CH_3)_2$); 23.3(NHAc) ppm.

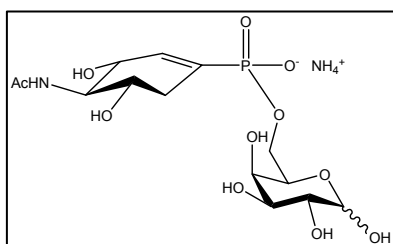
^{31}P -NMR (243 MHz, CD_3OD): $\delta = 16.2$ (1s, PO_3R^-) ppm.

$C_{20}H_{32}NO_{11}P$ (M 493.2)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 516.2$; m/z obtained: 515.8

Ammonium[α,β -D-galactopyranos-6-yl-(3R,4R,5S)-4-acetamido-3,5-dihydroxy-1-cyclohexenephosphonate] (23)



5.0 mg (9.8 μ mol) of protected phosphonate **22** were dissolved in 1 ml 50 % TFA and stirred for 4 hours. The solvents were evaporated and the product was lyophilized from water. Purification via gel permeation chromatography with 0.1M NH_4HCO_3 - buffer afforded

23 (3.0 mg, 4.6 μ mol, 71 %) as a white salt.

1H -NMR (600 MHz, D_2O): $\delta = 6.13$ (d, 1.8H, $J_{2-p} = 19.8$ Hz, H-2a); 5.12 (d, 1H, $J_{1-2} = 3.6$ Hz, H-1b(α)); 4.45 (d, 1.4H, $J_{1-2} = 7.8$ Hz, H-1b(β)); 4.13 (m, 1.8H, H-3a); 4.04 (pt, 1H, H-5b(α)); 3.89-3.64 (m, 13H, H-4b(α), H-4a, H-5a, H-2b(α), H-3b(α), H-6b(α), H-6b'(α), H-4b(β), H-5b(β), H-6b(β), H-6b'(β)); 3.51 (dd, 1.4H, $J_{2-3} = 9.6$ Hz, $J_{3-4} = 3.0$ Hz, H-3b(β)); 3.34 (m, 1.4H, H-2b(β)); 2.52 (m, 2H, H-6a); 2.13 (m, 2H, H-6a); 1.93 (s, 5.3H, NHAc) ppm.

^{13}C -NMR (151 MHz, D_2O): $\delta = 138.9$ (C-2a); 97.6 (C-1b(β)); 93.5 (C-1b(α)); 74.9 (C-4a); 73.8 (C-3b(β)); 72.9 (C-2b(β)); 71.9 (C-3a); 70.5 (C-5b(α)); 70.2 (C-3b(α), 4b(α)); 69.5 (C-4b(β)); 68.9 (C-5a, C-2b(α)); 64.6 (C-6b(α)); 64.3 (C-6b(β)), 59.2 (C-5b(β)); 34.3 (C-6a); 22.3 (NHAc) ppm.

^{31}P -NMR (243 MHz, D_2O) $\delta = 16.28, 16.23$ (2s, $PO_3R^-(\alpha, \beta)$) ppm.

$C_{14}H_{24}NO_{11}P$ (M 413.3) (acid form)

MALDI-MS (positive mode, matrix DHB, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 436.3$; m/z obtained: 436.7

$m/z [M + K]^+ = 452.3$; m/z obtained: 452.7

FAB-MS (glycerol) 436 $[M + Na]^+$

HR-ESI-MS

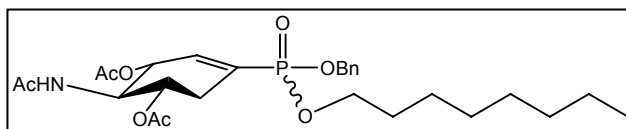
$m/z [M + Na]^+ = 436.0979$; m/z obtained: 436.1047

1-Oktyl-trifluormethanesulfonate (24)

Triflate **24** was synthesized according to the literature. The analytical data correspond to those reported.^[69]

Benzyl 1-octyl (3R,4R,5S)-4-acetamido-3,5-diacetoxy-1-cyclohexenephosphonate (25) (h,l)

To a solution of 40 mg (0.08 mmol) of **16** in 1 ml of abs. DMF were added 42 mg (0.16 mmol) of triflate **24**. The



reaction was stirred for two days at room temperature. The solvents were removed and purification by flash chromatography (EA:MeOH 4:1, 1 % NEt₃) afforded **25** (40 mg, 0.076 mmol, 95 %) as a waxy solid.

TLC (EA:Tol 10:1): $R_f = 0.3$

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): for **25** h,l $\delta = 7.40$ - 7.38 (m, 5H, C₆H₅); 6.38, 6.36 (2d, 1H, $J_{2-p} = 21.6$ Hz, H-2(h,l)); 5.48, 5.45 (pd, 1H, H-3(h,l)); 5.10-4.88 (m, 3H, H-5, CH₂Ph); 4.15 (m, 1H, H-4); 4.00 (m, 2H, H-1'a,b); 2.67 (m, 1H, H-6); 2.24 (m, 1H, H-6'); 2.05, 2.03, 1.90 (s, 9H, OAc, NHAc), 1.63 (m, 2H, H-2'); 1.33-1.28 (m, 12H, H-3'-7'); 0.88 (m, 2H, H-8') ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD): $\delta = 174.9$ - 173.8 (COCH₃); 140.6 (C-2(h,l)); 129.9-129.5 (C₆H₅); 72.6 (C-3); 69.8 (CH₂Ph); 69.5 (C-5); 67.1 (C-1'); 53.3 (C-4); 32.9 (C-3'); 31.1(C-2'); 31.0 (C-6); 30.5-26.4 (C-4'-7'); 22.5 (NHAc); 20.4 (OAc); 14.4 (C-8') ppm.

³¹P-NMR (243 MHz, CD₃OD): $\delta = 18.47$, 18.45 (2s, PO₃BnOct) ppm.

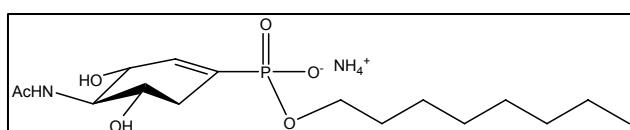
C₂₇H₄₀NO₈P (M 537.3)

MALDI-MS (positive mode, matrix DHB, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 560.3$; m/z obtained: 559.9

$m/z [M + K]^+ = 576.3$; m/z obtained: 576.0

Ammonium [1-octyl-(3R,4R,5S)-4-acetamido-3,5-dihydroxy-1-cyclohexene-phosphonate] (26)



5 mg of Pd/C were suspended in 2 ml MeOH and the reaction flask was charged with hydrogen. A solution of

14 mg (0.03 mmol) of **25** in 3 ml MeOH was added via canula. The mixture was hydrogenated for 10 minutes and the catalyst was removed by filtration. Subsequently the solvent was removed *in vacuo* and the crude debenzylated product was used in the next reaction step without further purification.

The syrup was dissolved in 4 ml MeOH and 2 ml 25 % NH₃- solution were added. The reaction was stirred for two days. The solvents were evaporated and the product was purified by gel permeation chromatography with 0.1M NH₄HCO₃- buffer to result in 10 mg (quantitative) of **26** as a white salt.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ = 6.10 (d, 1H, J_{2-p} = 19.2 Hz, H-2); 4.12 (bs, 1H, H-3), 3.78-3.56 (m, 4H, H-4, H-5, H-1'); 2.54 (m, 1H, H-6); 2.12 (m, 1H, H-6'); 1.90 (s, 3H, NHAc), 1.47 (m, 2H, H-2'); 1.26-1.13 (m, 10H, H-3'-7'); 0.72 (m, 2H, H-8') ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O): δ = 174.5 (COCH₃); 136.8 (C-2); 70.2 (C-3); 67.1 (C-5); 64.6 (C-4); 57.5 (C-1'); 32.7 (C-6); 30.5-21.4 (C-2'-7'); 21.3 (NHAc); 12.7 (C-8') ppm.

³¹P-NMR (243 MHz, D₂O): δ = 15.8 (1s, PO₃BnOct) ppm.

C₁₆H₃₀NO₆P (M 363.2)

MALDI-MS (positive mode, matrix DHB, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 386.2$; m/z obtained: 386.4

HR-ESI-MS

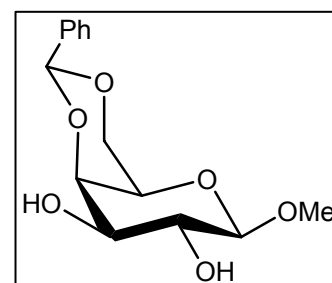
$m/z [M + Na]^+ = 386.1702$; $m/z \text{ obtained: } 386.1713$

Methyl- β -D-galactopyranoside (27)

Compound **27** was purchased from Fluka and used without further purification.

Methyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-galactopyranoside (28)

5.0 g (0.026 mol) of β -galactose **27** were suspended in 125 ml acetonitrile. 7.76 ml (0.051 mol) benzaldehyde dimethylacetale and 0.6 g (0.0026 mol) CSA were added and the suspension was stirred at room temperature for 2 h. 0.5 ml NEt_3 was added to the clear solution and the solvents were removed *in vacuo*. The desired product was crystallized from warm MeOH to afford 4.76 g (0.016 mol, 65 %) of **28** as a white powder.

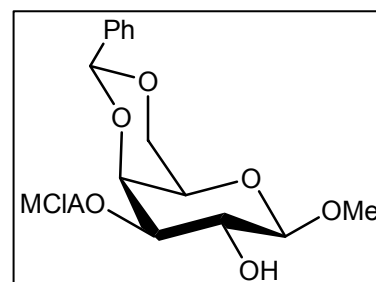


TLC (EA:MeOH 5:1): $R_f = 0.47$

The analytical data correspond to those reported.^[73]

Methyl-3-*O*-chloroacetyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-galactopyranoside (29)

4.76 g (16.0 mmol) of **28** were dissolved in 200 ml of abs. acetonitrile. 1.49 ml (18 mmol) dry pyridine and 1.39 ml (18.0 mmol) chloroacetylchloride were added at $-15^\circ C$ under argon. The solution was allowed to warm up to room temperature over night. The solvents were removed *in vacuo*. Flash chromatography (EA:Tol 5:1 \rightarrow 10:1) yielded 2.1 g (6.0 mmol, 37 %) of **29** as a white powder.



TLC (EA:Tol 5:1): $R_f = 0.50$

$[\alpha]_D^{20} = +56.3^\circ$ (c = 1, CDCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.49\text{-}7.26$ (m, 5H, C_6H_5); 5.51 (s, 1H, CHPh); 4.93 (dd, 1H, $J_{2-3} = 10.2$ Hz, $J_{3-4} = 3.7$ Hz, H-3); 4.44 (d, 1H, $J_{3-4} = 3.7$ Hz, H-4); 4.36 (bd, 1H, $J_{6-6'} = 12.5$ Hz, H-6); 4.29 (d, 1H, $J_{1-2} = 7.8$ Hz, H-1); 4.15 (2d, 2H, $J = 15.3$ Hz, CH_2Cl) 4.09 (dd, 1H, $J_{5-6'} = 1.8$ Hz, $J_{6-6'} = 12.5$ Hz, H-6'); 4.03 (dd, 1H, $J_{1-2} = 7.8$ Hz, $J_{2-3} = 10.2$ Hz, H-2); 3.59 (s, 3H, OMe); 3.53 (bs, 1H, H-5) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 167.3$ (OCH_2Cl); 137.4 (C-Ph); 129.0-126.2 (C_6H_5); 103.9 (C-1); 101.0 (CHPh); 75.3 (C-3); 73.1 (C-4); 68.9 (C-6); 68.4 (C-2); 67.0 (CH_2Cl); 66.3 (C-5); 57.2 (OMe) ppm.

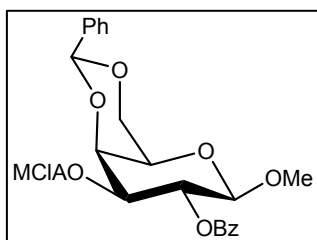
$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{ClO}_7$ (M 358.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 381.1$; m/z obtained: 381.1

m/z $[\text{M} + \text{K-H}]^+ = 396.1$; m/z obtained: 396.1

Methyl-2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-chloroacetyl- β -D-galactopyranoside (30)



1.96 g (5.47 mmol) of **29** were dissolved in 20 ml of dry DCM. 12 ml pyridine and 0.99 ml (11 mmol) benzoylchloride were added at 0°C . After one hour the reaction was complete. The reaction was quenched with saturated NaHCO_3 - solution. The organic phases were separated and washed with water, dried

over MgSO_4 and evaporated. Purification by flash chromatography (Tol:EA 5:1) afforded **30** (2.03 g, 4.39 mmol, 80 %) as a colourless foam.

TLC (EA:Tol 1:5): $R_f = 0.61$

$[\alpha]_D^{20} = +26.0^\circ$ (c = 1, CDCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 8.01-7.42 (m, 10H, 2 C_6H_5); 5.68 (dd, 1H, J_{1-2} = 7.8 Hz, J_{2-3} = 10.5 Hz, H-2); 5.54 (s, 1H, CHPh); 5.23 (dd, 1H, J_{2-3} = 10.5 Hz, J_{3-4} = 3.8 Hz, H-3), 4.62 (d, 1H, J_{1-2} = 7.8 Hz, H-1); 4.48 (bd, 1H, J_{3-4} = 3.8 Hz, H-4); 4.41 (bd, 1H, $J_{6-6'}$ = 12.4 Hz, H-6); 4.13 (bd, 1H, $J_{6-6'}$ = 12.4 Hz, H-6'); 4.03 (d, 1H, J = 15.3 Hz, CH_2Cl); 3.96 (d, 1H, J = 15.3 Hz, CH_2Cl); 3.63 (bs, 1H, H-5); 3.53 (s, 3H, OMe) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ = 167.3 (OCH_2Cl); 133.2-126.4 (C_6H_5); 101.9 (C-1); 101.1 (CHPh); 73.7 (C-3); 73.1 (C-4); 68.8 (C-6); 68.7 (C-2); 66.3 (C-5); 56.4 (OMe); 40.5 (CH_2Cl) ppm.

$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{ClO}_8$ (M 462.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix DHB, THF):

m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ = 485.1; m/z obtained: 485.1

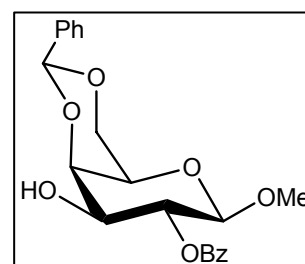
m/z [$\text{M} + \text{K}$] $^+$ = 501.1; m/z obtained: 501.1

Methyl-2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene- β -D-galactopyranoside (31)

2.0 g (4.3 mmol) of **30** were dissolved in 100 ml of abs. DMF.

580 mg (6.48 mmol) hydraziniumacetate were added at room temperature. After 3h the reaction was complete. Ethyl acetate was added and the organic phase was washed with water and sat. NaCl- solution. The organic phases were dried over MgSO_4

and the solvent was removed *in vacuo*. Flash chromatography (Tol:EA 2:1) gave 900 mg (2.30 mmol, 55 %) of **31** as a white powder.



TLC (EA:Tol 1:2): R_f = 0.26

$[\alpha]_D^{20}$ = +9.8° (c = 1, CDCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 8.01-7.38 (m, 10H, C_6H_5); 5.57 (s, 1H, CHPh); 5.35 (bt, 1H, J_{1-2} = 8.4 Hz, H-2); 4.53 (d, 1H, J_{1-2} = 8.4 Hz, H-1); 4.39 (bd, 1H, $J_{6-6'}$ = 12.0 Hz, H-6); 4.26 (dd, 1H, J_{3-4} = 3.8 Hz, J_{4-5} = 1.1 Hz, H-4); 4.11 (bd, 1H, $J_{6-6'}$ =

12.0 Hz, H-6'); 3.89 (bd, 1H, $J_{2-3} = 9.7$ Hz, H-3); 3.56 (bs, 1H, H-5); 3.52 (s, 3H, OMe) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 137.3$ (COC_6H_5); 129.9-126.5 (C_6H_5); 101.8 (C-1); 101.7 (CHPh); 75.9 (C-4); 72.8 (C-2); 72.1 (C-3); 69.1 (C-6); 66.7 (C-5); 56.8 (OMe) ppm.

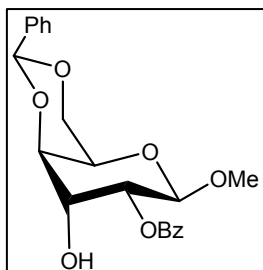
$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_7$ (M 386.14)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 409.1$; m/z obtained: 409.5

m/z $[\text{M} + \text{K}]^+ = 425.1$; m/z obtained: 425.5

Methyl-2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-gulopyranoside (**32**)



850 mg (2.20 mmol) of **31** were dissolved in 15 ml of dry DCM. 0.31 ml (3.8 mmol) abs. pyridine was added and the solution was cooled to -20°C . 0.58 ml (3.5 mmol) triflic anhydride was added dropwise via canula. After 2 h the reaction was complete and 40 ml of dry DCM was added. The reaction was quenched with sat. NaHCO_3 - solution and dried over MgSO_4 . The solvents were evaporated and the crude product was dissolved in 15 ml abs. acetonitrile without further purification.

1.7 g (5.9 mmol) of TBANO_2 were added and the reaction was stirred at room temperature over night.

The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was washed with water/ethyl acetate several times. The organic phases were dried over MgSO_4 and the solvent was evaporated.

The following purification via flash chromatography (EA:Tol 1:1) yielded 254 mg (0.660 mmol, 30 %) of **32** as a yellow foam.

TLC (EA:Tol 1:1): $R_f = 0.71$

$[\alpha]_D^{20} = -1.2^\circ$ (c = 1, CDCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 8.01-7.34 (m, 10H, C_6H_5); 5.57 (s, 1H, CHPh); 5.37 (dd, 1H, J_{1-2} = 8.4 Hz; J_{2-3} = 3.2 Hz, H-2); 4.97 (d, 1H, J_{1-2} = 8.4 Hz, H-1); 4.38 (m, 2H, J_{2-3} = 3.2 Hz, H-3, H-6 hidden under H-3); 4.12 (m, 2H, $\text{H6}'$, H-4); 3.90 (bs, 1H, H-5); 3.53 (s, 3H, OMe) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ = 137.6 (COC_6H_5); 133.3-126.4 (C_6H_5); 101.4 (CHPh); 98.9 (C-1); 76.3 (C-4); 71.0 (C-2); 69.4 (C-3); 69.2 (C-6); 65.6 (C-5); 56.5 (OMe) ppm.

$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_7$ (M 386.14)

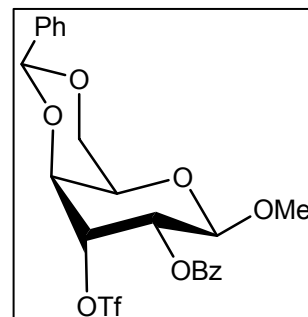
MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ = 409.1; m/z obtained: 409.4

m/z [$\text{M} + \text{K}$] $^+$ = 425.1; m/z obtained: 425.4

Methyl-2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-trifluoromethansulfonyl- β -D-gulopyranoside (33)

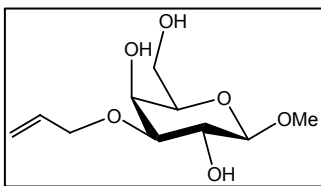
50 mg (0.13 mmol) glucose **32** were dissolved in 1 ml of abs. DCM. 83 μl (1.0 mmol) of dry pyridine were added. The reaction mixture was cooled to 0°C and 43 μl (0.26 mmol) triflic anhydride was added via canula dropwise. The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred for further 6 h. The reaction mixture was washed with sat.



NaHCO_3^- solution and 1M KH_2PO_4^- solution. The organic phase was dried over MgSO_4 and the solvents were evaporated. The crude product was purified by filtration over a short column with DCM to give 70 mg (0.13 mmol) of **33** in quantitative yield as a yellow syrup

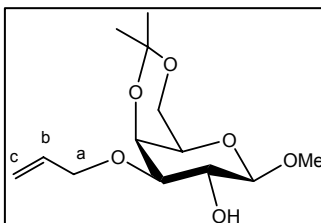
TLC (EA:Tol 1:2): R_f = 0.75

$^1\text{H-NMR}$ (251 MHz, CDCl_3): δ = 8.10-7.00 (m, 10H, C_6H_5); 5.6 (s, 1H, CHPh); 5.52 (m, 1H, H-3); 5.42 (pt, 1H, H-2); 4.97 (d, 1H, J_{1-2} = 8.4 Hz, H-1); 4.45 (dd, 1H, J_{5-6} = 1.3 Hz, $J_{6-6'}$ = 12.6 Hz, H-6); 4.28 (bs, 1H, H-4); 4.15 (dd, 1H, $J_{5-6'}$ = 1.7 Hz, $J_{6-6'}$ = 12.6 Hz, $\text{H6}'$); 3.90 (bs, 1H, H-5); 3.53 (s, 3H, OMe) ppm.

Methyl-3-*O*-allyl- β -D-galactopyranoside (34)


5.0 g (26 mmol) of β -methylgalactoside and 6.4 g of dibutyltin oxide were dissolved in 200 ml of abs. toluene. The mixture was refluxed at 60°C for 24 h with a Dean-Starck apparatus. The solution was cooled to room temperature and the solvent was evaporated. The crude mixture was dissolved in 100 ml of dry toluene and 9.5 g (26 mmol) of TBAI and 2.23 ml (25.7 mmol) of allyl bromide were added. The mixture was heated to 70°C and stirred for further 5h. The mixture was evaporated *in vacuo*. The crude mixture was taken up in ethyl acetate and the salts were removed by filtration. The organic layer was evaporated *in vacuo* and purified by flash chromatography (EA:MeOH 5:1) to result in a yellow syrup of **34** (4.40 g, 18.7 mmol, 73 %).

The analytical data correspond to those reported.^[93]

Methyl-3-*O*-allyl-4,6-*O*-isopropylidene- β -D-galactopyranoside (35)


500 mg (2.13 mmol) of **34** were dissolved in 3 ml dimethoxypropane and 50 mg *p*-TsOH were added. The reaction was stirred at room temperature over night. The reaction was quenched with sat. NaHCO₃- solution. The mixture was washed with DCM and water and the organic phases were dried over MgSO₄. The syrup was purified by flash chromatography (EA:Tol 10:1) and afforded **35** (330 mg, 1.20 mmol) in 57 % yield.

TLC (EA:Tol 10:1): R_f = 0.3

$[\alpha]_D^{20}$ = +39.7° (c = 1, CHCl₃)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 5.95 (m, 1H, H_b); 5.29 (dd, 2H, $J_{c-c'}$ = 17.2 Hz, H_c, c'); 4.23-4.08 (m, 4H, H_a, a', H-4, H-1); 3.97 (m, 2H, J_{5-6} = 6.4 Hz, $J_{6-6'}$ = 11.6 Hz, H-6); 3.86 (dd, 1H, $J_{5-6'}$ = 4.8 Hz, $J_{6-6'}$ = 11.6 Hz, H-6'); 3.72 (m, 1H, H-2); 3.56 (s, 3H, OMe); 3.52 (m, 1H, H-5); 3.37 (dd, 1H, J_{2-3} = 9.6 Hz, J_{3-4} = 3.0 Hz, H-3); 1.47, 1.46 (s, 6H, C(CH₃)₂) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ = 134.1 (C-b); 117.8 (C-c); 108.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 103.7 (C-1); 80.0 (C-3); 71.1 (C-a); 70.9 (C-2); 69.7 (C-5); 67.0 (C-4); 62.8 (C-6); 57.3 (OCH_3); 30.9, 29.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

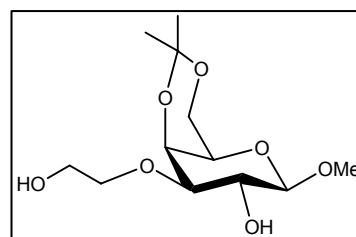
$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_6$ (M 274.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix DHB, THF):

m/z [$\text{M} + \text{K}$] $^+$ = 313.1; m/z obtained: 312.8

Methyl-3-*O*-hydroxyethyl-4,6-*O*-isopropylidene- β -D-galactopyranoside (**36**)

300 mg (1.10 mmol) of **35** were dissolved in 10 ml MeOH. A spatula of solid NaHCO_3 was added as buffer. The mixture was cooled to -78°C and ozone bubbled through until the solution turned blue. The reaction was allowed to warm up to room temperature and 248 mg (6.50 mmol) of



NaBH_4 were added. After 2h the reaction was complete. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was purified by flash chromatography (EA:MeOH 5:1) to afford 240 mg (0.850 mmol, 78 %) of **36** as a colourless syrup.

TLC (EA:MeOH 5:1): R_f = 0.27

$[\alpha]_D^{20}$ = $+25.8^\circ$ (c = 1, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ = 4.38 (pd, 1H, J_{3-4} = 3.0 Hz, H-4); 4.18 (d, 1H, J_{1-2} = 7.2 Hz, H-1); 4.14 (dd, 1H, J_{5-6} = 1.8 Hz, $J_{6-6'}$ = 12.6 Hz, H-6); 3.83 (dd, 1H, J_{5-6} = 1.8 Hz, $J_{6-6'}$ = 12.6 Hz, H-6'); 3.72-3.65 (m, 4H, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 3.62 (dd, 1H, J_{1-2} = 7.2 Hz; J_{2-3} = 9.6 Hz, H-2); 3.51 (s, 3H, OCH_3); 3.38 (m, 2H, H-3, H-5); 1.46, 1.36 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_3OD): δ = 105.3 (C-1); 100.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 81.8 (C-3), 71.6 (C-a); 70.9 (C-2), 67.7 (C-5); 66.7 (C-4); 63.9 (C-6); 62.4 (C-b); 57.3 (OCH_3); 29.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

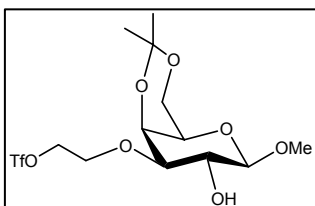
$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_7$ (M 278.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 301.1$; m/z obtained: 301.3

$m/z [M + K]^+ = 317.1$; m/z obtained: 317.3

Methyl-4,6-*O*-isopropylidene 3-*O*-(2'-trifluormethansulfonyloxyethyl)- β -D-galactopyranoside (37)



50 mg (0.18 mmol) of **36** were dissolved in 2 ml of abs. DCM and 29 μ l (0.36 mmol) of dry pyridine were added. The solution was cooled to -30°C and 39 μ l (0.23 mmol) of triflic anhydride in 500 μ l of abs. DCM were added dropwise under argon. The reaction was complete after 1h. The organic phase was washed with saturated NaHCO_3 - solution, 1M KH_2PO_4 - solution and NaCl - solution. The organic phases were dried over MgSO_4 . The solvents were evaporated and the yellow syrup was used for the next step without further purification (30 mg, 0.076 mmol, 43 %).

TLC (EA:MeOH 5:1): $R_f = 0.6$

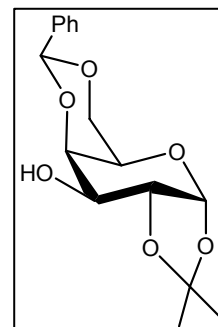
It was not possible to obtain correct analytical data of this instable product.

4,6-*O*-Benzylidene- α,β -D-galactopyranoside (38)

Compound **38** was synthesized according to the literature.^[94, 95]

4,6-*O*-Benzylidene-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranoside (39)

6.0 g (0.022 mmol) of **38** were suspended in 300 ml of abs. acetone. 3.57 ml (0.0290 mmol) of dimethoxypropane and 100 mg of *p*-TsOH were added. The reaction was stirred at room temperature over night. The reaction mixture was neutralized with saturated NaHCO₃-solution, washed with DCM and dried over MgSO₄. Flash chromatography (EA:Tol 1:2) afforded 3.1 g (0.010 mmol, 46 %) of **39** as a colourless syrup.



TLC (EA:Tol 1:2): $R_f = 0.4$

$[\alpha]_D^{20} = -38.4^\circ$ ($c = 1$, CDCl₃)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.52$ - 7.36 (m, 5H, C₆H₅); 5.73 (s, 1H, CHPh); 5.67 (d, 1H, $J_{1-2} = 5.4$ Hz, H-1); 4.65 (dd, 1H, $J_{2-3} = 2.4$ Hz, $J_{3-4} = 8.4$ Hz, H-3); 4.45 (dd, 1H, $J_{2-3} = 2.4$ Hz, $J_{1-2} = 5.4$ Hz, H-2); 4.33 (dd, 1H, $J_{3-4} = 8.4$ Hz, $J_{4-5} = 1.8$ Hz, H-4); 3.99 (ddd, 1H, $J_{4-5} = 1.8$ Hz, $J_{5-6'} = 4.8$ Hz, $J_{5-6} = 6.6$ Hz, H-5); 3.89 (dd, 1H, $J_{5-6} = 6.6$ Hz, $J_{6-6'} = 11.4$ Hz, H-6); 3.78 (dd, 1H, $J_{5-6'} = 4.8$ Hz, $J_{6-6'} = 11.4$ Hz, H-6'), 1.56, 1.34 (s, 6H, C(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): $\delta = 137.8$ (C-Ph); 129.3 - 127.4 (C₆H₅); 105.1 (C(CH₃)₂); 104.1 (CHPh); 96.6 (C-1); 72.1 (C-3); 71.9 (C-4); 70.2 (C-2); 68.2 (C-5); 62.2 (C-6); 26.1, 25.3 (C(CH₃)₂) ppm.

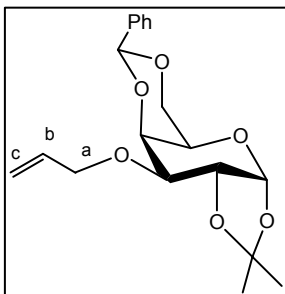
C₁₆H₂₀O₆ (M 308.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [M + Na]⁺ = 331.1; m/z obtained: 331.1

m/z [M + K]⁺ = 347.1; m/z obtained: 347.1

3-*O*-Allyl-4,6-*O*-benzylidene-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranoside (40)



200 mg (0.649 mmol) of **39** were dissolved in 12 ml DCM. 82 μ l (0.97 mmol) of allyl bromide and 1.1 g (4.9 mmol) of silver oxide were added and the suspension was cooled to 0°C. 177 mg (0.480 mmol) of TBAI were added and the mixture was stirred in the dark for 24 h. The reaction was quenched by addition of 5 ml EtOH and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the crude product was purified by flash chromatography (EA:Tol 1:2) to give 160 mg (0.460 mmol, 71 %) of **40** as a colourless syrup.

TLC (EA:Tol 1:2): R_f = 0.71

$[\alpha]_D^{20}$ = -6.6° (c = 1, CDCl₃)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.53-7.37 (m, 5H, C₆H₅); 5.90 (m, 1H, H_b); 5.76 (s, 1H, CHPh); 5.63 (d, 1H, J_{1-2} = 4.8 Hz, H-1); 5.26 (dd, 1H, $J_{c-c'}$ = 16.8 Hz, H-c); 5.15 (dd, 1H, $J_{c-c'}$ = 16.8 Hz, H-c'); 4.64 (dd, 1H, J_{3-4} = 8.4 Hz, J_{2-3} = 2.4 Hz, H-3); 4.42 (dd, 1H, J_{1-2} = 4.8 Hz, J_{2-3} = 2.4 Hz, H-2); 4.35 (dd, 1H, J_{3-4} = 8.4 Hz, J_{4-5} = 1.8 Hz, H-4); 4.09 (m, 1H, H-5); 4.03 (m, 2H, H_{a,a'}); 3.70-3.66 (m, 2H, H-6,6'); 1.57, 1.35 (s, 6H, C(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 136.3 (C-b); 134.6 (C-Ph); 129.9-126.4 (C₆H₅); 117.2 (C-c); 108.1 (C(CH₃)₂); 103.8 (CHPh); 96.4 (C-1); 72.3 (C-a); 71.8 (C-3); 71.5 (C-4); 70.0 (C-2); 68.7 (C-6); 66.7 (C-5); 26.04, 24.9 (C(CH₃)₂) ppm.

C₁₉H₂₄O₆ (M 348.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

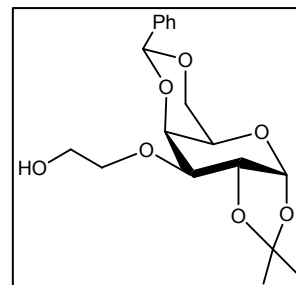
m/z [M + Na]⁺ = 371.1; m/z obtained: 371.6

m/z [M + K]⁺ = 387.1; m/z obtained: 387.5

4,6-*O*-Benzylidene-3-*O*-hydroxyethyl-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranoside (41)

200 mg (0.570 mmol) of **40** were dissolved in 12 ml MeOH. One spatula of solid NaHCO₃ was added as buffer.

The solution was cooled to -78°C and ozone was bubbled through until the solution turned blue. The reaction was allowed to warm up to room temperature and 88 mg (2.9 mmol) of NaBH₄ were added. The reaction was stirred



until TLC indicated the complete reduction. The mixture was evaporated *in vacuo* and the crude product was purified by flash chromatography (EA:Tol 1:2 → 10:1) to yield 110 mg (0.310 mmol, 55 %) of **41** as a colourless syrup.

TLC (EA:Tol 10:1): $R_f = 0.57$

$[\alpha]_D^{20} = -42.1^\circ$ (c = 1, CDCl₃)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.52$ -7.25 (m, 5H, C₆H₅); 5.75 (s, 1H, HPh); 5.64 (d, 1H, $J_{1-2} = 4.8$ Hz, H-1); 4.66 (dd, 1H, $J_{2-3} = 2.4$ Hz, $J_{3-4} = 8.4$ Hz, H-3); 4.45 (dd, 1H, $J_{1-2} = 4.8$ Hz, $J_{2-3} = 2.4$ Hz, H-2); 4.35 (dd, 1H, $J_{3-4} = 8.4$ Hz, $J_{4-5} = 1.8$ Hz, H-4); 4.10 (pt, 1H, H-5); 3.75 -3.58 (m, 6H, CH₂CH₂O; H6, H6'); 1.57, 1.35 (s, 6H, C(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): $\delta = 136.0$ (C-Ph), 130.0-126.3 (C₆H₅); 108.9 (C(CH₃)₂); 103.7 (CHPh); 96.3 (C-1); 72.5 (C-a); 72.0 (C-3); 71.5 (C-4); 70.0 (C-2); 69.5 (C-6); 66.6 (C-5); 61.5 (C-b); 26.0, 24.9 (C(CH₃)₂) ppm.

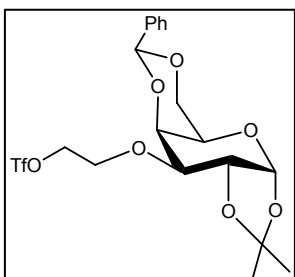
C₁₈H₂₄O₇ (M 352.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [M + Na]⁺ = 375.1; m/z obtained: 375.0

m/z [M + K]⁺ = 391.1; m/z obtained: 391.0

4,6-*O*-Benzylidene-1,2-*O*-isopropylidene 3-*O*-(2'-trifluormethansulfonyloxyethyl)- α -D-galactopyranoside (42)



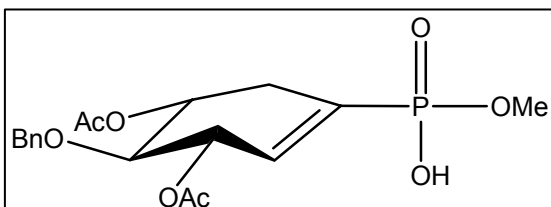
To a solution of 40 mg (0.11 mmol) of **41** in 3 ml of abs. DCM was added 18 μ l (0.22 mmol) of dry 2,6-lutidine. The solution was cooled to -30°C and 24 μ l (0.12 mmol) of triflic anhydride in 500 μ l of abs. DCM were added dropwise under argon.

The reaction was complete after 30 min. The solvents were evaporated *in vacuo* (at room temperature) and the residue was coevaporated with dry toluene three times. The orange residue (30 mg, 60 μ mol, 62 %) was used without further purification for the next step.

TLC (EA:Tol 5:1): $R_f = 0.83$

It was not possible to obtain correct analytical data of this instable product.

Methyl [(3S,4S,5R)-4-acetamido-3,5-diacetoxy-1-cyclohexene] phosphonic acid (43)



660 mg (1.30 mmol) of triethylammonium [methyl (3S,4S, 5R)-4-acetamido -3,5-diacetoxy-1 cyclohexenephosphonate] were dissolved in 15 ml dioxane/water (1:1).

Amberlite-IR-120 was added until a pH value of 2 was reached. The resin was filtered off and the solvents were evaporated. The product was lyophilized from dioxane to yield 410 mg (1.00 mmol, 80 %) of **43** as a white solid.

$[\alpha]_D^{20} = +42.7^{\circ}$ (c = 1, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.33\text{-}7.258$ (m, 5H, C_6H_5); 6.35 (d, 1H, $J_{2-P} = 21.0$ Hz, H-2); 5.48 (bs, 1H, H-3); 5.14 (ddd, 1H, $J_{4-5} = 8.4$ Hz, $J_{5-6} = 6.0$ Hz, $J_{5-6'} = 13.8$ Hz, H-5); 4.71 (2d, 2H, $J = 12.0$ Hz, CH_2Ph); 3.88 (dd, 1H, $J_{4-5} = 8.4$ Hz, $J_{3-4} = 6.6$ Hz, H-4); 3.65 (d, 3H, $J_{P-\text{OMe}} = 7.8$ Hz, POOCH_3); 2.75 (m, 1H, H-6); 2.36 (m, 1H, H-6'); 2.01, 2.00 (s, 6H, OAc) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_3OD): δ = 171.8 (COCH_3); 139.6 (C-2); 137.7 (C-Ph); 129.4-128.8 (C_6H_5); 78.7 (C-4); 74.8 (CH_2Ph); 72.3 (C-3); 70.5 (C-5); 52.6 (POOCH_3); 30.0 (C-6); 20.9 (NHCOCH_3); 20.8, 20.7 (COCH_3) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, CD_3OD): δ = 16.9 (1s, PO_3CH_3^-) ppm.

$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{O}_8\text{P}$ (M 398.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

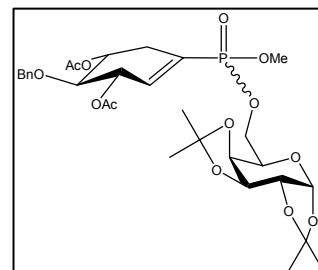
m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ = 421.1; m/z obtained: 421.0

m/z [$\text{M} + \text{K}$] $^+$ = 437.1; m/z obtained: 437.0

Methyl 1,2:3,4-di-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranos-6-yl [(3*S*,4*S*,5*R*)-4-acetamido-3,5 diacetoxo-1-cyclohexenephosphonate] (44) (h,l)

25 mg (0.063 mmol) of acid **43** was dissolved in 1 ml of abs. THF. 25 mg (0.090 mmol) of galactose **19**, 25 mg (0.090 mmol) of Ph_3P and 19 μl (0.090 mmol) of DIAD were added. The reaction was stirred at 70°C for 24 h.

The solvent was removed *in vacuo* and the product was purified by flash chromatography (EA:Tol 10:1) to give 10 mg (0.02 mmol, 25 %) of **44** as a colourless solid.



TLC (EA:Tol 10:1): R_f = 0.5

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 7.65-7.25 (m, 5H, C_6H_5); 6.44 (d, 1H, J_{2-p} = 21.6 Hz, H-2a); 5.55-5.49 (m, 2H, H-3a, H-1b); 5.15 (m, 1H, H-5a); 4.68 (2d, 2H, CH_2Ph); 4.60 (dd, 1H, J_{2-3} = 7.8 Hz, J_{3-4} = 2.4 Hz, H-3b); 4.30 (m, 1H, H-2b); 4.20 (dd, 1H, J_{3-4} = 2.4 Hz J_{4-5} = 7.2 Hz, H-4b); 4.14 (m, 2H, H-6b,b'); 4.02 (ddd, 2H, J_{4-5} = 7.2 Hz J_{5-6} = 1.5 Hz $J_{5-6'}$ = 13.8 Hz, H-5b); 3.78 (dd, 1H, J_{3-4} = 2.4 Hz J_{4-5} = 7.2 Hz H-4a); 3.76 (2s, 3H, POOCH_3); 2.77 (m, 1H, H-6a); 2.28 (m, 1H, H-6a'); 2.0, 1.99 (2s, 6 OAc); 1.53, 1.32 (2s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ = 170.0, 169.9 (COCH_3); 138.4 (C-2a); 138.0 (C-Ph); 128.5-126.8 (C_6H_5); 109.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 96.1 (C-1b); 77.8 (C-4a); 74.0 (CH_2Ph); 72.1

(C-3a); 70.7 (C-3b); 70.6 (C-4b); 70.5 (C-2b); 69.7 (C-5a); 67.1 (C-5b); 65.6 (C-6b), 52.3 (POOCH₃); 29.5, 29.4 (COCH₃); 29.1 (C-6a); 26.0-24.4 (C(CH₃)₂) ppm.

³¹P-NMR (243 MHz, CDCl₃): δ = 19.4, 18.7 (2s, PO₃R₂ (h,l)) ppm.

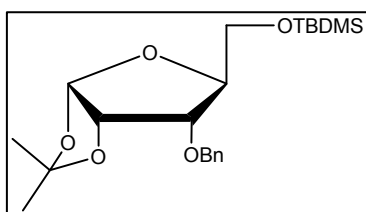
C₃₀H₄₁O₁₃P (M 640.2)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [M + Na]⁺ = 663.2; m/z obtained: 663.3

m/z [M + K]⁺ = 679.2; m/z obtained: 679.4

3-*O*-Benzyl-1,2-*O*-isopropylidene-5-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- α -L-ribofuranose (45)



15.0 g (49.3 mmol) of L-ribose **5** and 8.8 ml (74 mmol) of BnBr were dissolved in 280 ml abs. DMF. The solution was cooled to 0°C and 1.77 g (73.9 mmol) NaH were added in portions under argon. The temperature was allowed to warm to room temperature over night.

The reaction was quenched with 5 ml of MeOH. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was washed with EA and water, dried over MgSO₄ and evaporated *in vacuo*.

The crude product was purified by flash chromatography (Tol:EA 20:1) to yield 16.5 g (42.0 mmol, 85 %) of **45** as a colourless syrup.

TLC (EA:Tol 1:10): R_f = 0.5

$[\alpha]_D^{20}$ = -55.7° (c = 1, CHCl₃)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.38-7.25 (m, 5H, C₆H₅); 5.68 (d, 1H, J₁₋₂ = 3.6 Hz, H-1); 4.74, 4.60 (d, 2H, J = 12.6 Hz, CH₂Ph); 4.53 (pt, 1H, J₁₋₂ = 3.6 Hz, H-2); 4.06 (m, 1H, H-4); 3.89-3.87 (m, 2H, H-3, H-5); 3.72 (dd, 1H, J_{4-5'} = 3.0 Hz, J_{5-5'} = 12 Hz, H-5'); 1.57, 1.32 (2s, 6H, C(CH₃)₂); 0.88 (s, 9H, C(CH₃)₃); 0.04 (s, 6H, Si(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 137.8 (C-Ph); 128.5-127.5 (C₆H₅); 112.8 (C(CH₃)₂); 103.9 (C-1); 79.4 (C-4); 77.7 (C-2); 76.4 (C-3); 72.5 (CH₂Ph); 61.1 (C-5); 26.9, 26.6 ((CH₃)₂); 25.9 (C(CH₃)₃); 18.3 (C(CH₃)₃); -5.0 (Si(CH₃)₂) ppm.

$C_{21}H_{34}O_5Si$ (M 394.2)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 417.2$; m/z obtained: 417.8

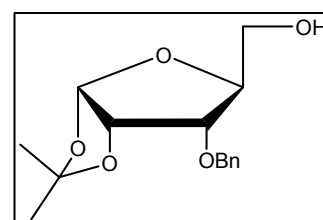
$m/z [M + K]^+ = 433.2$; m/z obtained: 433.7

3-*O*-Benzyl-1,2-*O*-isopropylidene- α -L-ribofuranose (**46**)

16.5 g (42.0 mmol) of **45** were dissolved in 150 ml of dry THF. The solution was cooled to 0°C and 46.5 ml (65.5 mmol) of 1M TBAF solution in dry THF were added.

The reaction was stirred at room temperature for two hours.

The solvent was removed *in vacuo* and the residue was purified by flash chromatography (Tol:EA 2:1) to afford 10.0 g (35.7 mmol, 85 %) of **46** as a colourless syrup.



TLC (EA:Tol 1:10): $R_f = 0.25$

$[\alpha]_D^{20} = -82.7^\circ$ ($c = 1$, $CHCl_3$)

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.39$ - 7.26 (m, 5H, C_6H_5); 5.73 (d, 1H, $J_{1-2} = 3.6$ Hz, H-1); 4.75 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, CH_2Ph); 4.59 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, CH_2Ph); 4.57 (dd, 1H, $J_{1-2} = 3.6$ Hz, $J_{2-3} = 8.4$ Hz, H-2); 4.12 (ddd, 1H, $J_{3-4} = 4.2$ Hz, $J_{4-5} = 2.4$ Hz, $J_{4-5'} = 9.0$ Hz, H-4); 3.92 (dd, 1H, $J_{4-5} = 2.4$ Hz, $J_{5-5'} = 12.0$ Hz, H-5); 3.84 (dd, 1H, $J_{2-3} = 8.4$ Hz; $J_{3-4} = 4.2$ Hz, H-3); 3.63 (dd, 1H, $J_{4-5'} = 9.0$ Hz, $J_{5-5'} = 12.0$ Hz, H-5'); 1.59, 1.34 (2s, 6H, $C(CH_3)_2$) ppm.

^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 137.5$ ($C-Ph$); 128.5-127.9 (C_6H_5); 113.1 ($C(CH_3)_2$); 104.0 (C-1); 78.8 (C-4); 77.7 (C-2); 76.5 (C-3); 72.3 (CH_2Ph); 60.6 (C-5); 26.8, 26.5 ($(CH_3)_2$) ppm.

$C_{15}H_{20}O_5$ (M 280.13)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 303.1$; m/z obtained: 303.2

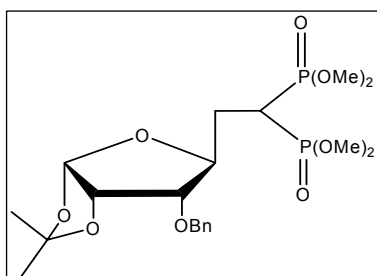
$m/z [M + K]^+ = 319.1$; m/z obtained: 319.2

Tetramethyl methylenebisphosphonate (48)

Compound **48** was synthesized as described by *Nicholson et. al.* from tetraisopropyl methylenediphosphonate over three steps. The analytical data were identical to the literature.^[96]

It can also be purchased from Avocado, Karlsruhe.

Tetramethyl [3-*O*-benzyl-1,2-*O*-isopropylidene-3,5,6-trideoxy- α -L-ribofuranos-6,6'-diyl]bisphosphonate (49)



2.00 g (7.14 mmol) of **46** were dissolved in 24 ml of dry DCM. 1.65 ml (14.2 mmol) of abs. 2,6-lutidine were added and the solution was cooled to -30°C . 1.44 ml (8.56 mmol) of triflic anhydride in 12 ml abs. DCM were added via canula and the mixture was stirred at this temperature for 2 h. The mixture was extracted with

saturated NaHCO_3 - solution, KH_2PO_4 - solution and dried over MgSO_4 . The organic phases were dried *in vacuo* and the triflate was purified by column filtration with DCM. This afforded **47** as an orange syrup (2.8 g, 6.8 mmol, 95 %).

1.62 ml (86.9 mmol) tetramethyl methylenediphosphonate **48** were dissolved in 50 ml of dry DMF under Argon. 163 mg (6.79 mmol) NaH and 125 μl crown ether 15-crown-5 were added at 0°C .

After stirring for 30 min the freshly prepared triflate **47** (1.80 g, 4.36 mmol) in 50 ml of dry DMF was added to the solution via a syringe.

The mixture was stirred in the melting ice bath over 4 h. The reaction was quenched by addition of solid NH_4Cl and the DMF was removed *in vacuo*.

The residue was dissolved in DCM and washed several times with water. The combined organic phases were dried over MgSO_4 , filtered and evaporated.

The residue was purified by flash chromatography (EA:Tol 10:1 \rightarrow MeOH:EA 1:20) to give 1.20 g (2.42 mmol, 56 %) of **49** as a colourless syrup.

TLC (EA:Tol 10:1): $R_f = 0.3$

$[\alpha]_D^{20} = -24.3^{\circ}$ (c = 1, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 7.36-7.25 (m, 5H, C_6H_5); 5.68 (d, 1H, J_{1-2} = 3.73 Hz, H-1); 4.75 (d, 2H, J = 11.94 Hz, CH_2Ph); 4.53 (dd, 1H J_{1-2} = 3.73 Hz, J_{2-3} = 8.8 Hz, H-2); 4.29 (ddd, 1H, J_{3-4} = 4.24 Hz; J_{4-5} = 9.25 Hz; $J_{4-5'}$ = 12.86 Hz, H-4); 3.79 (12H, 4 OCH_3), 3.40 (dd, 1H, J_{3-4} = 4.24 Hz, J_{2-3} = 8.8 Hz, H-3); 2.83 (dd, 1H, $J_{5'-6}$ = 3.8 Hz; J_{5-6} = 8.8 Hz, H-6); 2.29 (ddd, 1H, $J_{5'-6}$ = 3.8 Hz, J_{4-5} = 9.25 Hz, $J_{5-5'}$ = 14.3 Hz, H-5); 2.03 (m, 1H, H-5'); 1.57, 1.36 (2s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ = 137.3 (C-Ph); 128.5-127.9 (C_6H_5); 103.7 (C-1); 82.6 (C-3); 78.0 (C-2); 75.4 (C-4); 72.1 (CH_2Ph); 53.4 (POOCH_3); 31.7 (C-6); 28.6 (C-5); 26.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ = 27.86, 27.51 (2s, PO_3Me_2) ppm.

$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_{10}\text{P}_2$ (M 494.2)

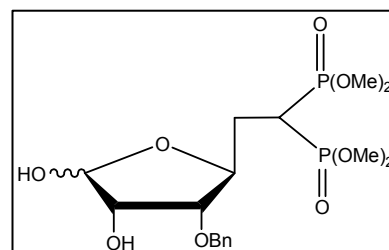
MALDI-MS (positive mode, matrix DHB, THF):

m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ = 517.2; m/z obtained: 516.8

m/z [$\text{M} + \text{K}$] $^+$ = 533.2; m/z obtained: 532.8

Tetramethyl [3-*O*-benzyl-3,5,6-trideoxy- α,β -L-ribofuranos-6,6'-diy] bisphosphonate (50)

530 mg (1.07 mmol) of **49** were dissolved in 30 ml dioxane/5% H_2SO_4 - solution and stirred at 80°C until monitoring by TLC indicated the absence of starting material.



After neutralization with saturated NaHCO_3 - solution the

mixture was extracted with DCM several times. The organic phases were combined and dried over MgSO_4 . The mixture was filtered, evaporated and purified by flash chromatography (EA:MeOH 10:1) to yield **50** as a colourless syrup (315 mg, 0.70 mmol, 65 %).

TLC (EA:MeOH 3:1): R_f = 0.4

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) major anomer: $\delta = 7.37\text{-}7.33$ (m, 5H, C_6H_5); 5.23 (d, 1H, $J_{1-2} = 3.4$ Hz, H-1); 4.65 (d, 2H, $J = 14.06$ Hz, CH_2Ph); 4.35 (m, 1H, H-4); 4.02 (m, 1H, H-2); 3.80 (m, 12H, POOCH_3); 3.65 (m, 1H, H-3), 2.61 (m, 1H, H-6), 2.14 (m, 1H, H-5); 1.96 (m, 1H, H-5') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 136.7$ (C-Ph); 128.7-127.9 (C_6H_5); 96.7 (C-1); 82.9 (C-2); 81.0 (C-3); 77.2 (C-4); 72.8 (CH_2Ph), 53.2 (POOCH_3); 32.3 (C-6); 31.6 (C-5) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.9, 28.17, 27.69, 27.56$ (4s, PO_3Me_2) ppm.

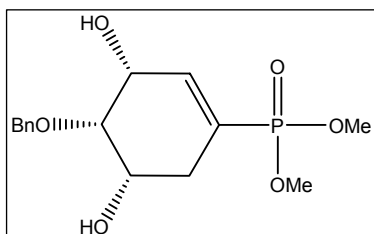
$\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_{10}\text{P}_2$ (M 454.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix DHB, THF):

$m/z [\text{M} + \text{Na}]^+ = 477.1$; m/z obtained: 477.0

$m/z [\text{M} + \text{K}]^+ = 493.1$; m/z obtained: 493.0

Dimethyl (3R,4S,5S)-4-benzyloxy-3,5-dihydroxy-1-cyclohexenephosphonate (51)



To a solution of 500 mg (1.10 mmol) of **50** in 20 ml abs. dioxane were added 1.65 ml (1.65 mmol, 1.5 eq) of lithium bis(trimethylsilyl)amide (1M in THF) at 0°C .

The mixture was stirred for 4 h and then allowed to warm up to room temperature. The reaction mixture was neutralized with Dowex 50- H^+ filtered and evaporated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (EA:MeOH 10:1) furnished **51** (207 mg, 0.63 mmol) as a colourless syrup in 57 % yield.

TLC (EA:MeOH 3:1): $R_f = 0.6$

$[\alpha]_D^{20} = -77.0^\circ$ (c = 1, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.36\text{-}7.32$ (m, 5H, C_6H_5); 6.67 (d, 1H, $J_{2-P} = 21.4$ Hz, H-2); 4.80 (d, 2H, $J = 11.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$); 4.34 (bs, 1H, H-3); 4.13 (bs, 1H, H-5); 3.73-3.71 (m, 7H, H-4, POOCH_3); 2.50 (m, 1H, H-6); 2.40 (m, 1H, H-6') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ = 137.8 (C-2); 128.6-128.1 (C_6H_5); 76.9 (C-4); 72.6 (CH_2Ph); 68.5 (C-5); 66.4 (C-3); 52.6 (POOCH_3); 31.3 (C-6) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ = 22.26 (s, PO_3Me_2) ppm.

$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{P}$ (M 328.1)

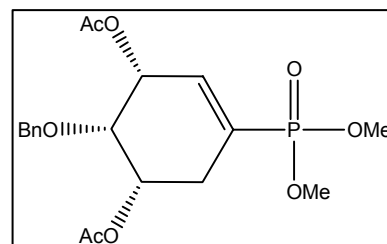
MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [M + Na] $^+$ = 351.1; m/z obtained: 351.5

m/z [M + K] $^+$ = 367.1; m/z obtained: 367.6

Dimethyl (3R,4S,5S)- 4-benzyloxy-3,5-diacetoxy-1- cyclohexenephosphonate (52)

45 mg (0.14 mmol) of **51** were dissolved in 8 ml Ac_2O /pyridine (1:9) and stirred at room temperature over night. The solvents were evaporated and the syrup was purified by flash chromatography (Tol:EA 1:10) to give **52** (48 mg, 0.12 mmol) in 90 % yield.



TLC (Tol:EA 1:10): R_f = 0.5

$[\alpha]_D^{20}$ = -32.0° (c = 0.5, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 7.33-7.27 (m, 5H, C_6H_5); 6.46 (d, 1H, J_{2-P} = 21.0 Hz, H-2); 5.52 (bs, 1H, H-3); 5.05 (pt, 1H, J = 7.8 Hz, H-5), 4.71 (d, 2H, J = 12.0 Hz, CH_2Ph); 4.10 (bs, 1H, H-4); 4 3.73-3.69 (m, 6H, POOCH_3); 2.65 (m, 2H, H-6, H-6'); 2.07, 2.00 (2s, 6H, OAc) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ = 170.0 (COCH_3); 138.8 (C-2); 128.3-127.0 (C_6H_5); 74.1 (CH_2Ph); 73.8 (C-4); 70.5 (C-3); 69.8 (C-5); 52.6 (POOCH_3); 26.7 (C-6); 20.9 (COCH_3) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ = 20.95 (s, PO_3Me_2) ppm.

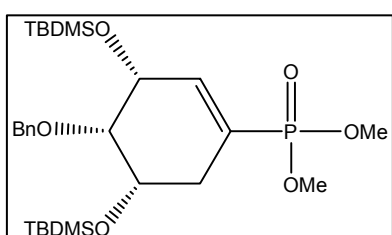
$\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{O}_8\text{P}$ (M 412.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 435.1$; m/z obtained: 435.5

$m/z [M + K]^+ = 451.1$; m/z obtained: 451.5

Dimethyl (3R,4S,5S)- 4-benzyloxy-3,5-di(*tert*-butyldimethylsilyl)-1- cyclohexene-phosphonate (53)



10 mg (0.031 mmol) **51** were dissolved in 2 ml of dry DCM. 21 mg (0.31 mmol) of imidazole and 23 mg (0.15 mmol) of TBDMSCI were added and the reaction was refluxed over night. The reaction was quenched by adding 1 ml of MeOH and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (EA:Tol 2:1) to afford 12 mg (0.022 mmol, 70 %) **53** as a colourless syrup.

TLC (Tol:EA 1:10): $R_f = 0.57$

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.41\text{-}7.29$ (m, 5H, C_6H_5); 6.45 (d, 1H, $J_{2-P} = 21.2$ Hz, H-2); 4.81 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$); 4.41 (m, 1H, H-3); 3.92 (m, 1H, H-5); 3.78-3.60 (m, 7H, H-4, POOCH_3); 2.51-2.23 (m, 2H, H-6, H-6'); 1.93 (s, 18H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 0.05 (s, 12 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

$\text{C}_{27}\text{H}_{49}\text{O}_6\text{PSi}_2$ (M 556.3)

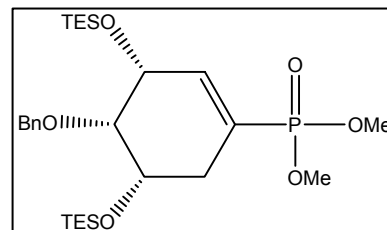
MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 579.3$; m/z obtained: 579.3

$m/z [M + K]^+ = 595.3$; m/z obtained: 595.3

Dimethyl (3R,4S,5S)-4-benzyloxy-3,5-di(triethylsilyl)-1-cyclohexenephosphonate (54)

To a solution of 20 mg (60 μ mol) of **51** in 4 ml of dry DCM were added 42 mg (0.60 mmol) of imidazole and 51 μ l (0.30 mmol) of TESCO. The reaction was refluxed over night. The reaction was quenched by adding 1 ml of MeOH. Purification by flash chromatography



(EA: Tol 2:1) yielded 10 mg (0.02 mmol, 33 %) of **54** as a colourless syrup.

TLC (Tol:EA 1:10): R_f = 0.65

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 7.43-7.28 (m, 5H, C_6H_5); 6.46 (d, 1H, J_{2-P} = 21.1 Hz, H-2); 4.83 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$); 4.38 (bs, 1H, H-3); 3.83 (m, 1H, H-5); 3.79-3.60 (m, 7H, H-4, POOCH_3); 2.50-2.21 (m, 2H, H-6, H-6'); 1.93 (m, 18H, $\text{Si}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); 0.05 (m, 12 H, $\text{Si}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$) ppm.

$\text{C}_{27}\text{H}_{49}\text{O}_6\text{PSi}_2$ (M 556.3)

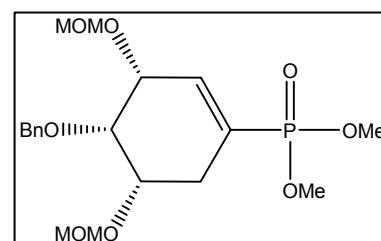
MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [M + Na] $^+$ = 579.3; m/z obtained: 579.7

m/z [M + K] $^+$ = 595.3; m/z obtained: 595.7

Dimethyl (3R,4S,5S)-4-benzyloxy-3,5-di(methoxymethoxy)-1-cyclohexene-phosphonate (55)

60 mg (0.18 mmol) of **51** were dissolved in 40 ml of a mixture of DCM/dimethoxymethane (1:1) and 30 μ l of triflic acid were added under argon.



The mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction was washed with saturated NaHCO_3 - solution,

the organic phase was dried over MgSO_4 and evaporated *in vacuo*. Purification by MPLC (EA:MeOH 29:1) resulted in **55** as a colourless syrup (55 mg, 0.13 mmol, 71 %).

TLC (EA: MeOH 10:1): $R_f = 0.48$

$[\alpha]_D^{20} = -32.5^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.36\text{--}7.21$ (m, 5H, C_6H_5); 6.53 (d, 1H, $J_{2\text{-P}} = 21.6$ Hz, H-2); 4.85 (d, 2H, CH_2Ph); 4.65 (dd, 4H, $J_{a\text{-b}} = 10.56$ Hz, $J_{b\text{-b}'} = 13.44$ Hz, CH_2O); 4.34 (bs, 1H, H-3); 4.04 (bs, 1H, H-4); 3.82 (pt, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-5); 3.68 (2d, 6H, $J_{\text{P-OMe}} = 10.8$ Hz, POOCH_3), 3.35 (2s, 6H, CH_2OCH_3); 2.49 (m, 2H, H-6, H-6') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.2$ (C-2); 128.6–127.0 (C_6H_5); 95.5 (CH_2OCH_3); 74.5 (C-4); 73.9 (C-5, C-3); 73.4 (CH_2Ph); 55.8 (CH_3OCH_2); 52.7 (POOCH_3); 27.9 (C-6) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): $\delta = 21.7$ (s, PO_3Me_2) ppm.

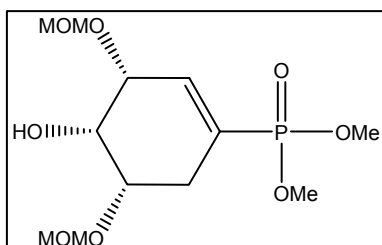
$\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}_8\text{P}$ (M 416.2)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [\text{M} + \text{Na}]^+ = 439.2$; m/z obtained: 439.7

$m/z [\text{M} + \text{K}]^+ = 455.2$; m/z obtained: 455.8

Dimethyl (3R,4S,5S)-4-hydroxy-3,5-di(methoxymethoxy)-1-cyclohexene-phosphonate (**56**)



To 65 mg (0.16 mmol) of **55** in EtOH were added 60 mg of Pearlman's catalyst. Subsequently, 3 ml of 1,4-cyclohexadiene were added and the mixture was stirred at 50°C for 4 d. The catalyst was removed by filtration and the solvent was evaporated. Purification by column

chromatography (EA:MeOH 10:1) afforded 33 mg (0.10 mmol, 65 %) of **56** as a colourless syrup.

TLC (EA:MeOH 10:1): $R_f = 0.26$

$[\alpha]_D^{20} = -10.6^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 6.50 (d, 1H, J_{2-P} = 21.6 Hz, H-2); 4.78, 4.73 (dd, 4H, J_{a-b} = 10.2 Hz, CH_2O); 4.32 (m, 1H, H-3); 4.23 (m, 1H, H-4); 3.82 (bt, 1H, H-5); 3.72 (2d, 6H, $J_{P-\text{OMe}}$ = 10.8 Hz, POOCH_3); 3.44, 3.40 (2s, 6H, CH_2OCH_3); 2.47 (m, 2H, H-6, H-6') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ = 140.0 (C-2), 95.3, 94.8 (CH_2OCH_3); 73.4 (C-3); 72.9 (C-5); 67.6 (C-4); 55.8, 55.4 (CH_3OCH_2), 52.2 (POOCH_3); 26.4 (C-6) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ = 20.7 (s, PO_3Me_2) ppm.

$\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_8\text{P}$ (M 326.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ = 349.1; m/z obtained: 349.9

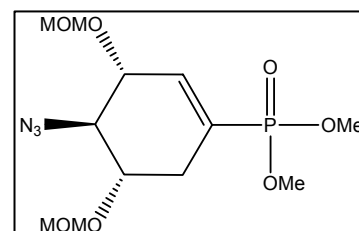
m/z [$\text{M} + \text{K}$] $^+$ = 365.1; m/z obtained: 365.8

Dimethyl (3R,4R,5S)-4-azido-3,5-di(methoxymethoxy)-1-cyclohexenephosphonate (57)

30 mg (0.092 mmol) of **54** were dissolved in 500 μl of abs. DCM. 34 μl (0.42 mmol) of dry pyridine were added and the solution was cooled to -30°C .

30 μl (0.18 mmol) of triflic anhydride in 300 μl abs. DCM were added and the mixture was stirred at -10°C for 2 h. The mixture was washed with saturated NaHCO_3 - solution, KH_2PO_4 - solution and dried over MgSO_4 . The organic phases were dried *in vacuo* and the triflate was obtained as an orange syrup (40 mg, 0.087 mmol, 95 %), which was used without further purification.

30 mg (0.066 mmol) of the triflate were dissolved in 2 ml abs. DMF. 22 mg (0.33 mmol) of NaN_3 and 3 mg $t\text{BuNH}_4\text{Cl}$ were added and the mixture was stirred at 50°C over night. DMF was removed *in vacuo* and the oil was purified by flash chromatography (EA) which afforded 20 mg (0.057 mmol, 86 %) of **57** as a colourless syrup.



TLC (EA): R_f = 0.3

$[\alpha]_D^{20}$ = -38.6° (c = 1, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 6.52 (d, 1H, J_{2-P} = 21.6 Hz, H-2); 4.78, 4.76 (dd, 4H, J_{a-b} = 7.22 Hz, $J_{b-b'}$ = 10.8 Hz, CH_2O); 4.08 (bd, 1H, H-3); 3.71 (2d, 6H, J_{P-OMe} = 10.8 Hz, POOCH_3); 3.70 (1H, H-5 hidden under MOM); 3.56 (pt, 1H, H-4); 3.42, 3.40 (2s, 6H, CH_2OCH_3); 2.74 (m, 1H, H-6); 2.22 (m, 1H, H-6') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ = 140.8 (C-2); 96.3; 95.9 (CH_2OCH_3); 76.1 (C-3); 74.2 (C-5); 66.9 (C-4); 55.7 (CH_3OCH_2); 52.7 (POOCH_3); 31.2 (C-6) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ = 19.9 (s, PO_3Me_2) ppm.

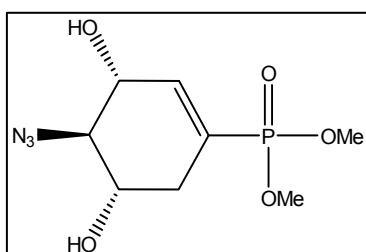
$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_7\text{P}$ (M 351.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ = 374.1; m/z obtained: 374.1

m/z [$\text{M} + \text{K}$] $^+$ = 390.1; m/z obtained: 390.1

Dimethyl (3R,4R,5S)- 4-azido-3,5-dihydroxy-1- cyclohexenephosphonate (58)



36 mg (0.10 mmol) of **57** were dissolved in 5 ml of 50 % TFA and stirred at room temperature over night.

The solution ist lyophilized and purified by flash chromatography (EA:MeOH 7:1) to afford 30 mg of **58** in quantitative yield as a colourless lyophilisate.

TLC (EA:MeOH 5:1): R_f = 0.45

$[\alpha]_D^{20}$ = -14.6 (c = 1, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ = 6.36 (d, 1H, J_{2-P} = 22.2 Hz, H-2); 4.16 (m, 1H, H-3); 3.76 (ddd, 1H, J_{5-6} = 5.4 Hz, J_{4-5} = 10.2 Hz, $J_{5-6'}$ = 15.2 Hz, H-5); 3.64 - 3.60 (2d, 6H, J_{P-OMe} = 11.4 Hz, POOCH_3); 3.35 (dd, 1H, J_{3-4} = 9.0 Hz, J_{4-5} = 10.2 Hz, H-4); 2.57 (m, 1H, H-6); 2.16 (m, 1H, H-6') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, D_2O): δ = 144.0 (C-2); 70.6 (C-3); 69.1 (C-4); 68.1 (C-5); 53.1 (POOCH_3); 32.2 (C-6) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ = 22.7 (s, PO_3Me_2) ppm.

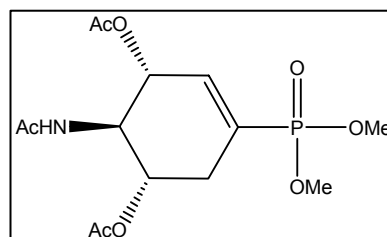
$C_8H_{14}N_3O_5P$ (M 263.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 286.1$; m/z obtained: 285.7

Dimethyl (3R,4R,5S)- 4-acetamido-3,5-diacetoxy-1- cyclohexenephosphonate (**59**)

30 mg (0.11 mmol) of **58** were dissolved in 1 ml of abs. THF and added to a solution of 43 μ l (0.46 mmol) of acetic anhydride and 680 μ l (0.68 mmol) of PMe_3 (1M in THF) under argon. The mixture was stirred at room temperature over night. The solution was dried *in vacuo* and purified by flash chromatography (EA:Tol 10:1 \rightarrow EA:MeOH 5:1) to yield 21 mg (0.058 mmol, 58 %) of **59** as a yellow syrup.



TLC (EA:MeOH 10:1): $R_f = 0.26$

$[\alpha]_D^{20} = -44.8^\circ$ (c = 1, $CHCl_3$)

1H -NMR (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 6.47$ (d, 1H, $J_{2-P} = 19.2$ Hz, H-2); 5.55 (m, 1H, H-3); 5.10 (ddd, 1H, $J_{4-5} = 9.0$ Hz, $J_{5-6} = 5.4$ Hz, $J_{5-6'} = 10.8$ Hz, H-5); 4.25 (dd, 1H, $J_{3-4} = 10.8$ Hz, $J_{4-5} = 9.0$ Hz, H-4); 3.76 (2d, 6H, $J_{P-OMe} = 11.4$ Hz, $POOCH_3$); 2.75 (m, 1H, H-6); 2.34 (m, 1H, H-6'); 2.05, 2.03 (2s, 6H, OAc), 1.91 (s, 3H, NHAc) ppm.

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD): $\delta = 173.0$ (NHCOCH₃); 171.8 (COCH₃); 141.0 (C-2); 72.4 (C-3); 69.6 (C-5); 53.6 (C-4); 53.5 (POOCH₃); 30.8 (C-6); 22.7 (NHCOCH₃); 20.7, 20.6 (COCH₃) ppm.

^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD): $\delta = 19.76$ (s, PO_3Me_2) ppm.

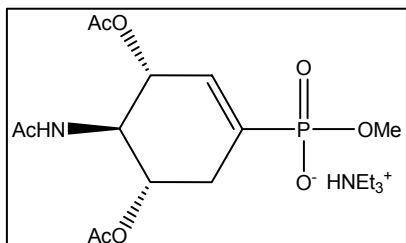
$C_{14}H_{22}NO_8P$ (M 363.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 386.1$; m/z obtained: 385.6

$m/z [M + K]^+ = 402.1$; m/z obtained: 401.6

Triethylammonium [methyl (3R,4R,5S)-4-acetamido-3,5-diacetoxy-1-cyclohexene-phosphonate] (60)



24 mg (0.066 mmol) of **59** were dissolved in 750 μl of abs. THF. 129 μl (0.93 mmol) of NEt_3 and 47 μl (0.46 mmol) HSPh were added. The mixture was stirred at room temperature for 48 h. The mixture was evaporated *in vacuo* and purified by flash chromatography (EA:MeOH 10:1 \rightarrow 4:1+ 1 % NEt_3) to give 29 mg of triethylammonium salt **60** in quantitative yield.

TLC (EA:MeOH 5:1): $R_f = 0.1$

$[\alpha]_D^{20} = -3.2^\circ$ (c = 0.5, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 6.21$ (d, 1H, $J_{2-P} = 18.6$ Hz, H-2); 5.53 (pd, 1H, H-3); 5.08 (ddd, 1H, $J_{4-5} = 9.0$ Hz, $J_{5-6} = 5.4$ Hz, H-5); 4.21 (dd, 1H $J_{3-4} = 10.8$ Hz, $J_{4-5} = 9.0$ Hz, H-4); 3.48 (1d, 3H, $J_{P-OMe} = 10.8$ Hz; POOCH_3); 3.18 (q, 6H, CH_2CH_3); 2.75 (m, 1H, H-6); 2.36 (m, 1H, H-6'); 2.04, 2.02 (2s, 6H, OAc); 1.90 (s, 3H, NHAc); 1.29 (t, 9H, CH_2CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_3OD): $\delta = 173.6$ (NHCOCH_3), 172.0 (COCH_3); 171.9 (COCH_3); 133.0 (C-2); 72.1 (C-3); 69.4 (C-5); 52.7 (C-4); 50.6 (POOCH_3); 46.1 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); 30.6 (C-6); 22.7-20.7 (COCH_3); 9.2 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): $\delta = 13.2$ (s, PO_3Me^-) ppm.

$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}_8\text{P}$ (M 349.1) (free acid)

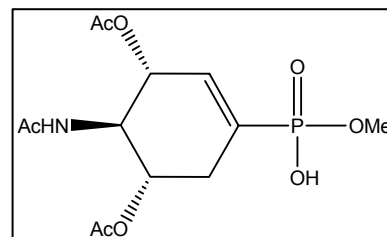
MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 372.1$; m/z obtained: 372.3

m/z $[\text{M} + \text{K}]^+ = 388.1$; m/z obtained: 388.3

Methyl [(3R,4R,5S)-4-acetamido-3,5-diacetoxy-1-cyclohexene] phosphonic acid (61)

15 mg (0.033 mmol) of **60** were dissolved in 2 ml of dioxane/water. Amberlite-IR-120 was added until pH 2, then the resin was removed by filtration and the product was lyophilized from dioxane to give **61** (12 mg) in quantitative yield as a white lyophilisate.



$$[\alpha]_D^{20} = -8.34^\circ \text{ (c = 0.5, MeOH)}$$

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD): δ = 6.38 (d, 1H, $J_{2-P} = 49.8$ Hz, H-2); 5.52 (m, 1H, H-3); 5.08 (m, 1H, H-5); 4.23 (m, 1H, H-4); 3.65 (m, 3H; POOCH_3); 2.78 (m, 1H, H-6); 2.35 (m, 1H, H-6'); 2.05, 2.02 (2s, 6H, OAc); 1.92 (s, 3H, NHAc) ppm.

$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}_8\text{P}$ (M 349.1) (free acid)

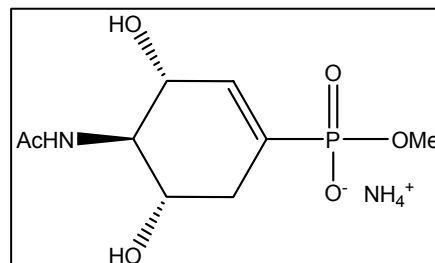
MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$$m/z [\text{M} + \text{Na}]^+ = 372.1; m/z \text{ obtained: } 372.3$$

$$m/z [\text{M} + \text{K}]^+ = 388.1; m/z \text{ obtained: } 388.3$$

Ammonium [methyl (3R,4R,5S)-4-acetamido-3,5-dihydroxy-1-cyclohexene-phosphonate] (62)

7 mg (0.02 mmol) of **61** were dissolved in 1 ml of dioxane/water. 12 drops of 25% NH_3 - solution were added. The reaction was stirred at room temperature for 4 days. The solvents were removed *in vacuo* and the product was lyophilized from water to afford **62** in quantitative yield (4 mg) as a white lyophilisate.



$$[\alpha]_D^{20} = -5.4^\circ \text{ (c = 0.5, H}_2\text{O)}$$

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ = 6.13 (d, 1H, J_{2-P} = 19.8 Hz, H-2); 4.15 (bs, 1H, H-3); 3.71 (m, 2H, H-5, H-4); 3.49 (1d, 3H, POOCH_3); 2.56 (m, 1H, H-6); 2.16 (m, 1H, H-6'), 1.95 (s, 3H, NHAc) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, D_2O): δ = 175.0 (NHCOCH_3); 137.5 (C-2); 70.8 (C-3); 67.6 (C-5); 58.0 (C-4); 51.4 (POOCH_3), 33.3 (C-6); 22.0 (COCH_3) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ = 16.2 (s, PO_3Me^-) ppm.

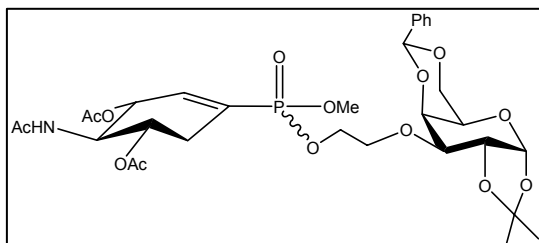
$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_6\text{P}$ (M 265.1)

MALDI-MS (positive mode, matrix DHB, THF):

m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ = 288.1; m/z obtained: 288.2

m/z [$\text{M} + \text{K}$] $^+$ = 304.1; m/z obtained: 304.3

***O*-Methyl-*O*-[4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(1'-ethyl)-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranoside-2'-yl](3*R*,4*R*,5*S*)-4-acetamido-3,5-diacetoxy-1-cyclohexene-phosphonate (63) (h,l)**



To a solution of 15 mg (0.043 mmol) of acid **62** in 1 ml of abs. THF were added 30 mg (0.086 mmol) of galactose **43**, 23 mg (0.086 mmol) of Ph_3P and 17 μl (0.086 mmol) of DIAD. The reaction was stirred at 60°C for

48 hours. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was purified by flash chromatography (EA:Tol 10:1 \rightarrow EA:MeOH 10:1) to afford 15 mg (0.022 mmol, 51 %) of **63** as a colourless syrup.

TLC (EA:MeOH 10:1): R_f = 0.33

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 7.51-7.25 (m, 5H, C_6H_5); 6.44 (m, 1H, H-2a); 5.74 (s, 1H, CHPh); 5.61 (d, 1H, J_{1-2} = 5.4 Hz, H-1b); 5.50 (m, 1H, H-3a); 5.05 (m, 1H, H-5a); 4.63 (dd, 1H, J_{2-3} = 2.4 Hz, J_{3-4} = 8.4 Hz, H-3b); 4.41 (dd, 1H, J_{1-2} = 5.4 Hz, J_{2-3} = 2.4 Hz, H-2b); 4.36 (dd, 1H, J_{3-4} = 9.0 Hz, H-4a); 4.31 (dd, 1H, J_{3-4} = 8.4 Hz, J_{4-5} = 1.8 Hz, H-4b); 4.20-4.06 (m, 4H, H-5b, 3H from chain); 3.74-3.60 (m, 6 H, POOMe ,

H-6' b, H-6b, 1H from chain); 2.70 (m, 1H, H-6a); 2.43 (m, 1H, H-6a'); 2.04, 2.02 (2s, 6H, OAc); 1.90 (s, 3H, NHAc); 1.55, 1.33 (2s, 6H, C(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 171.1 (NHCOCH₃); 171.0 (COCH₃); 170.1 (COCH₃); 139.1 (C-2a); 136.2 (C-Ph); 128.8-126.3 (C₆H₅); 110.0 (C(CH₃)₂); 103.7 (CHPh); 96.3 (C-1b); 71.8 (C-3b); 71.5 (C-4b, C-3a); 70.0 (C-6b); 69.9 (C-2b); 68.6 (C-5a); 66.8 (C-5b); 65.3 (CH₂O); 53.0 (C-4a); 52.5 (POOCH₃); 30.4 (C-6a); 26.0, 24.9 (C(CH₃)₂); 23.3-20.8 (COCH₃) ppm.

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ = 18.3, 18.0 (2s, PO₃Me₂) ppm.

C₃₁H₄₂NO₁₄P (M 683.2)

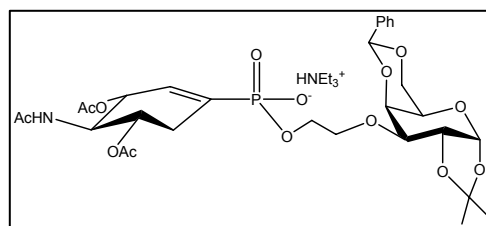
MALDI-MS (positive mode, matrix DHB, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 706.2$; $m/z \text{ obtained: } 706.4$

$m/z [M + K]^+ = 722.2$; $m/z \text{ obtained: } 722.5$

Triethylammonium [4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(1'-ethyl)-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranoside-2'-yl] (3R,4R,5S)-4-acetamido-3,5-diacetoxy-1-cyclohexene-phosphonate (64)

15 mg (0.022 mmol) of **63** were dissolved in 500 μ l of dry THF. 42 μ l (0.31 mmol) of NEt₃ and 16 μ l (0.15 mmol) of HSPH were added. The reaction was stirred at room temperature for two days. The solvent was removed and the following



flash chromatography (EA:MeOH 10:1→5:1, 1 % NEt₃) yielded 9 mg (0.01 mmol, 60 %) of **64** as a white triethylammonium salt.

TLC (EA:MeOH 5:1): $R_f = 0.1$

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 7.51-7.35 (m, 5H, C₆H₅); 6.22 (d, 1H, J_{2-P} = 18.6 Hz, H-2a); 5.74 (s, 1H, CHPh); 5.57 (d, 1H, J₁₋₂ = 5.4 Hz, H-1b); 5.49 (pd, 1H, J₃₋₄ = 8.4 Hz, H-3a); 5.06 (dd, 1H, J₄₋₅ = 9.6 Hz, J₅₋₆ = 5.4 Hz, H-5a); 4.65 (dd, 1H, J₂₋₃ = 2.4 Hz, J₃₋₄ = 8.4 Hz, H-3b); 4.45 (dd, 1H, J₁₋₂ = 5.4 Hz, J₂₋₃ = 2.4 Hz, H-2b); 4.33

(dd, 1H, $J_{3-4} = 8.4$ Hz, $J_{4-5} = 1.8$ Hz H-4b); 4.22 (dd, 1H, $J_{3-4} = 8.4$ Hz, $J_{4-5} = 9.6$ Hz, H-4a); 4.08-4.06 (m, 1H, H-5b); 3.90-3.80 (m, 2H, from chain); 3.75-3.60 (m, 4H, 2H from chain, H-6b, H-6b'); 3.15 (q, 6H, CH_2CH_3); 2.83 (m, 1H, H-6a); 2.42 (m, 1H, H-6a'); 2.08, 2.00 (2s, 6H, OAc); 1.89 (s, 3H, NHAc); 1.53, 1.34 (2s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1.29 (t, 9H, CH_2CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_3OD): $\delta = 170.6$ (NHCOCH_3); 170.5 (COCH_3); 170.5 (COCH_3); 136.8 (C-2a); 133.1 (C-Ph); 129.3-127.5 (C_6H_5); 109.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 104.7 (CHPh); 97.6 (C-1b); 73.0 (C-3a, C-3b); 72.8 (C-4b); 72.1 (C-6b); 71.5 (C-2b); 70.7 (C-5a); 68.0 (C-5b); 64.6 (CH_2O); 53.9 (C-4a); 47.1 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); 32.0 (C-6a); 25.0, 23.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 21.3-19.5 (COCH_3); 19.4 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): $\delta = 11.9$ (s, PO_3R^-) ppm.

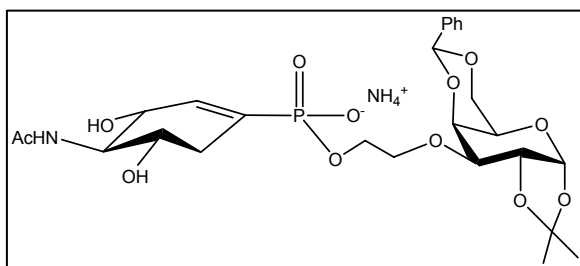
$\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{NO}_{14}\text{P}$ (M 669.2) (free acid)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [\text{M} + \text{Na}]^+ = 692.2$; m/z obtained: 692.5

$m/z [\text{M} + \text{K}]^+ = 708.2$; m/z obtained: 708.5

Ammonium [4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(1'-ethyl)-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranoside-2'-yl] (3R,4R,5S)- 4-actamido-3,5-dihydroxy-1-cyclohexene-phosphonate (65)



8 mg (0.01 mmol) of **64** were dissolved in 1 ml of water/dioxane and 8 drops of 25 % NH_3 - solution were added. The reaction was stirred at room temperature for 4 days. The solvents were evaporated and

the crude product was lyophilized from water to afford 6 mg of **65** in quantitative yield as a white salt.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.51$ -7.35 (m, 5H, C_6H_5); 6.28 (d, 1H, $J_{2-P} = 13.2$ Hz, H-2a); 5.73 (s, 1H, CHPh); 5.59 (d, 1H, $J_{1-2} = 4.8$ Hz, H-1b); 4.65 (dd, 1H, $J_{2-3} = 2.4$ Hz, $J_{3-4} = 8.4$ Hz, H-3b); 4.45 (dd, 1H, $J_{1-2} = 4.8$ Hz, $J_{2-3} = 2.4$ Hz, H-2b); 4.34 (dd,

1H, $J_{3-4} = 8.4$ Hz, $J_{4-5} = 1.8$ Hz, H-4b); 4.10-4.00 (m, 2H, H-5b, H-3a); 3.90-3.85 (m, 2H from chain); 3.78-3.60 (m, 6H, 2H from chain, H-4a, H-5a, H-6b, H-6b'); 2.72 (m, 1H, H-6a); 2.25 (m, 1H, H-6a'); 2.08 (1s, 3H, NHAc); 1.53, 1.34 (2s, 6H, C(CH₃)₂), ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD): $\delta = 174.5$ (NHCOCH₃); 138.2 (C-2a); 130.7-127.5 (C₆H₅); 110.0 (C(CH₃)₂); 104.5 (CHPh); 97.4 (C-1b); 72.9 (C-3b); 72.5 (C-4b); 72.4 (C-6b); 71.9 (CH₂O); 71.2 (C-2b); 70.8 (C-5b); 69.4 (C-5a); 67.8 (C-3a); 64.3 (CH₂O); 59.9 (C-4a); 35.1 (C-6a); 26.3-25.1 (C(CH₃)₂); 23.2 (COCH₃) ppm.

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): $\delta = 13.9$ (s, PO₃R⁻) ppm.

C₂₆H₃₆NO₁₂P (M 585.2) (free acid)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [M + Na]⁺ = 608.2; m/z obtained: 608.3

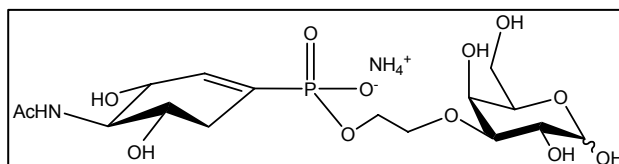
m/z [M + K]⁺ = 624.2; m/z obtained: 624.4

Ammonium [3-O-(1'-ethyl)- α , β -D-galactopyranoside-2'-yl](3R,4R,5S)-4-acetamido-3,5-dihydroxy-1-cyclohexenephosphonate (**66**)

5 mg (9 μ mol) of **65** were dissolved in 1 ml of 50 % TFA and stirred over night.

The solvent was evaporated and the residue was lyophilized from water to

afford 3 mg of **66** in quantitative yield as a white salt.



¹H-NMR (600 MHz, D₂O): $\delta = 6.16$ (d, 2H, $J_{2-P} = 19.8$ Hz, H-2a), 5.14 (d, 0.8H, $J_{1-2} = 4.2$ Hz, H-1b α); 4.47 (dd, 1.3 H, $J_{1-2} = 7.8$ Hz, H-1b β); 4.20-4.10 (m, 3H, H-3a both anomers); 3.86-3.59 (m, 25 H, H-4a, H-5a, H-6b, H-6b' both anomers, CH₂CH₂O, H-3b α , H-2b α , H-5b, H-4b both anomers); 3.53 (dd, 1.3 H, $J_{2-3} = 9.6$ Hz, $J_{3-4} = 3.6$ Hz, H-3b β); 3.37 (dd, 1.3 H, $J_{1-2} = 7.8$ Hz, $J_{2-3} = 9.6$ Hz, H-2b β); 2.57 (m, 2H, H-6a); 2.14 (m, 2H, H-6a'); 1.95 (1s, 6H, NHAc) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O): (exhorted data) $\delta = 174.5$ (NHCOCH₃); 138.1 (C-2a); 96.2 (C-1b β); 92.1 (C-1b α); 72.5 (C-3b β); 71.6 (C-2b β); 33.2 (C-6a); 22.2 (COCH₃); ppm.

^{31}P -NMR (162 MHz, D_2O). $\delta = 15.6$ (s, PO_3R^-) ppm.

$\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{NO}_{12}\text{P}$ (M 457.1) (free acid)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [\text{M} + \text{Na}]^+ = 480.1$; m/z obtained: 480.2

$m/z [\text{M} + \text{K}]^+ = 496.1$; m/z obtained: 496.2

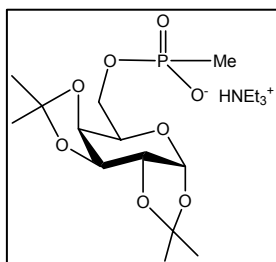
HR-ESI-MS

$m/z [\text{M} + 2\text{Na}-\text{H}]^+ = 502.1072$; m/z obtained: 502.1060

Methanephosphonic acid (67)

Compound **67** was purchased from Aldrich and used without further purification.

Triethylammonium *O*-[1,2:3,4-di-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranos-6-yl] methylphosphonate (68)



21 mg (0.21 mmol) of **67** were dissolved in 2 ml of abs. THF. 100 mg (0.380 mmol) of galactose **19** and 110 mg (0.380 mmol) of Ph_3P were added under argon. 75 μl (0.38 mmol) of DIAD were added and the mixture was stirred at 60°C for two days.

The solvent was evaporated and the residue was purified by flash chromatography (EA:Tol 10:1 \rightarrow EA:MeOH 4:1, 1 % NEt_3) to afford 45 mg (0.11 mmol, 52 %) of **68** as a colourless triethylammonium salt.

TLC (EA:MeOH 5:1): $R_f = 0.07$

$[\alpha]_D^{20} = -40.2^\circ$ ($c = 1$, MeOH)

^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 5.48$ (d, 1H, $J_{1-2} = 4.8$ Hz, H-1); 4.63 (dd, 1H, $J_{2-3} = 2.4$ Hz, $J_{3-4} = 7.8$ Hz, H-3); 4.36 (dd, 1H, $J_{1-2} = 4.8$ Hz, $J_{2-3} = 2.4$ Hz, H-2); 4.30 (dd, 1H, $J_{3-4} = 7.8$ Hz, $J_{4-5} = 1.2$ Hz, H-4); 4.04-3.91 (m, 3H, H-5, H-6, H-6'); 3.18 (q, 6H,

$N(CH_2CH_3)_3$; 1.50 (s, 6H, $C(CH_3)_2$); 1.39 (s, 6H, $C(CH_3)_2$); 1.36-1.29 (m, 15H, $P-CH_3$ and $N(CH_2CH_3)_3$) ppm.

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD): δ = 109.8 (α - $C(CH_3)_2$); 97.9 (C-1); 72.2 (C-3); 72.1 (C-4); 71.9 (C-2); 68.8 (C-5); 64.7 (C-6); 47.5 ($N(CH_2CH_3)_3$); 26.5, 26.4 (each CH_3 of $C(CH_3)_2$); 12.5 ($N(CH_2CH_3)_3$); 11.6 (PMe) ppm.

^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD): δ = 27.8 (s, PCH_3) ppm.

$C_{13}H_{23}O_8P$ (M 338.11) (free acid)

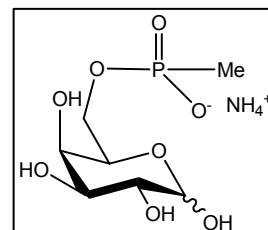
MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 361.1$; m/z obtained: 360.4

Ammonium *O*-[α,β -D-galactopyranos-6-yl-] methylphosphonate (**69**)

10 mg (0.023 mmol) of ammonium salt **68** were dissolved in 2 ml of 50 % TFA and stirred at room temperature over night.

The reaction product was lyophilized and then dissolved in 1M NH_4HCO_3 - buffer and lyophilized again, this afforded 6 mg (0.02 mmol, 95 %) of **69** as a white ammonium salt.



1H -NMR (600 MHz, CD_3OD): δ = 5.15 (d, 1H, $J_{1-2} = 4.2$ Hz, H-1 α); 4.49 (d, 2H, $J_{1-2} = 8.4$ Hz, H-1 β); 4.02-3.70 (m, 14H, H-4, H-5, H-6, H-6' both anomers and H-2 α , H-3 α); 3.55 (dd, 2H, $J_{2-3} = 3.6$ Hz, $J_{3-4} = 9.0$ Hz, H-3 β); 3.38 (dd, 2H, $J_{1-2} = 8.4$ Hz, H-2 β); 1.21 (d, 6H, PCH_3) ppm.

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD): δ = 96.4 (C-1 β); 92.3 (C-1 α); 72.5 (C-3); 71.7 (C-2); 10.6 (PMe) ppm, C4-C6 unresolved.

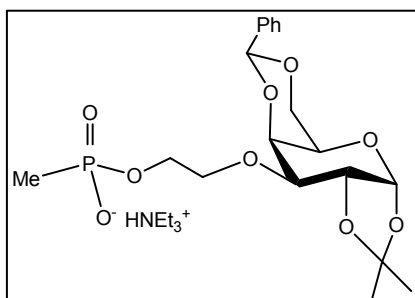
^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD): δ = 28.6 (s, PCH_3) ppm.

$C_7H_{15}O_8P$ (M 258.1) (free acid)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 281.1$; m/z obtained: 281.1

Triethylammonium *O*-[4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(1'-ethyl)-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranoside-2'-yl] methylphosphonate (70)



15 mg (0.16 mmol) of methanephosphonic acid **67** were dissolved in 2 ml of abs. THF. 82 mg (0.23 mmol) of galactose **41** and 61 mg (0.23 mmol) of Ph_3P were added under an argon atmosphere. Subsequently 46 μl (0.23 mmol) of DIAD were added and the mixture was stirred at 60°C for two days.

The solvent was removed *in vacuo*. Purification by flash chromatography (EA:Tol 10:1 \rightarrow EA:MeOH 10:1 \rightarrow 4:1, 1 % NEt_3) afforded triethylammonium salt **70** as a colourless syrup (37 mg, 0.068 mmol, 42 %).

TLC (EA:Tol 10:1): $R_f = 0.1$

$[\alpha]_D^{20} = -40.3^\circ$ (c = 1, CD_3OD)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.51\text{-}7.35$ (m, 5H, C_6H_5); 5.72 (s, 1H, H_{Ph}); 5.57 (d, 1H, $J_{1-2} = 4.8$ Hz, H-1); 4.66 (dd, 1H, $J_{2-3} = 2.4$ Hz, $J_{3-4} = 8.4$ Hz, H-3); 4.46 (dd, 1H, $J_{1-2} = 4.8$ Hz, $J_{2-3} = 2.4$ Hz, H-2); 4.31 (dd, 1H, $J_{3-4} = 8.4$ Hz, $J_{4-5} = 1.8$ Hz, H-4); 4.08 (m, 1H, H-5); 4.02-3.98 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 3.73 (dd, 1H, $J_{5-6} = 5.4$ Hz, $J_{5-6} = 10.2$ Hz, H-6); 3.65-3.60 (m, 3H, H-6', $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 3.15 (q, 6H, CH_2CH_3); 1.51 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1.34 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1.32-1.25 (m, 12H, P- CH_3 and CH_2CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_3OD): $\delta = 138.2$ (C-Ph); 130.7-127.5 (C_6H_5); 110.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 104.5 (CHPh); 97.5 (C-1); 72.9 (C-2); 72.5 (C-4); 71.7 (C-a); 71.1 (C-3); 70.8 (C-6); 67.8 (C-5); 64.4 (C-b); 47.2 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); 26.3, 25.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 12.6 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); 11.7 (P- CH_3) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): $\delta = 27.3$ (s, P- CH_3) ppm.

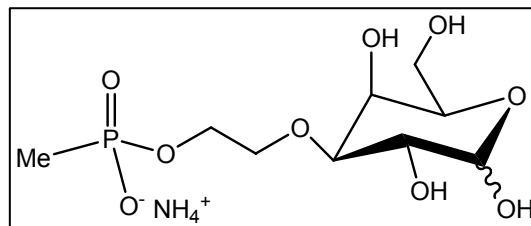
$\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_9\text{P}$ (M 444.2) (free acid)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [$\text{M} + \text{Na} + \text{H}$] $^+ = 468.2$; m/z obtained: 468.8

Ammonium *O*-[3-*O*-(1'-ethyl)- α,β -D-galactopyranoside-2'-yl] methylphosphonate (71)

10 mg (0.018 mmol) of **70** were dissolved in 2 ml of 50 % TFA and stirred at room temperature over night. The reaction product was lyophilized and then dissolved in 1M NH_4HCO_3 - buffer and lyophilized again, this afforded 7 mg (0.02 mmol, 93 %) of **71** as a white salt.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ = 5.14 (d, 1H, J_{1-2} = 3.6 Hz, H-1 α); 4.45 (d, 2H, J_{1-2} = 7.8 Hz, H-1 β); 3.97-3.60 (m, 25 H, H-4, H-5, H-6, H-6', $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ both anomers and H-2 α , H-3 α); 3.51 (dd, 2H, J_{2-3} = 3.6 Hz, J_{3-4} = 9.0 Hz, H-3 β); 3.35 (dd, 2H, J_{1-2} = 7.8 Hz, H-2 β); 3.05 (q, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); 1.32-1.28 (2s, 6H, PCH_3); 1.12 (t, 9H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, D_2O): δ = 96.5 (C-1 β); 92.2 (C-1 α); 72.7 (C-3); 71.8 (C-2); 46.8 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); 11.9 (PMe), 11.5 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$) ppm, 4C unresolved.

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O). δ = 27.9 (s, PCH_3) ppm.

$\text{C}_9\text{H}_{19}\text{O}_9\text{P}$ (M 302.1) (free acid)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [$\text{M} + \text{K-H}$] $^+$ = 340.1; m/z obtained: 340.8

HR-ESI-MS

m/z [$\text{M} + 2\text{Na-H}$] $^+$ = 347.0459; m/z obtained: 347.0478

Lactose (72)

Compound **72** was purchased from Fluka and used without further purification.

Acetobromolactose (73)

Compound **73** was synthesized according to the literature.^[97]

The analytical data correspond to those reported.

Methyl (2,3,6-tri-*O*-acetyl-4-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl])- β -D-glucopyranoside (74)

To a solution of 6.8 g (0.031 mol) of HgO and 468 mg (1.30 mmol) of HgBr₂ in 250 ml of abs. MeOH was added Dierite. The mixture was stirred for 30 min. Then a solution of 20 g (0.029 mol) acetobromolactose **73** in 250 ml of abs. MeOH was added and the reaction stirred at room temperature for 12 h.

The solvent was evaporated and the residue was dissolved in DCM. The salts were removed by filtration and the filtrate was washed with 30 % KI- solution. The organic phase was dried over MgSO₄. Purification by flash chromatography (Tol:EA 1:3) afforded 9.0 g (13.8 mmol, 48 %) of **74** as a colourless foam.

The analytical data correspond to those reported.^[98]

Methyl 4-*O*- (β -D- galactopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (75)

9 g (13.8 mmol) of **74** were dissolved in 15 ml of hot MeOH. 3 ml NaOMe-solution (1M) were added and the reaction was stirred at room temperature for 1 h. The product crystallized at 4°C. The solid product was washed with DCM until the washing solution remained neutral. This afforded 4.7 g (13 mmol, 96 %) of **75** as a white powder.

The analytical data correspond to those reported.^[99]

Methyl 4-*O*-(4,6-*O*- benzylidene- β -D- galactopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (76)

Compound **76** was synthesized according to the literature.

The analytical data correspond to those reported.^[85]

1-Benzoyloxy-5-iodo-3-oxapentane (77)

Compound **77** was synthesized over three steps from diethylene glycol by monobenylation, tosylation and iodation according to the literature.

The analytical data correspond to those reported.^[86]

Methyl 4-*O*-(4,6-*O*-benzylidene- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)- β -D-glucopyranoside (78)

Compound **78** was synthesized according to the literature.^[85]

The analytical data correspond to those reported.

Methyl 2,3-di-*O*-benzyl-4-*O*-(2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-galactopyranosyl) - 6-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)- β -D-glucopyranoside (79)

Compound **79** was synthesized according to the literature. The analytical data correspond to those reported.^[85]

Methyl 2,3-di-*O*-benzyl-4-*O*-(2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (80)

Compound **80** was synthesized according to the literature.^[85]

The analytical data correspond to those reported.

2-[2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)ethoxy]ethoxyethyl iodide (81)

Compound **81** was prepared from 2-(2-chloroethoxy)ethanol in two steps by silylation and halide exchange.

The analytical data correspond to those reported.^[100]

6-*tert*-Butyldimethylsilyl-3-oxahexyl -*p*-toluene-sulfonate (82)

Compound **82** was prepared from diethylene glycol in two steps by silylation and tosylation.

The analytical data correspond to those reported.^[101]

6-*tert*-Butyldimethylsilyl-3-oxahexyl -*p*-nitrotoluene-sulfonate (83)

Compound **83** was prepared from diethylene glycol in two steps by silylation and nosylation.

The analytical data correspond to those reported.^[102]

6-*tert*-Butyldimethylsilyl-3-oxahexyl trifluoromethanesulfonate (84)

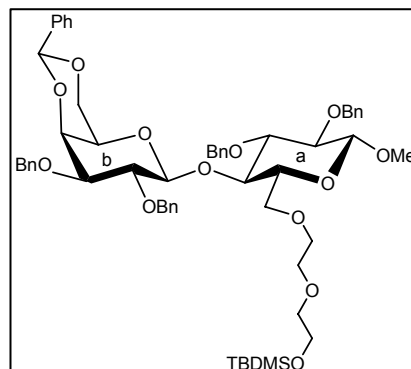
300 mg (1.36 mmol) of 2-(2-*tert*-butyldimethylsilyloxyethoxy)ethanol was dissolved in 10 ml of abs. toluene. 247 μ l (1.77 mmol) of abs. NEt₃ were added and the solution was cooled to -20°C. 252 μ l (1.5 mmol) of triflic anhydride were added under argon. After 10 min a white salt precipitated. The solution was filtered and the residual **84** was used without further purification.

TLC (EA: Tol 1:5): $R_f = 0.70$

It was not possible to obtain correct analytical data of this unstable compound.

Methyl 2,3-di-O-benzyl-6-O-(5'-*tert*-butyldimethylsilyloxy-3'-oxapentyl)-4-O-(2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-β-D-galactopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (85)

80 mg (0.090 mmol) of **80** were dissolved in 2 ml of dry DMF and 4.77 mg (0.19 mmol) NaH were added at 0°C. After 30 min 75 mg (0.19 mmol) of **82** and 40 μl of 15-crown-5 were added. The reaction was stirred at 90°C for 4 days. The reaction was diluted with MeOH and the solvents were removed *in vacuo*. Purification by flash chromatography (Tol:EA 2:1) afforded **85** (10 mg, 0.009 mmol, 11 %) as a colourless syrup.



TLC (EA:Tol 1:2): $R_f = 0.55$

$[\alpha]_D^{20} = +5.4^\circ$ ($c = 0.5$, CDCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.45\text{--}7.18$ (m, 25H, C_6H_5); 5.47 (s, 1H, CHPh); 5.18 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz, CH_2Ph); 4.85 (m, 2H, CH_2Ph); 4.77 (m, 2H, CH_2Ph); 4.71 (m, 2H, CH_2Ph); 4.59 (d, 1H, $J_{1-2} = 7.8$ Hz, Hb-1); 4.26-4.24 (m, 2H, Ha-1, Hb-6_b); 4.09 (d, 1H, $J_{3-4} = 3.6$ Hz, Hb-4); 3.95-3.71 (m, 7H, Ha-4, Hb-6_a, Ha-6_a, Hb-2, 3H from chain CH_2O); 3.65-3.56 (m, 5H, Ha-6_b, Ha-3, Hb-3, 2H from chain CH_2O), 3.53 (s, 3H, OMe), 3.49-3.45 (m, 3H, CH_2O); 3.38 (m, 1H, Ha-2); 3.30 (m, 1H, Ha-5), 3.24 (bs, 1H, Hb-5); 0.9 (s, 18H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 0.2 (s, 12 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 138.2$ (C-Ph); 128.8-126.6 (C_6H_5); 104.8 (C-1a); 103.1 (C-1b); 101.5 (CHPh); 83.1 (C-3a); 82.1 (C-2a); 80.1 (C-3b); 79.1 (C-2b); 77.8 (C-4a); 75.2 (C-5a); 74.0 (C-4b); 72.7-70.8 (CH_2O); 69.1 (C-6b); 69.0 (C-6a); 66.5 (C-5b); 57.2 (OCH₃); 18.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); -5.0 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$) ppm, 4C unresolved.

$\text{C}_{58}\text{H}_{74}\text{O}_{13}\text{Si}$ (M 1006.5)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [M + Na]⁺ = 1029.5; m/z obtained: 1030.2

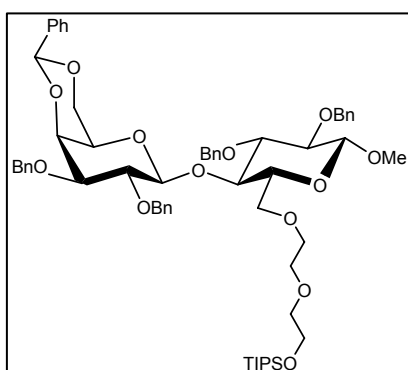
m/z [M + K]⁺ = 1045.5; m/z obtained: 1046.2

2-(2-Triethylsiloxyethoxy)ethanol (87)

Compound **87** was prepared from diethylene glycol according to the literature.

The analytical data correspond to those reported.^[103]

Methyl 2,3-di-*O*-benzyl-6-*O*-(5'-trisopropylsiloxy-3'-oxapentyl)-4-*O*-(2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-β-D-galactopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (88)



1.00 g (1.24 mmol) of **80** was dissolved in 50 ml of abs. DCM. 290 μ l (2.48 mmol) of 2,6-lutidine were added and the reaction was cooled to -20°C . 251 μ l (1.50 mmol) of triflic anhydride in 10 ml abs. DCM were added dropwise via canula. The reaction stirred for 2 h. The solvents were removed *in vacuo* and the crude product was filtered through a short column of silica gel

with DCM as solvent to afford triflate **86** as a yellow foam (700 mg, 0.75 mmol, 60 %). This instable product was added to a solution of 773 μ l (2.90 mmol) of **87** in 40 ml of abs. DMF and 71 mg NaH at 0°C .

The reaction mixture was allowed to warm to room temperature over night.

The DMF was removed *in vacuo* and the crude product was first purified by flash chromatography (EA:Tol 1:2) to remove the elimination product. Purification by MPLC (reverse phase, acetonitrile: water 4:1) afforded 60 mg (0.057 mmol, 5 %) of **88** as a white syrup.

TLC (EA:Tol 1:2): $R_f = 0.57$

$[\alpha]_D^{20} = +7.8^{\circ}$ ($c = 1$, CDCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.51\text{-}7.13$ (m, 25H, C_6H_5); 5.47 (s, 1H, CHPh); 5.17 (d, 1H, $J = 12$ Hz, CH_2Ph); 4.85 (m, 2H, CH_2Ph); 4.77 (m, 2H, CH_2Ph); 4.71 (m, 2H, CH_2Ph); 4.59 (d, 1H, $J_{1-2} = 7.8$ Hz, Hb-1); 4.26-4.24 (m, 2H, Ha-1, Hb-6_b); 4.09 (d, 1H, $J_{3-4} = 3$ Hz, Hb-4); 3.95-3.71 (m, 7H, Ha-4, Hb-6_a, Ha-6_a, Hb-2, 3H from chain CH_2O); 3.65-3.55 (m, 5H, Ha-6_b, Ha-3, Hb-3, 2H from chain CH_2O), 3.52 (s, 3H, OMe), 3.49-3.47 (m, 3H, CH_2O); 3.37 (dd, 1H, $J_{1-2} = 6.6$ Hz, $J_{2-3} = 10.8$ Hz, Ha-2); 3.30 (m, 1H, Ha-5), 3.24 (bs, 1H, Hb-5); 1.0 (s, 27H, TIPS) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 138.0$ (C-Ph); 128.0 - 126.0 (C_6H_5); 104.6 (C-1a); 103.1 (C-1b); 101.3 (CHPh); 82.9 (C-3a); 81.9 (C-2a); 79.8 (C-3b); 78.9 (C-2b); 77.6 (C-4a); 73.8 (C-4b); 72.6-70.7 (CH_2O); 68.9 (C-6b); 68.7 (C-6a); 66.4 (C-5b); 57.0 (OCH₃); 18.1 (C(CH₃)₃); 11.9 (C(CH₃)₃) ppm, 5C unresolved.

$\text{C}_{61}\text{H}_{80}\text{O}_{13}\text{Si}$ (M 1048.5)

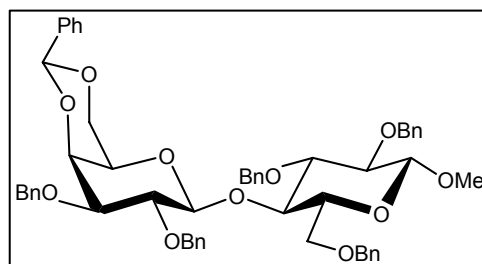
MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [M + Na]⁺ = 1071.5; m/z obtained: 1072.2

m/z [M + K]⁺ = 1087.5; m/z obtained: 1088.2

Methyl 2,3,6-tri-*O*-benzyl-4-*O*-(2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (89)

400 mg (0.910 mmol) of **76** were dissolved in 20 ml of abs. DMF. 1.07 ml (9.10 mmol) of benzyl bromide were added and the reaction was cooled to 0°C. 216 mg (9.10 mmol) of NaH were added in portions. The reaction was stirred over night at



room temperature. Then the reaction was quenched by adding 4 ml MeOH. The mixture was poured into ice-water and extracted with toluene several times. The organic phases were combined and dried over MgSO_4 . The residue was purified by flash-chromatography (Tol:EA 20:1) to afford 793 mg (0.88 mmol, 97 %) of **89** as a colourless product.

TLC (Tol:EA 9:1): $R_f = 0.67$

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.52$ -7.14 (m, 30H, C_6H_5); 5.46 (s, 1H, CHPh); 5.18 (d, 1H, $J = 10.8$ Hz, CH_2Ph); 4.93-4.68 (m, 10H, 5 x CH_2Ph); 4.55 (bs, 1H, Hb-1); 4.45 (d, H, CH_2Ph); 4.35-4.28 (m, 2H, Ha-1, Hb-6_b); 4.00-3.62 (m, 8H, Hb-4, Ha-4, Hb-6_a, Ha-6_a, Hb-2, Ha-6_b, Ha-3, Hb-3), 3.54 (s, 3H, OMe), 3.46-3.35 (m, 3H, Ha-2, Ha-5, Hb-5) ppm.

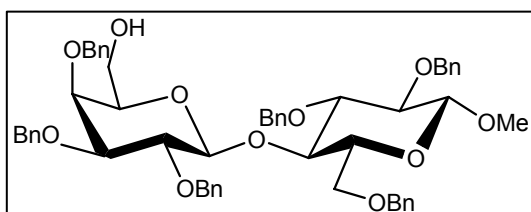
$C_{55}H_{58}O_{11}$ (M 894.4)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 917.4$; m/z obtained: 917.6

$m/z [M + K]^+ = 933.4$; m/z obtained: 933.5

Methyl 2,3,6-tri-*O*-benzyl-4-*O*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**90**)



To a solution of 800 mg (0.890 mmol) of **89** in 35 ml of abs. DCM were added 8.9 ml (8.9 mmol) of borane (1M in THF) and 890 μ l (0.890 mmol) of Bu_2BOTf at 0°C. The reaction was stirred for 2 h at this temperature. The

reaction was neutralized with NEt_3 . MeOH was added to destroy excess borane. The solvents were evaporated and the residue was purified by flash chromatography (Tol:EA 9:1) to afford 572 mg (0.64 mmol, 72 %) of **90** as a colourless powder.

TLC (EA:Tol 1:2): $R_f = 0.1$

$[\alpha]_D^{20} = +2.4^\circ$ (c = 0.5, $CDCl_3$)

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.33$ -7.17 (m, 30 H, C_6H_5); 5.01 (d, 1H, J = 10.8 Hz, $CHPh$); 4.95 (d, 1H, J = 12 Hz, CH_2Ph); 4.83 (d, 1H, J = 12 Hz, $CHPh$); 4.79-4.69 (m, 5H, CH_2Ph); 4.57 (m, 2H, CH_2Ph); 4.40 (m, 1H, $CHPh$); 4.37 (d, 1H, $J_{1-2} = 8.4$ Hz, Hb-1); 4.28 (d, 1H, $J_{1-2} = 7.8$ Hz, Ha-1); 3.87 (pt, 1H, $J_{3-4} = 9.6$ Hz, Ha-4); 3.81-3.63 (m, 4H, Ha-6_a, Ha-6_b, Hb-2, Hb-4); 3.55 (m, 4H, OMe, Ha-3), 3.50 (m, 1H, Hb-6_a); 3.40-3.31 (m, 3H, Ha-2, Ha-5, Hb-3); 3.29 (dd, 1H, $J_{5-6'} = 4.8$ Hz, $J_{6-6'} = 11.4$ Hz, Hb-6_b); 3.14 (dd, 1H, $J_{4-5} = 7.2$ Hz, $J_{5-6'} = 4.8$ Hz, Hb-5) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ = 138.2 (C-Ph); 128.4-127.3 (C_6H_5); 104.7 (C-1a); 103.0 (C-1b); 82.7 (C-3a); 82.6 (C-2a); 81.9 (C-3b); 79.9 (C-2b); 77.2 (C-4a); 75.2 (C-5a); 74.8 (C-5b); 73.6 (C-4b); 68.3 (C-6a); 61.9 (C-6a); 57.1 (OCH_3); ppm, 6C unresolved.

$\text{C}_{55}\text{H}_{60}\text{O}_{11}$ (M 896.4)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

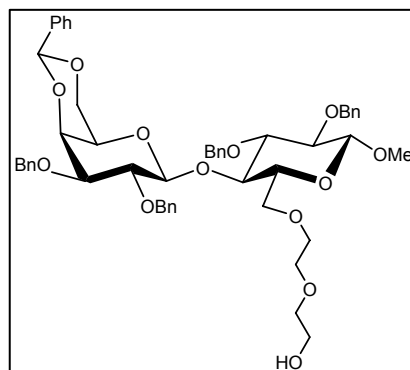
m/z [M + Na] $^+$ = 919.4; m/z obtained: 919.1

m/z [M + K] $^+$ = 935.4; m/z obtained: 935.1

Methyl 2,3-di-*O*-benzyl-6-*O*-(5'-hydroxy-3'-oxapentyl)-4-*O*-(2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (91)

30 mg (0.029 mmol) of **88** were dissolved in 3 ml of abs. THF and cooled to 0°C. 32 μl (0.032 mmol) of TBAF (1M in THF) were added and the reaction was stirred at room temperature for 2 h.

The solvent was evaporated and the product was purified by flash chromatography (EA:Tol 10:1) to afford **91** in quantitative yield (25 mg) as a yellow foam.



TLC (EA:Tol 10:1): R_f = 0.37

$[\alpha]_D^{20}$ = +3.4° (c = 1, CDCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ = 7.46-7.17 (m, 25H, C_6H_5); 5.48 (s, 1H, CHPh); 5.18 (d, 1H, J = 12 Hz, CH_2Ph); 4.86 (d, 2H, CH_2Ph); 4.77-4.71 (m, 5H, CH_2Ph); 4.57 (d, 1H, J_{1-2} = 7.8 Hz, Hb-1); 4.27 (d, 1H, J_{1-2} = 7.8 Hz, Ha-1); 4.24 (pd, 1H, $J_{6-6'}$ = 11.4 Hz, Hb-6a); 4.11 (pd, 1H, J_{3-4} = 3.6 Hz, Hb-4); 3.92-3.86 (m, 3H, Ha-4, Hb-6b, Ha-6a); 3.80 (dd, 1H, J_{1-2} = 7.8 Hz, J_{2-3} = 9.6 Hz, Hb-2); 3.67-3.54 (m, 5H, Ha-6b, Ha-3, Hb-3, 2H from chain CH_2O); 3.54 (m, 6H, OMe, 3H from chain CH_2O); 3.50-3.47 (m, 3H, from

chain CH₂O); 3.38 (dd, 1H, J₁₋₂ = 7.8 Hz, J₂₋₃ = 9.6 Hz, Ha-2); 3.32 (m, 1H, Ha-5); 3.25 (m, 1H, Hb-5) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD): δ = 138.0 (C-Ph); 128.0-125.3 (C₆H₅); 104.6 (C-1a); 102.9 (C-1b); 101.2 (CHPh); 82.9 (C-3a); 81.8 (C-2a); 79.6 (C-3b); 78.9 (C-2b); 77.7 (C-4a); 74.9 (C-5a); 73.6 (C-4b); 72.3 (CH₂O); 70.7-70.2 (CH₂O); 68.9 (C-6b, C-6a); 66.3 (C-5b); 61.6 (CH₂O); 57.1 (OCH₃) ppm, 4C unresolved.

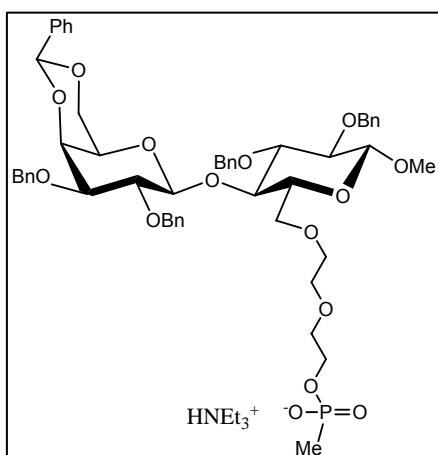
C₅₂H₆₀O₁₃ (M 892.4)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 915.4$; m/z obtained: 915.6

$m/z [M + K]^+ = 931.4$; m/z obtained: 931.8

Triethylammonium *O*-[methyl-2,3-di-*O*-benzyl-6-*O*-3'-oxapentan-4-*O*-(2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-β-D-galactopyranosyl)-β-D-glucopyranoside-5'-yl] methylphosphonate (**92**)



3 mg (0.03 mmol) of methanephosphonic acid **67** and 40 mg (0.045 mmol) of **91** were dissolved in 500 μl of abs. THF. 12 mg (0.045 mmol) of Ph₃P and 9.0 μl (0.045 mmol) of DIAD were added. The reaction was stirred at 60°C for two days.

The solvent was removed and the mixture was purified by flash chromatography (EA:Tol 10:1 → EA:MeOH 10:1 → 5:1, 1% NEt₃) to afford 3 mg (0.003 mmol, 10 %) of **92** as a white syrup.

TLC (EA:Tol 10:1): $R_f = 0.1$

$[\alpha]_D^{20} = +5.2^\circ$ (c = 0.5, CD₃OD)

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 7.33-7.13 (m, 25H, C₆H₅); 5.63 (s, 1H, CHPh); 5.24 (d, 1H, J = 12 Hz, CH₂Ph); 4.84-4.71 (m, 5H, CH₂Ph); 4.65 (m, 2H, Hb-1, 2H from CH₂Ph); 4.45 (bs, 1H, Hb-4); 4.33 (d, 1H, J₁₋₂ = 7.8 Hz, Ha-1); 4.28 (bd, 1H, Hb-6_a);

4.13 (dd, 1H, $J_{5-6} = 1.8$ Hz, $J_{6-6'} = 12$ Hz, Hb-6_b); 3.95-3.80 (m, 4H, Ha-4, Ha-6_a, 2H from chain CH₂O); 3.75-3.70 (m, 2H, Hb-2, Hb-3); 3.61 -3.50 (m, 11H, Ha-3, Ha-6_b, Hb-5, OCH₃, 5H from chain CH₂O); 3.47 (m, 2H, from chain CH₂O); 3.37 (m, 1H, Ha-5); 3.24 (dd, 1H, $J_{1-2} = 7.8$ Hz, $J_{2-3} = 9.6$ Hz, Ha-2); 3.19 (q, 6H, N(CH₂CH₃)₃); 1.28 (m, 12H, PCH₃, N(CH₂CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD): $\delta = 138.0$ (C-Ph); 128.0-125.0 (C₆H₅); 105.6 (C-1a); 103.8 (C-1b); 102.1 (CHPh); 84.1 (C-3a); 82.8 (C-2a); 80.9 (C-3b); 80.1 (C-2b); 78.2 (C-4a); 75.6 (C-5a); 74.4 (C-4b); 71.8-71.0 (CH₂O); 69.9 (C-6b); 69.4 (C-6a); 67.8 (C-5b); 64.3 (CH₂O); 57.1(OCH₃); 11.2 (PCH₃) ppm, 4 C unresolved.

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): $\delta = 26.5$ (s, PCH₃) ppm.

C₅₃H₆₃O₁₅P (M 970.4) (free acid)

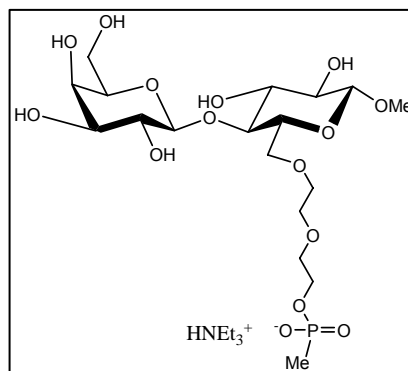
MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

m/z [M + Na]⁺ = 993.4; m/z obtained: 993.8

Triethylammonium *O*-[methyl-6-*O*-3'-oxapent-4-*O*- β -D-galactopyranosyl- β -D-glucopyranoside-5'-yl] methylphosphonate (93)

3 mg (0.003 mmol) of **92** were dissolved in THF/MeOH (1:1). A catalytic amount of Pd/C was added and the mixture was hydrogenated for 2 days under vigorous stirring.

The catalyst was removed by filtration. Further purification was not possible, for technical reasons, mainly because of the small amount of product.



¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 4.35$ (Hb-1), 4.16 (Ha-1); 3.88 (Ha-4); 3.78 (Ha-5); 3.75 (Hb-6_a); 3.68 (Hb-6_b); 3.66-3.50 (m, Hb-2, Ha-3, Hb-4, Hb-5, CH₂O, OMe); 3.21 (Ha-2) ppm (extracted data).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): $\delta = 29.1$ (s, PCH₃) ppm.

$C_{18}H_{35}O_{15}P$ (M 522.2) (free acid)

MALDI-MS (positive mode, matrix CHCA, THF):

$m/z [M + Na]^+ = 545.2$; m/z obtained: 545.2

$m/z [M + 2 Na-H]^+ = 567.2$; m/z obtained: 567.2

HR-ESI-MS

$m/z [M + 2Na-H]^+ = 567.1410$; m/z obtained: 567.1425

4.6. Sialidase Inhibition Assay

Sialidase from *V. cholerae* was obtained from Boehringer Mannheim.

Sialidases from *S. typhimurium* and *C. perfringens* were obtained from Sigma.

4-MU-Neu5Ac was obtained from Fluka.

Buffer:

Sialidase buffer 2x:

0.2 M sodium acetate at pH 5.5

0.1 M $CaCl_2$

0.02 % (w/v) NaN_3

Stop buffer:

0.133 M glycine

0.042 M sodium carbonate

0.06 M sodium chloride

Stock solutions:

Substrate solution:

1 mM 4-(methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (4-MU-Neu5Ac) in water

Sialidase solution:

0.1 U in 10 ml of 0.1 M sodium acetate buffer at pH 5.5

0.5 mM CaCl₂

0.01 % (w/v) NaN₃

0.1 mg/ml bovine serum albumine (Serva)

Preparation:

The incubation mixtures comprised a final volume of 100 µl.

1. 30 ml of sialidase buffer
2. 10 µl of water
3. 20 µl of inhibitor in water (10mM-10µM)
4. 20 µl sialidase stock solution
5. 20 µl 4-MU-NANA

The mixtures were incubated at room temperature for 30 minutes.

The enzyme reactions were stopped by adding 900 µl of cold stop buffer.

Control assay were run without enzyme or inhibitor.

The amounts of liberated 4-MU-NANA were determined by fluorescence measurement at 460 nm for emission and 365 nm for excitation.

Evaluation:

Blank values were subtracted from the enzyme values before calculation of the amount of Neu5Ac released.

Formula:
$$\frac{I_{c0} - I}{\Delta} \times 100 = \text{Inhibition \%}$$

I_{c0} Intensity without enzyme (no inhibition)

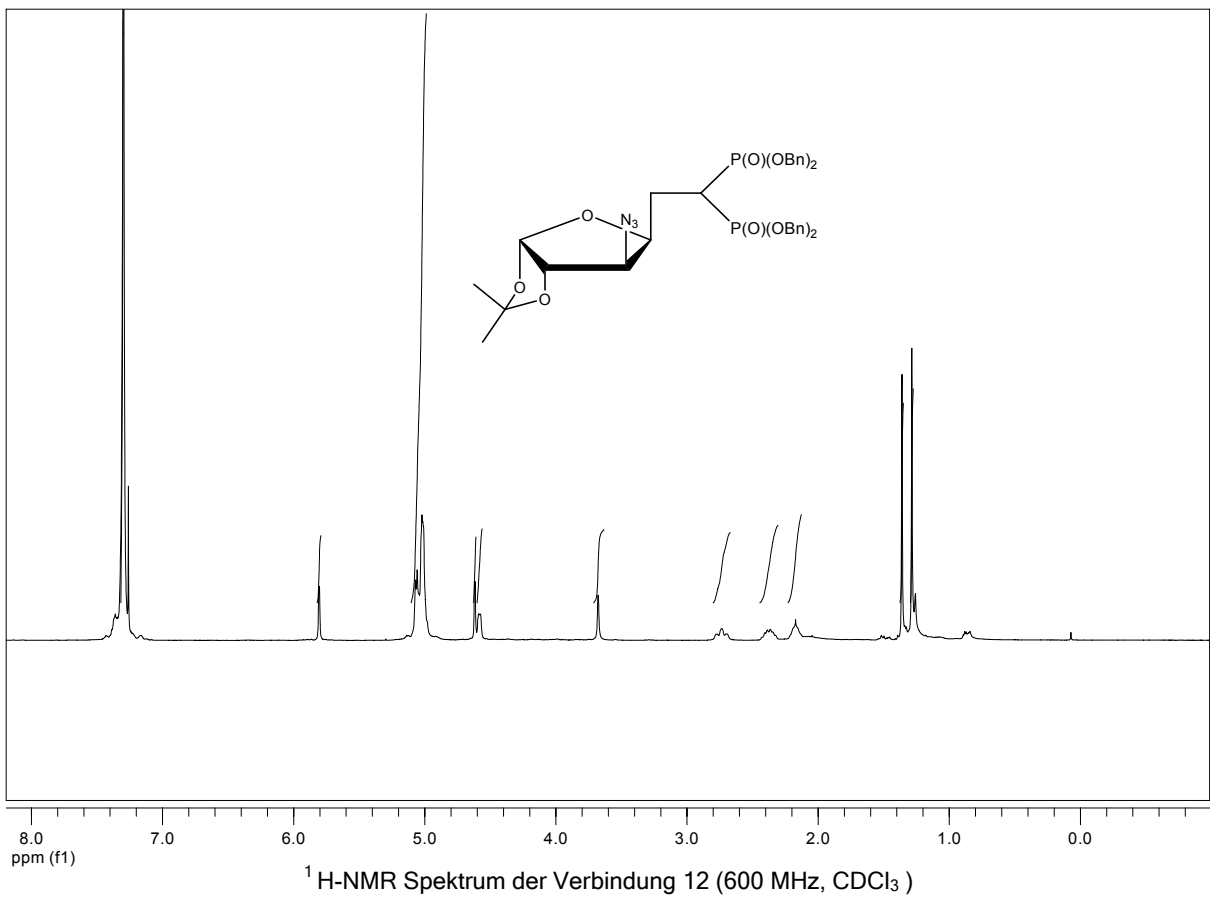
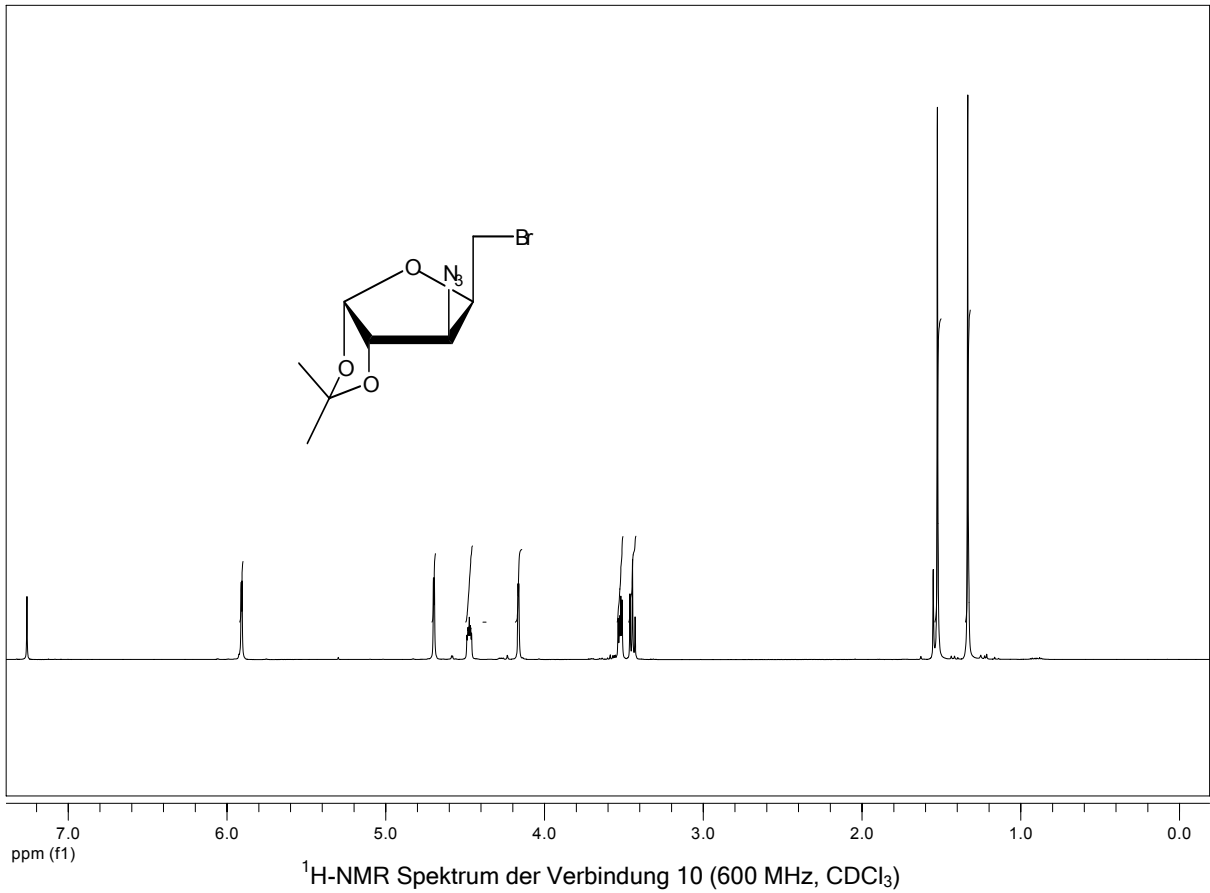
I_{c100} Intensity with full inhibition

I Measured Intensity

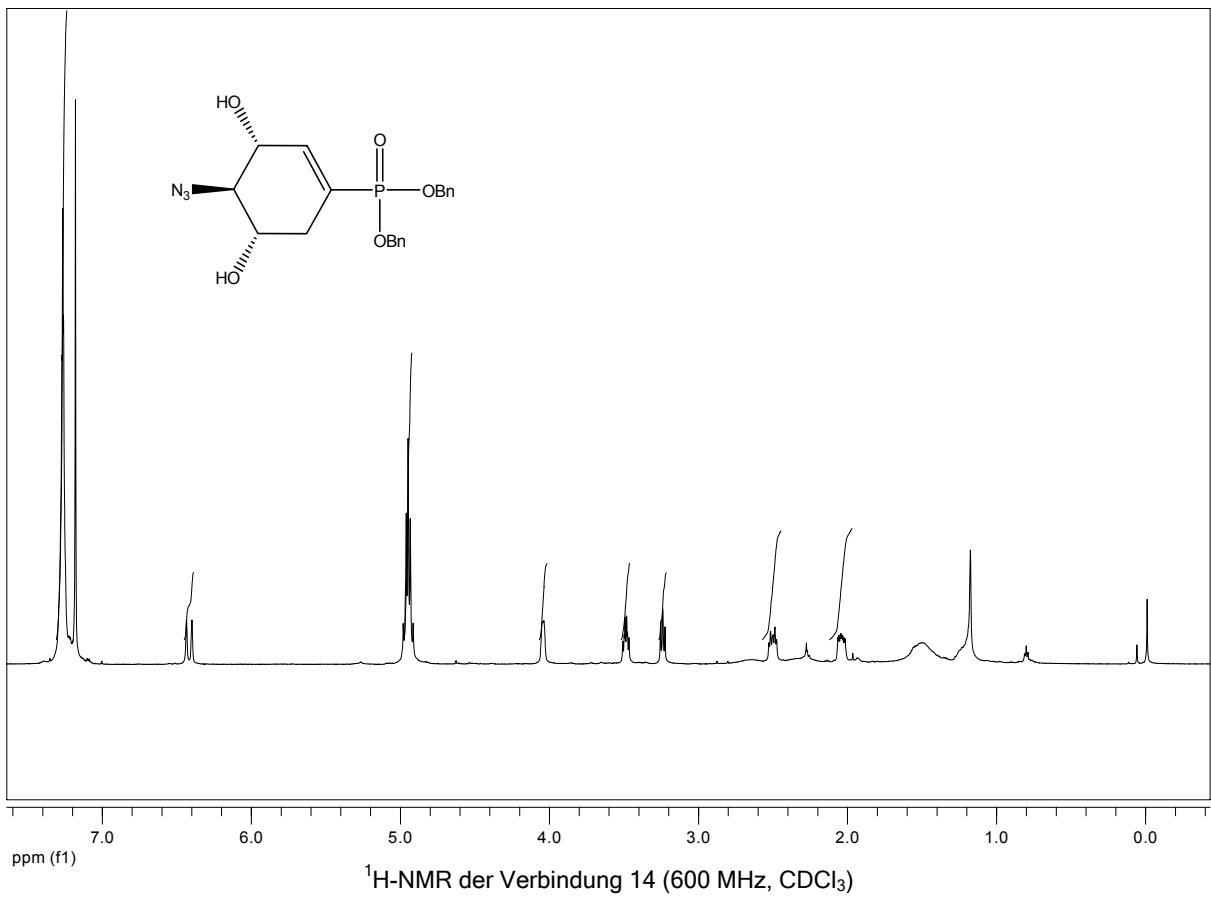
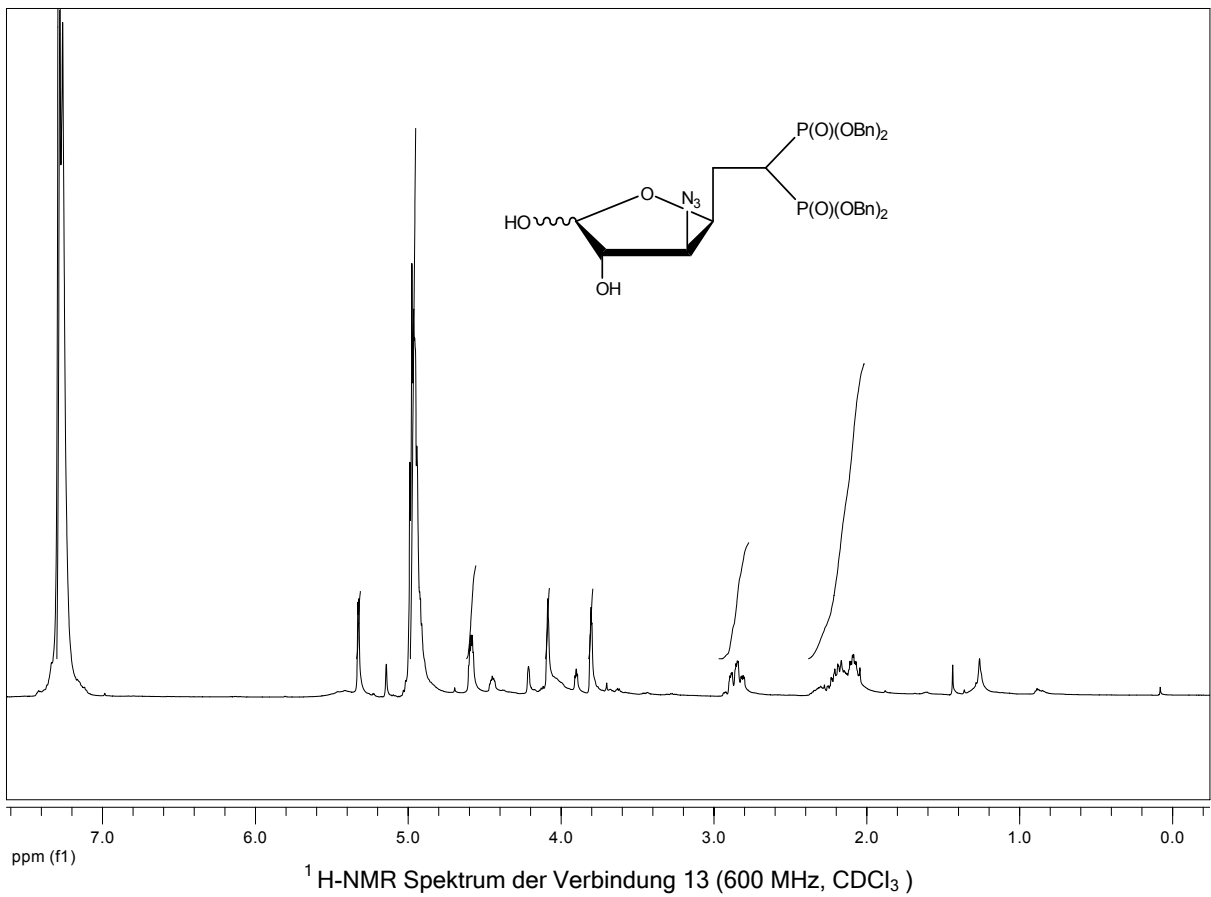
$$\Delta = I_{c100} - I_{c0}$$

I_{c50} values were obtained from the diagrams (Y-axis inhibition, X-axis log c)

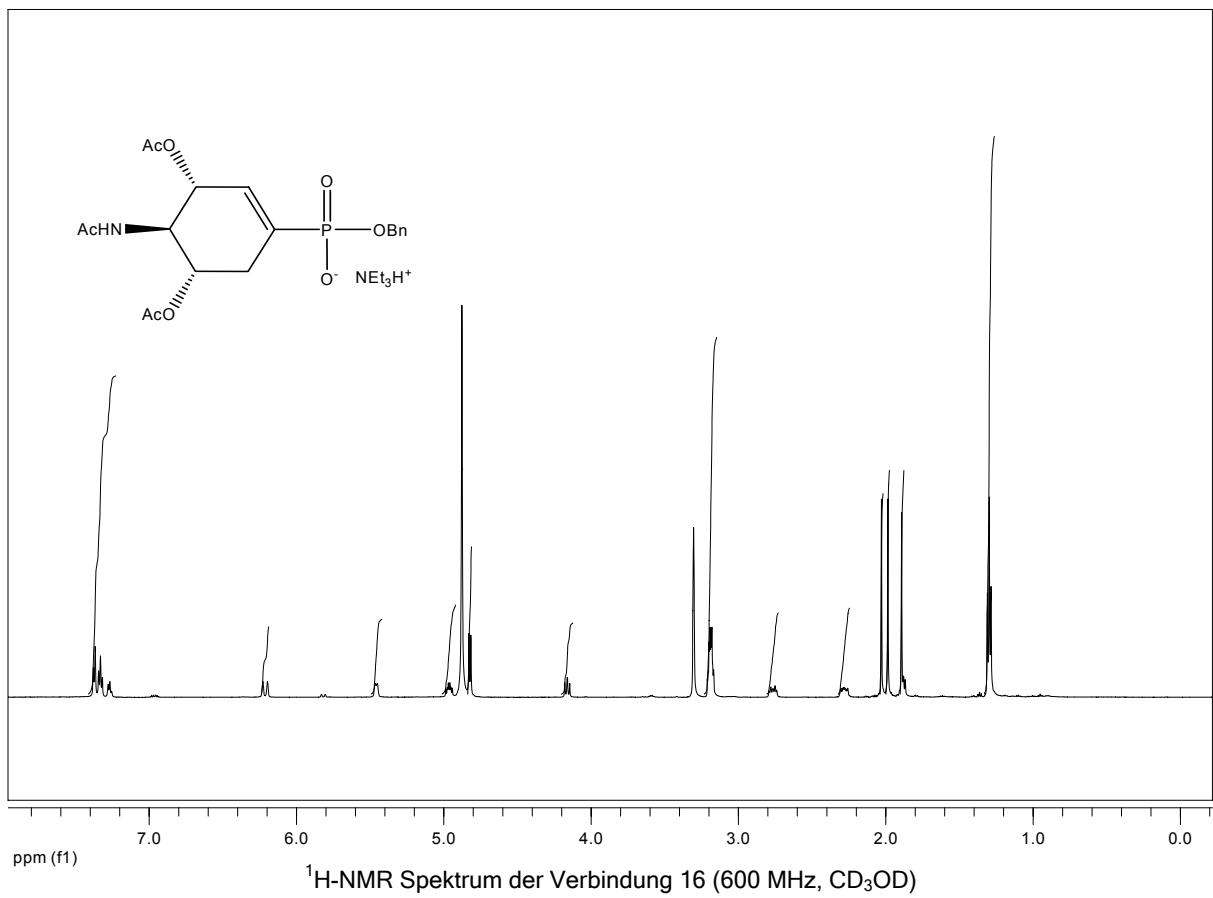
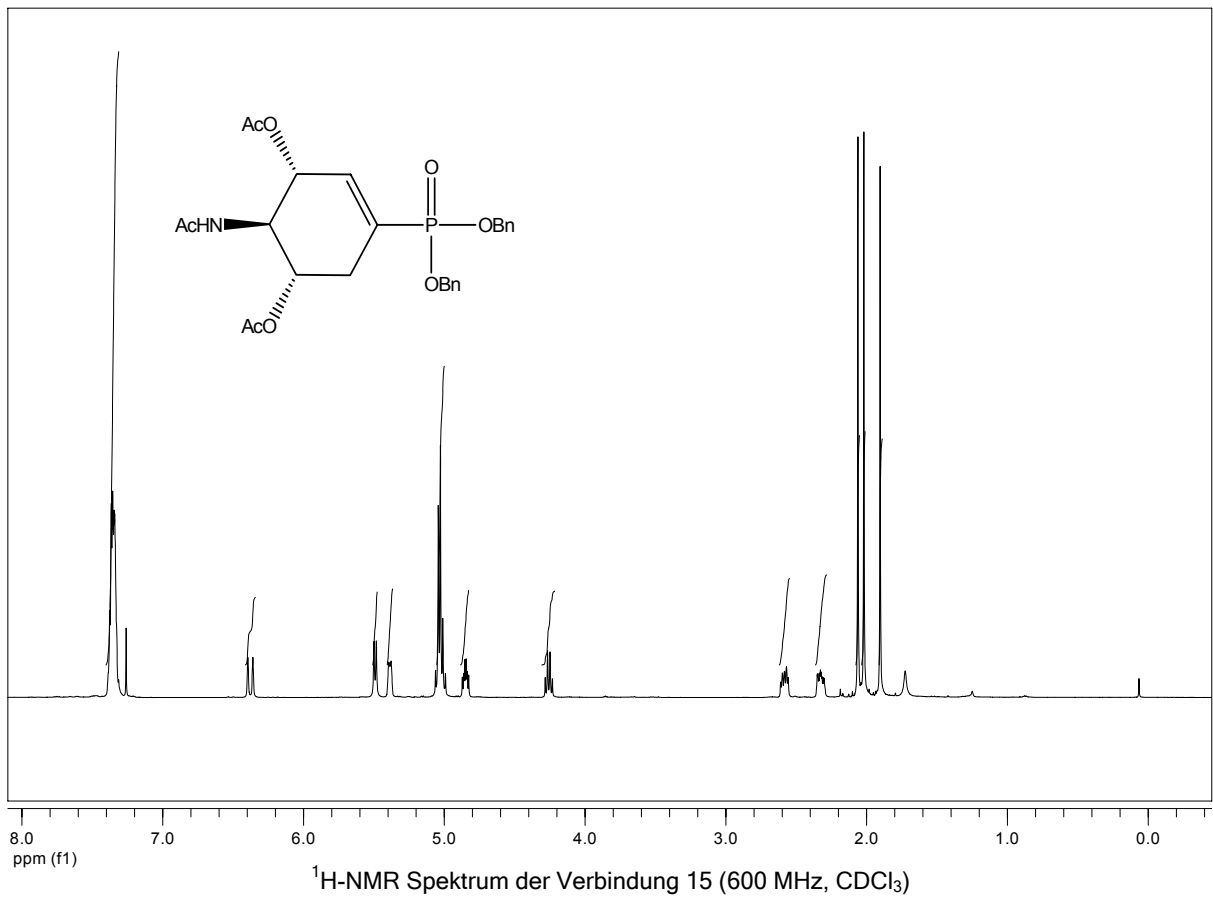
5. NMR-Spektren



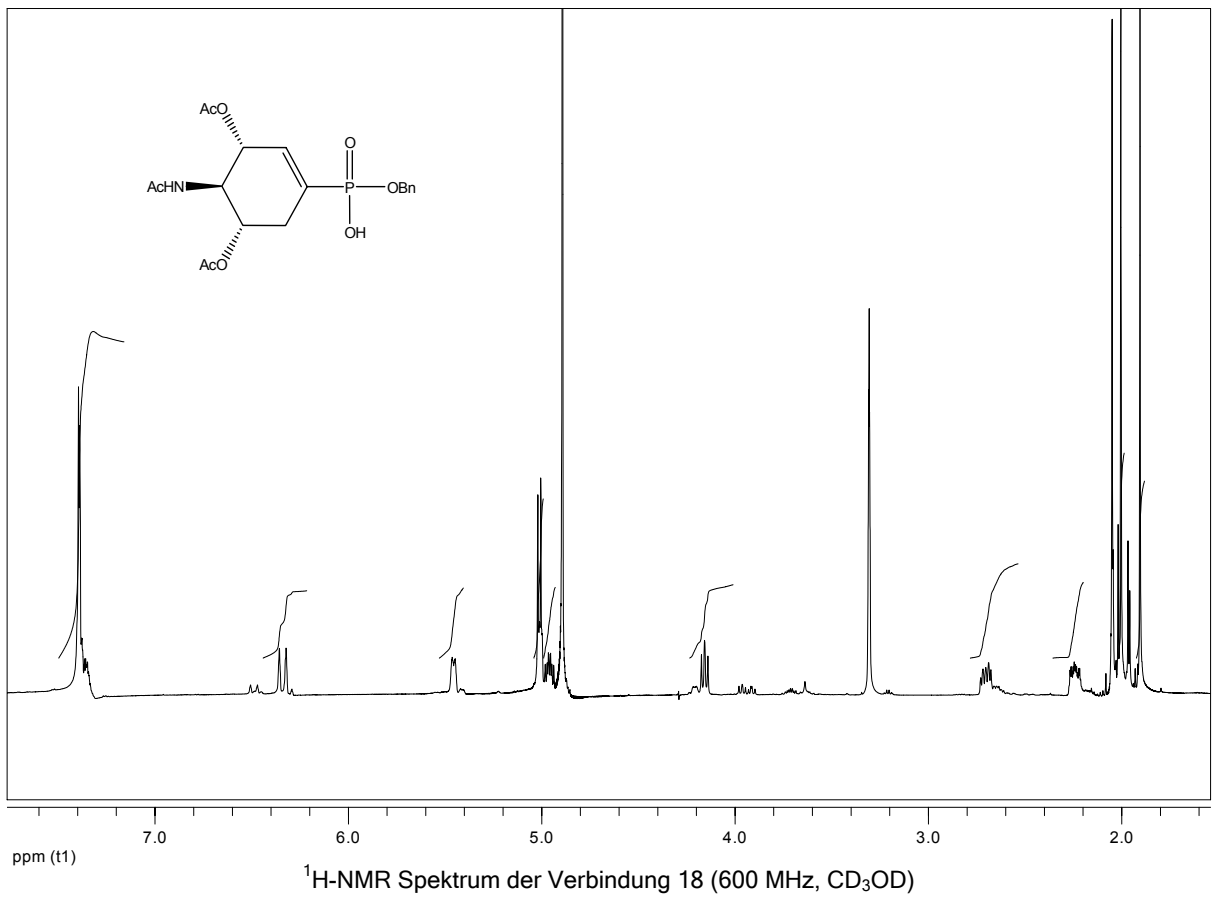
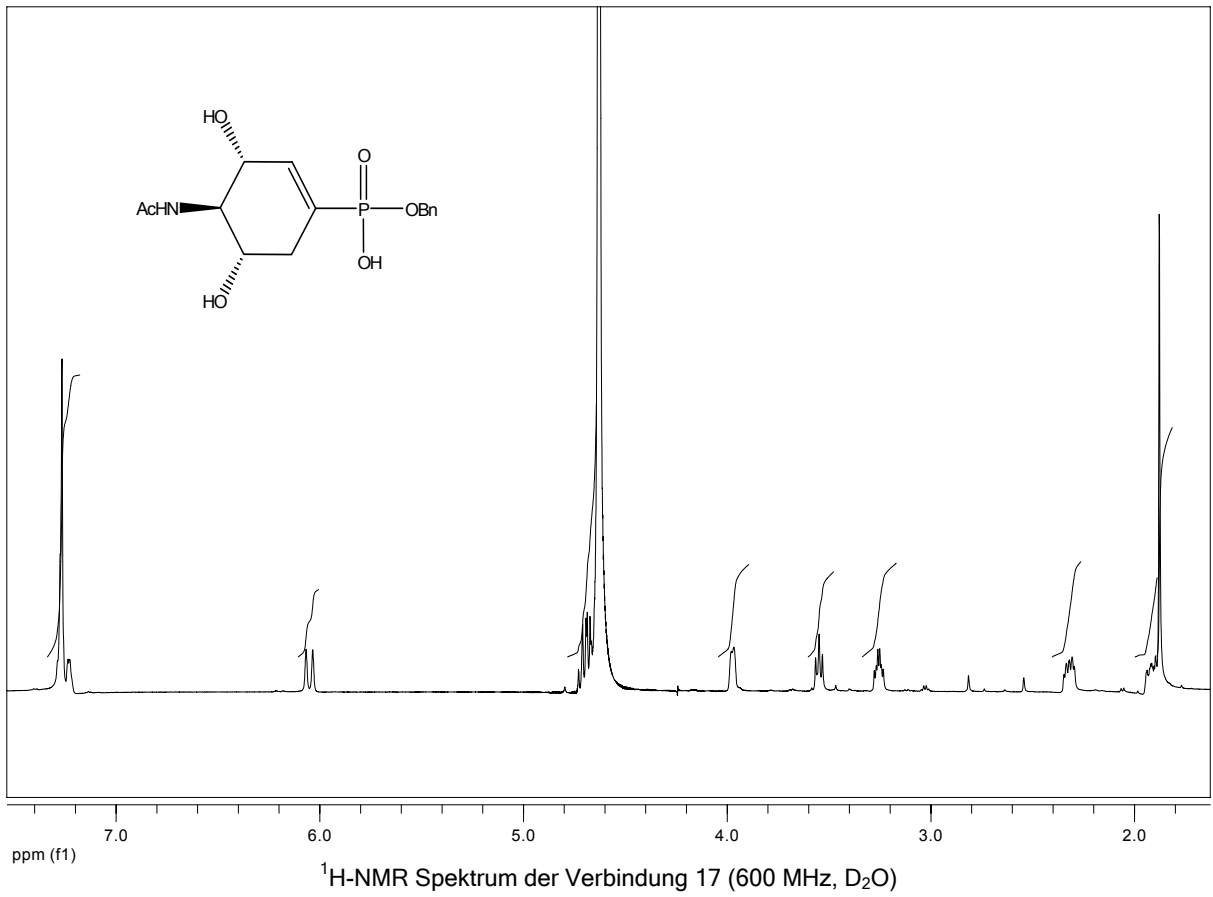
Abbildungen der NMR-Spektren



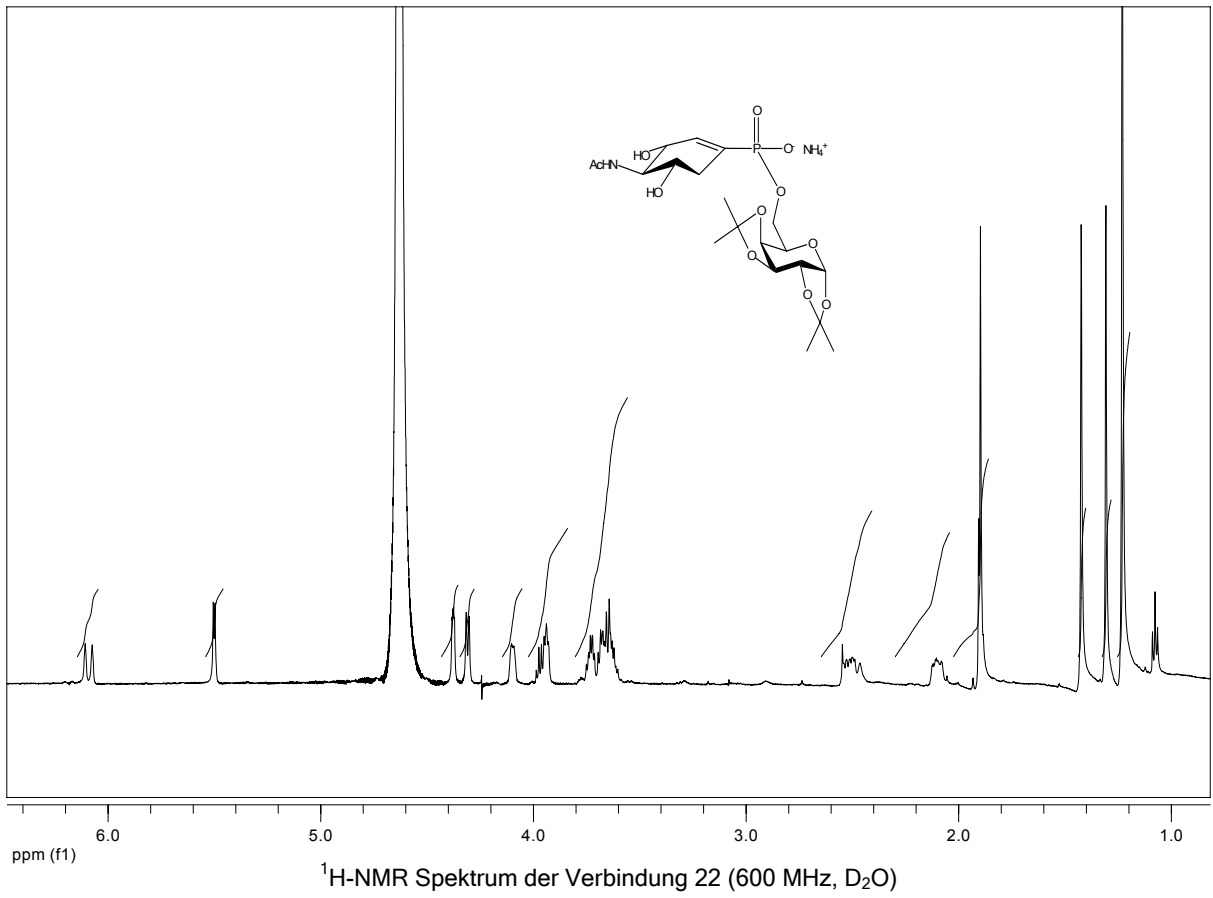
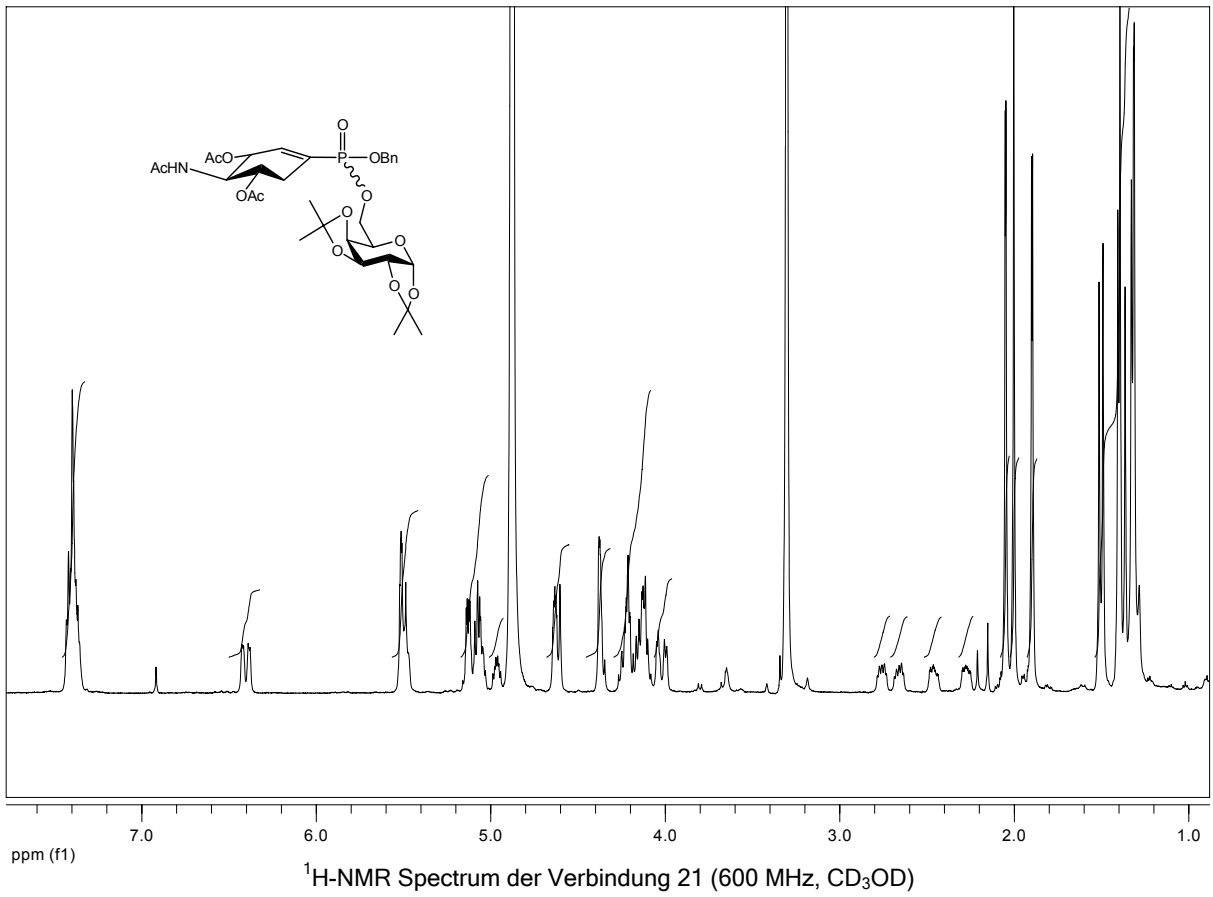
Abbildungen der NMR-Spektren



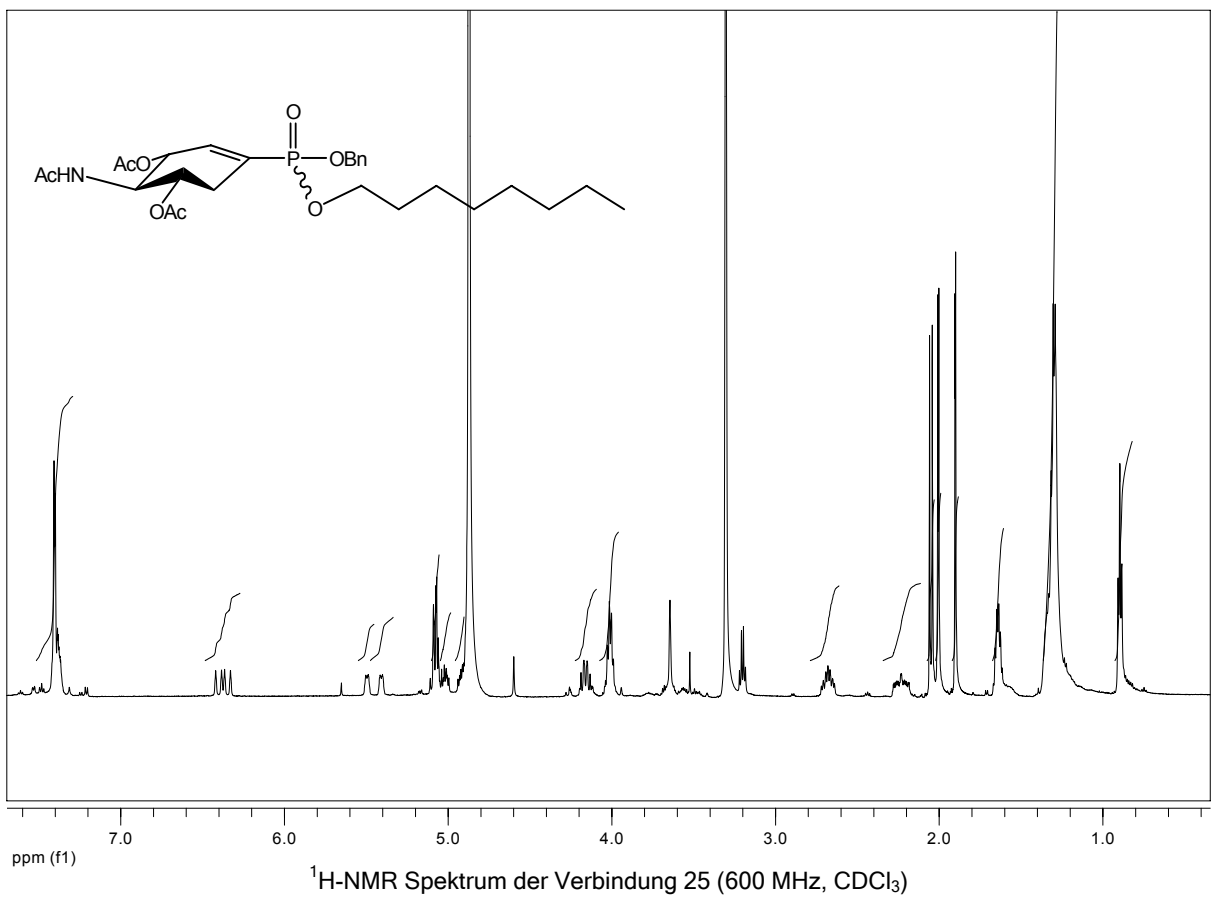
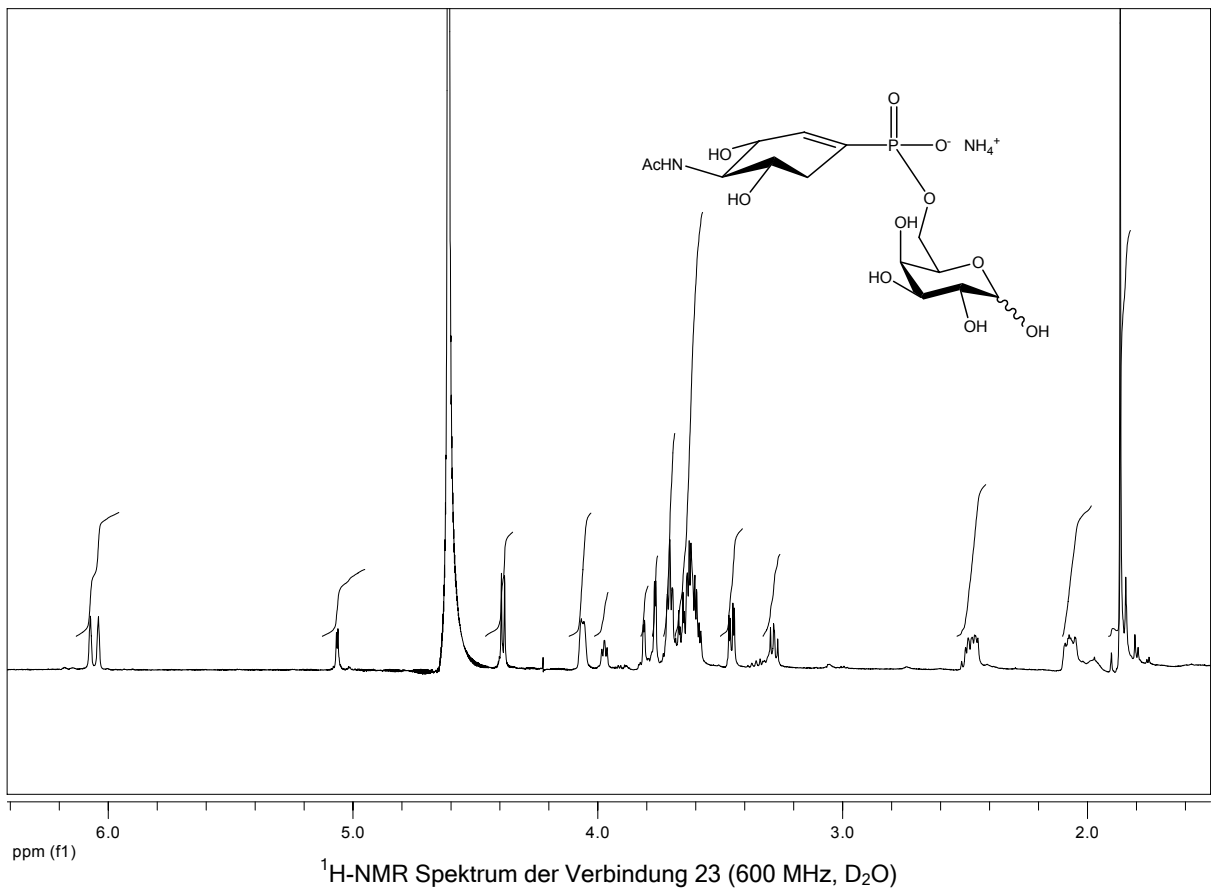
Abbildungen der NMR-Spektren



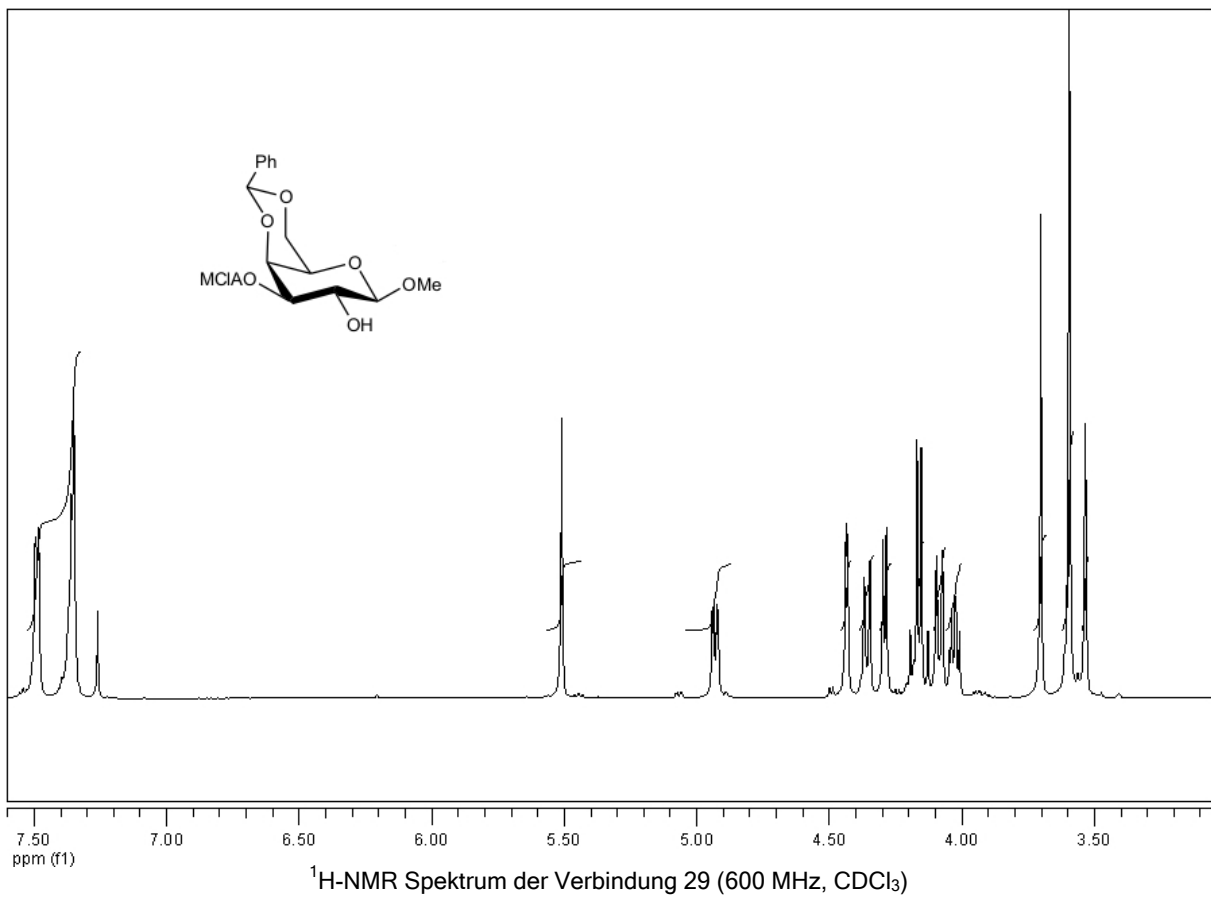
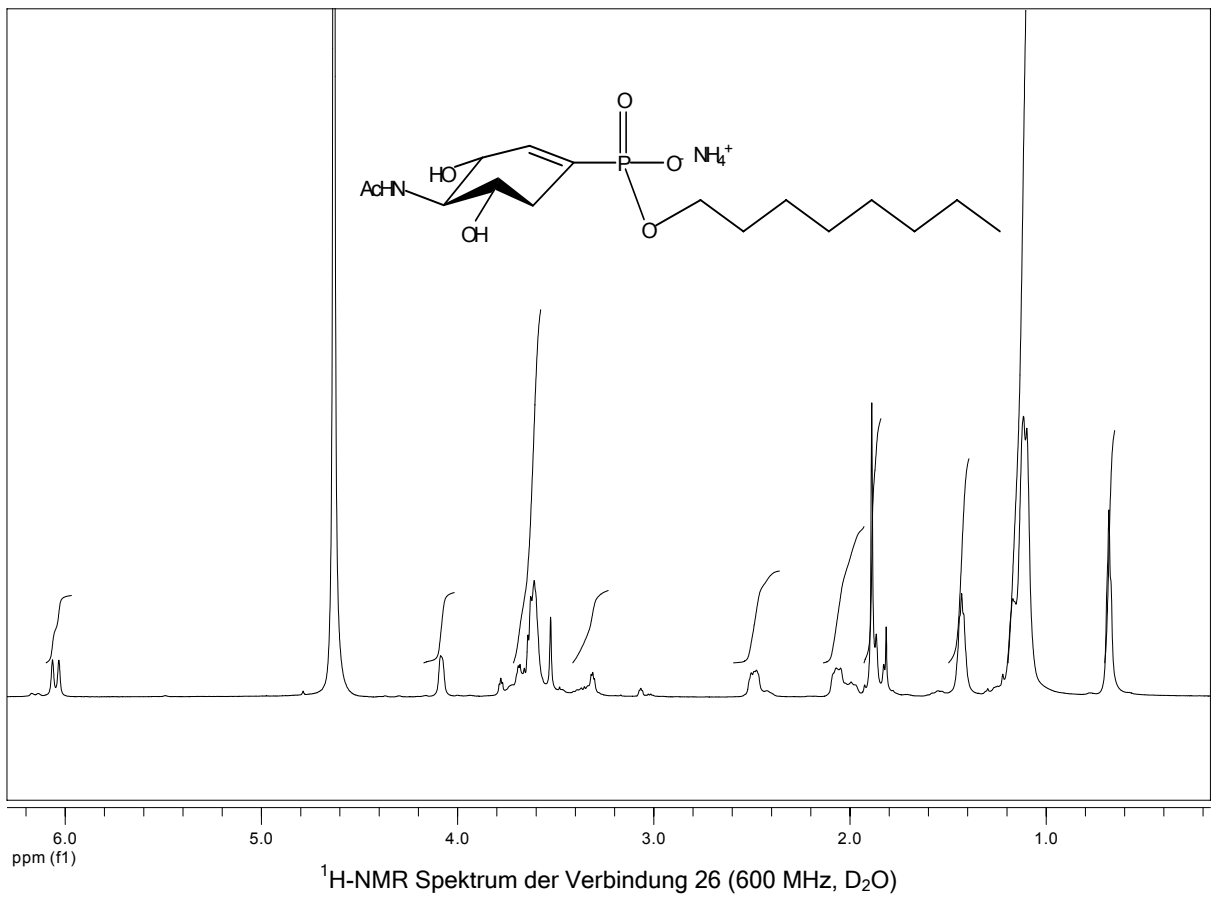
Abbildungen der NMR-Spektren



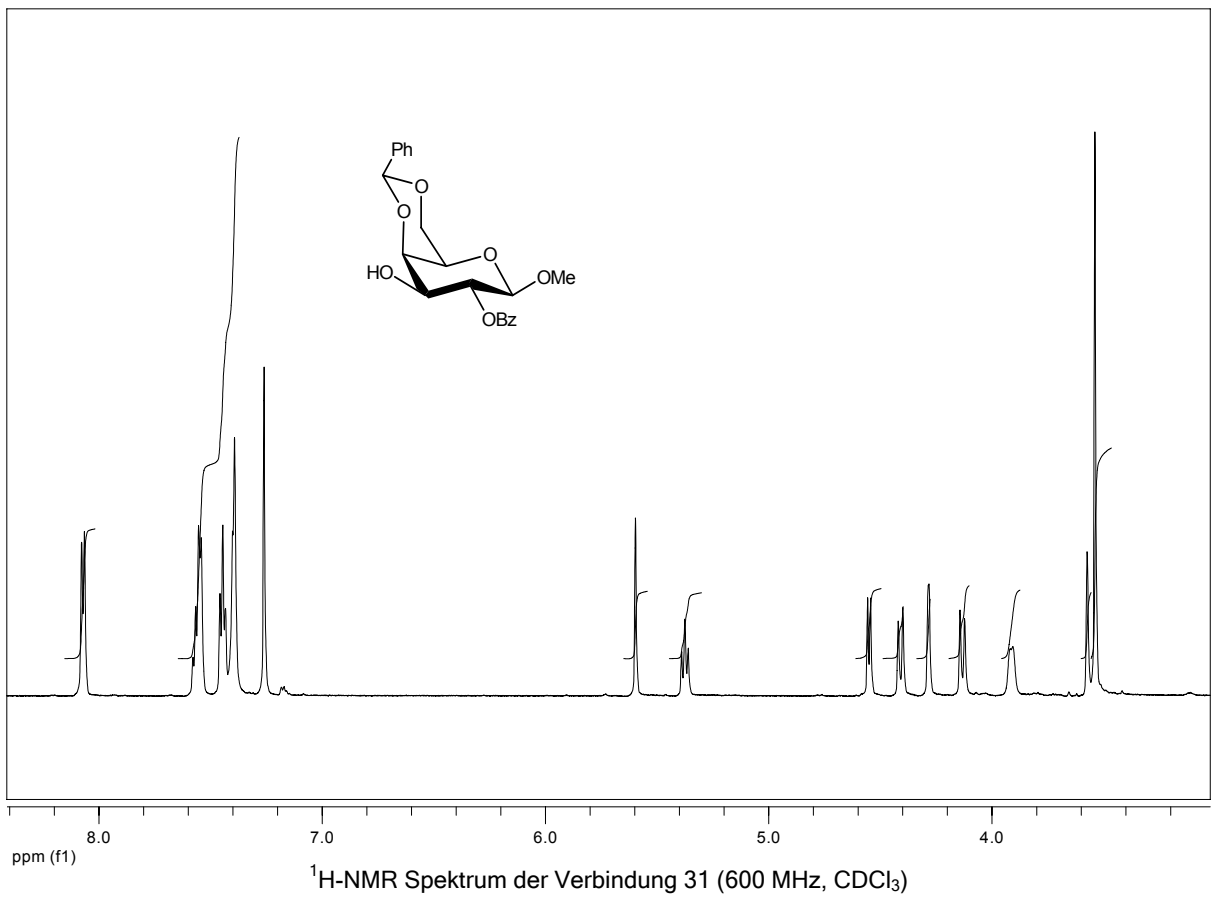
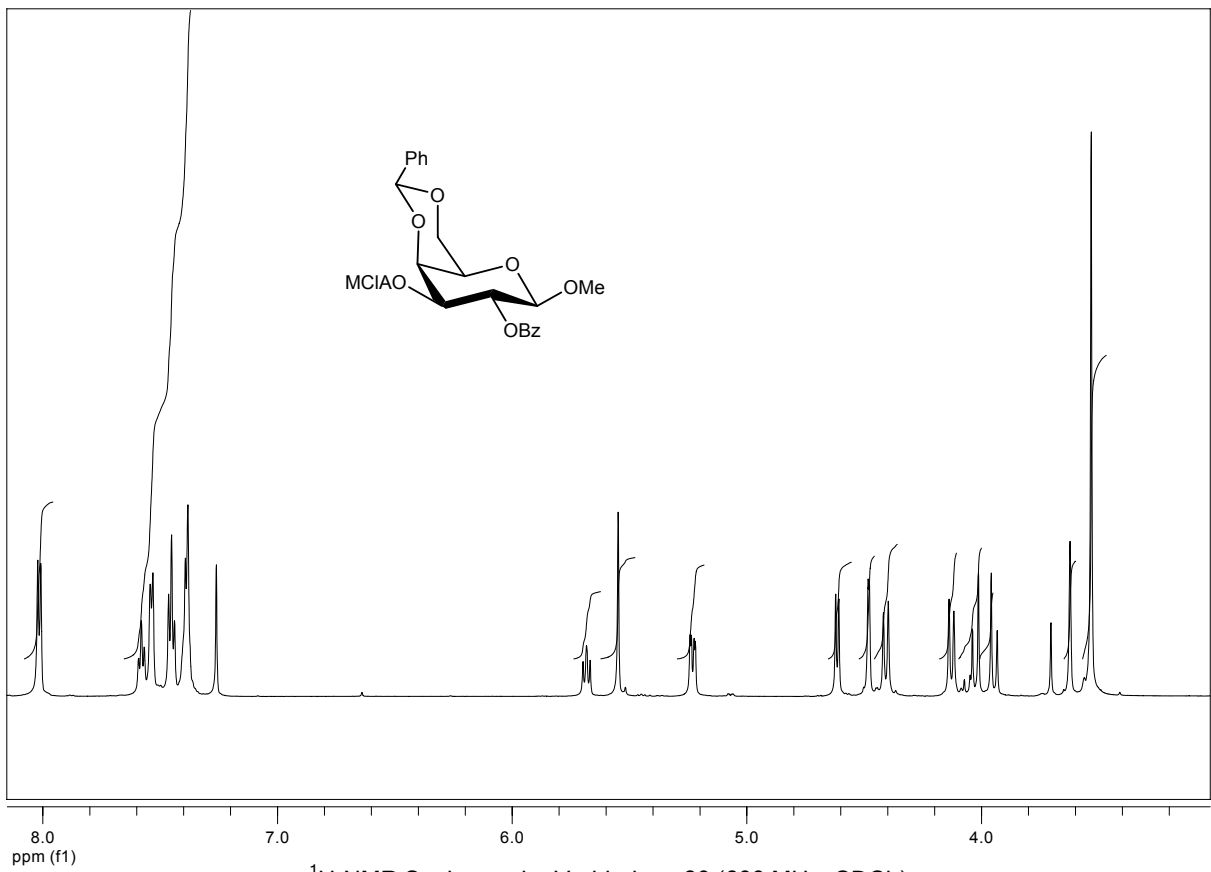
Abbildungen der NMR-Spektren



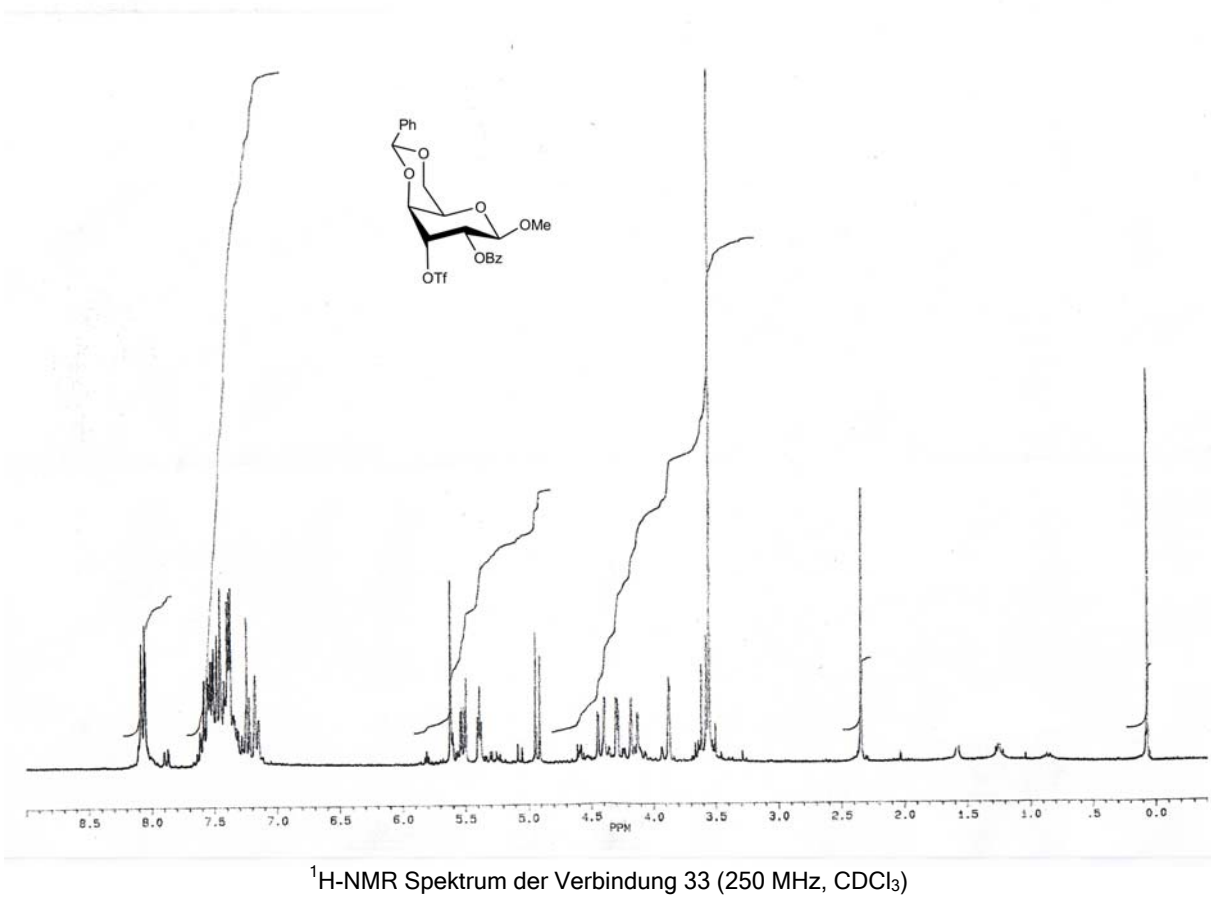
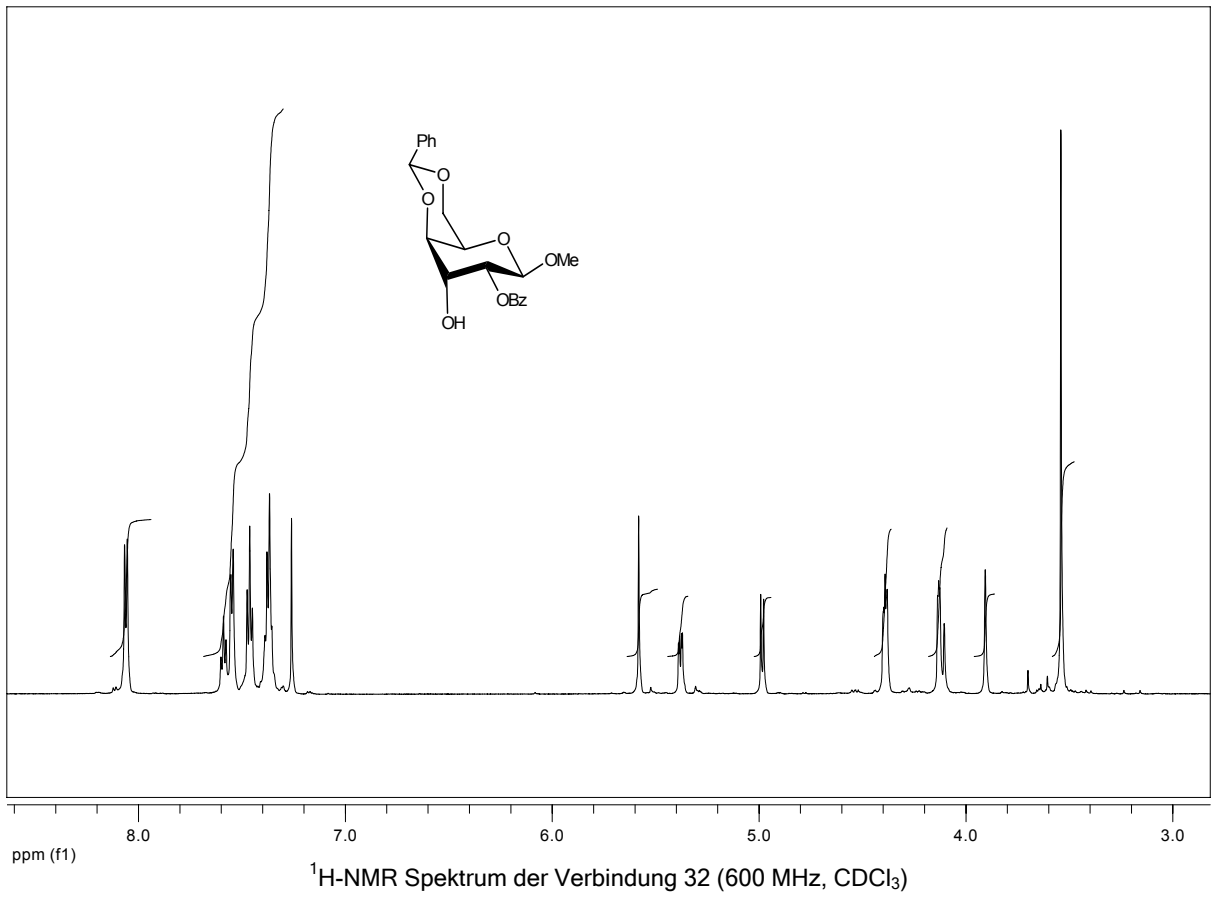
Abbildungen der NMR-Spektren



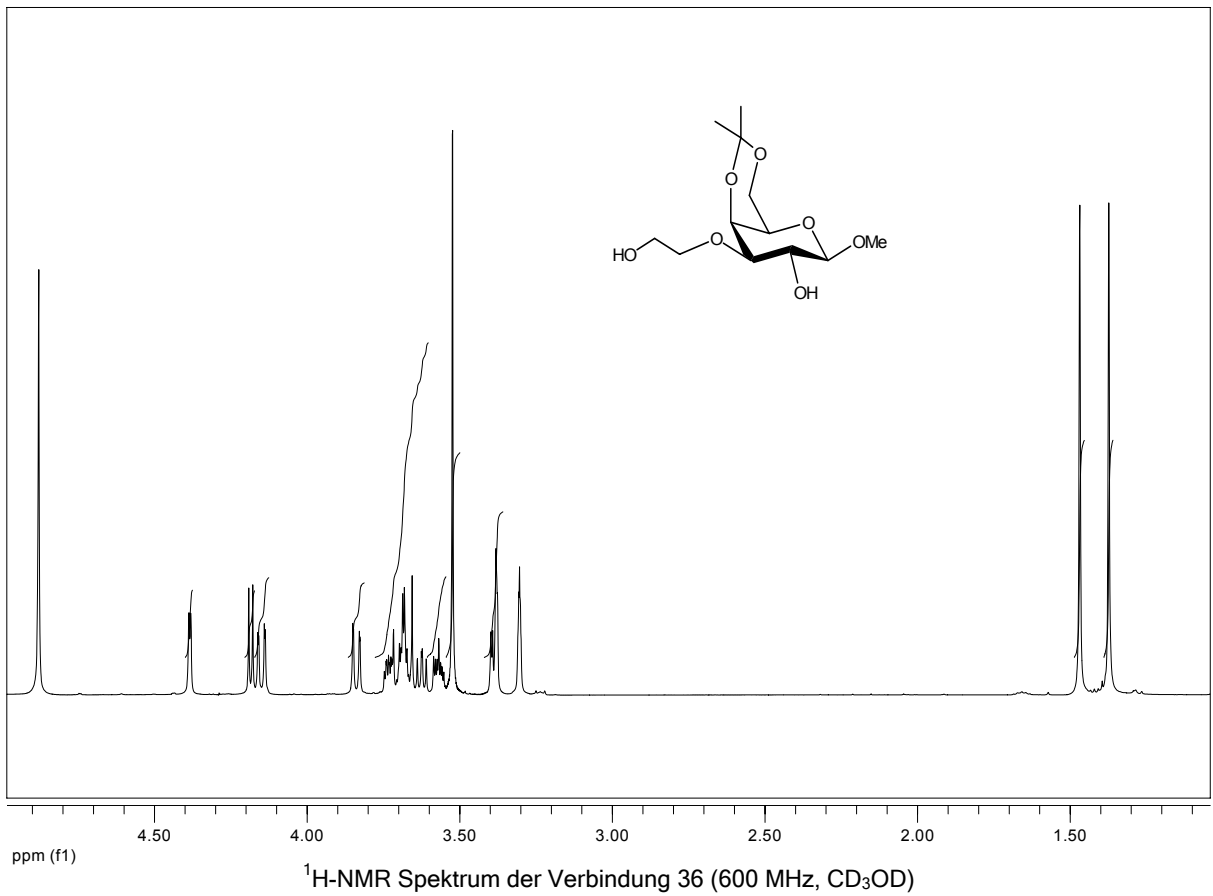
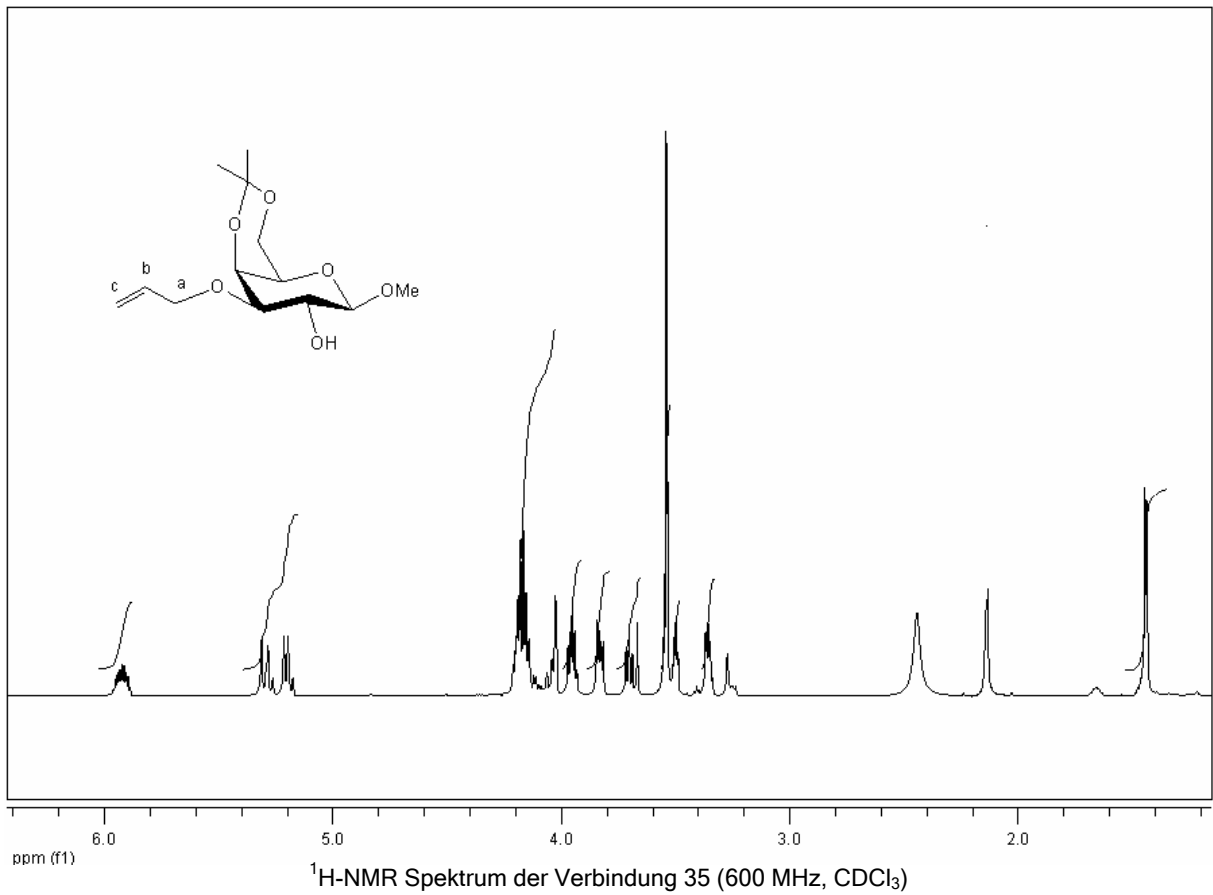
Abbildungen der NMR-Spektren



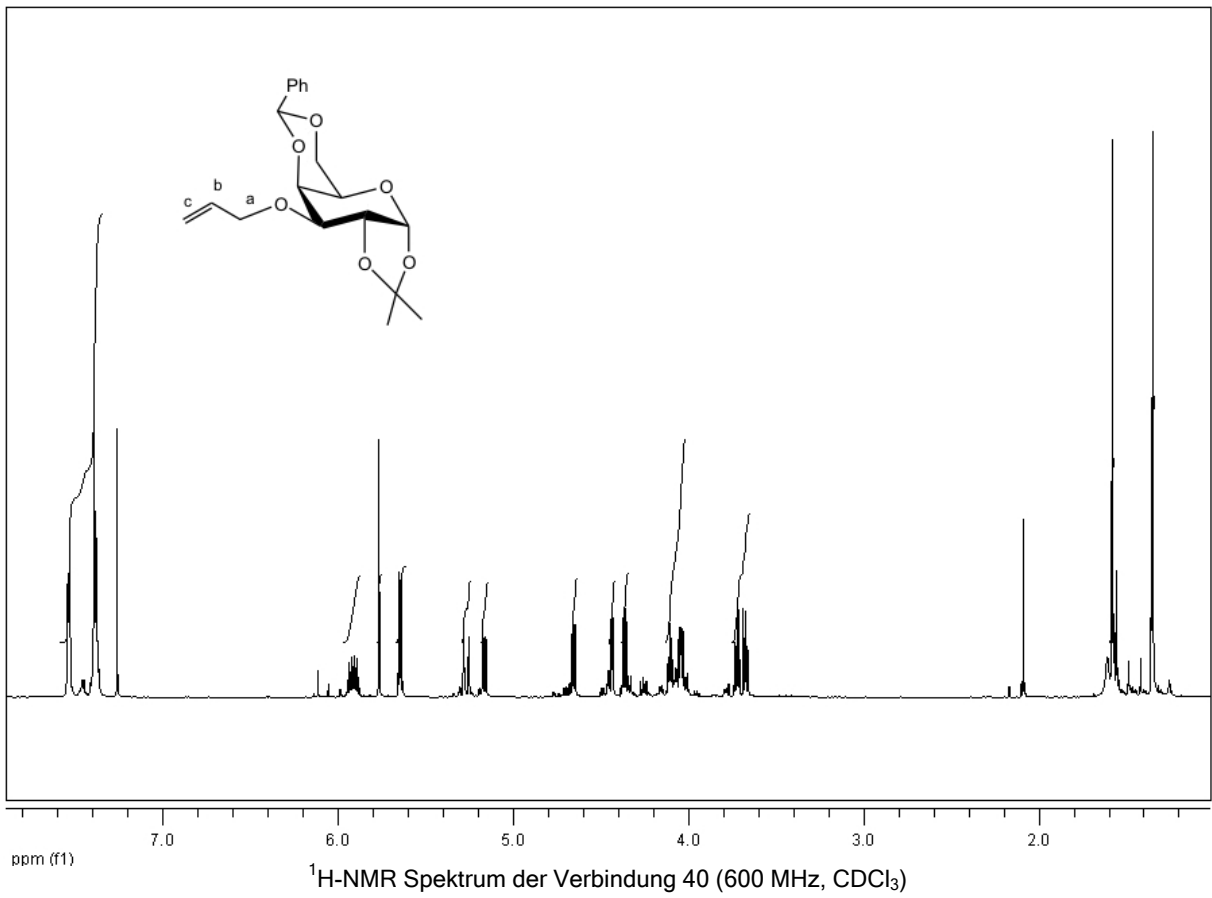
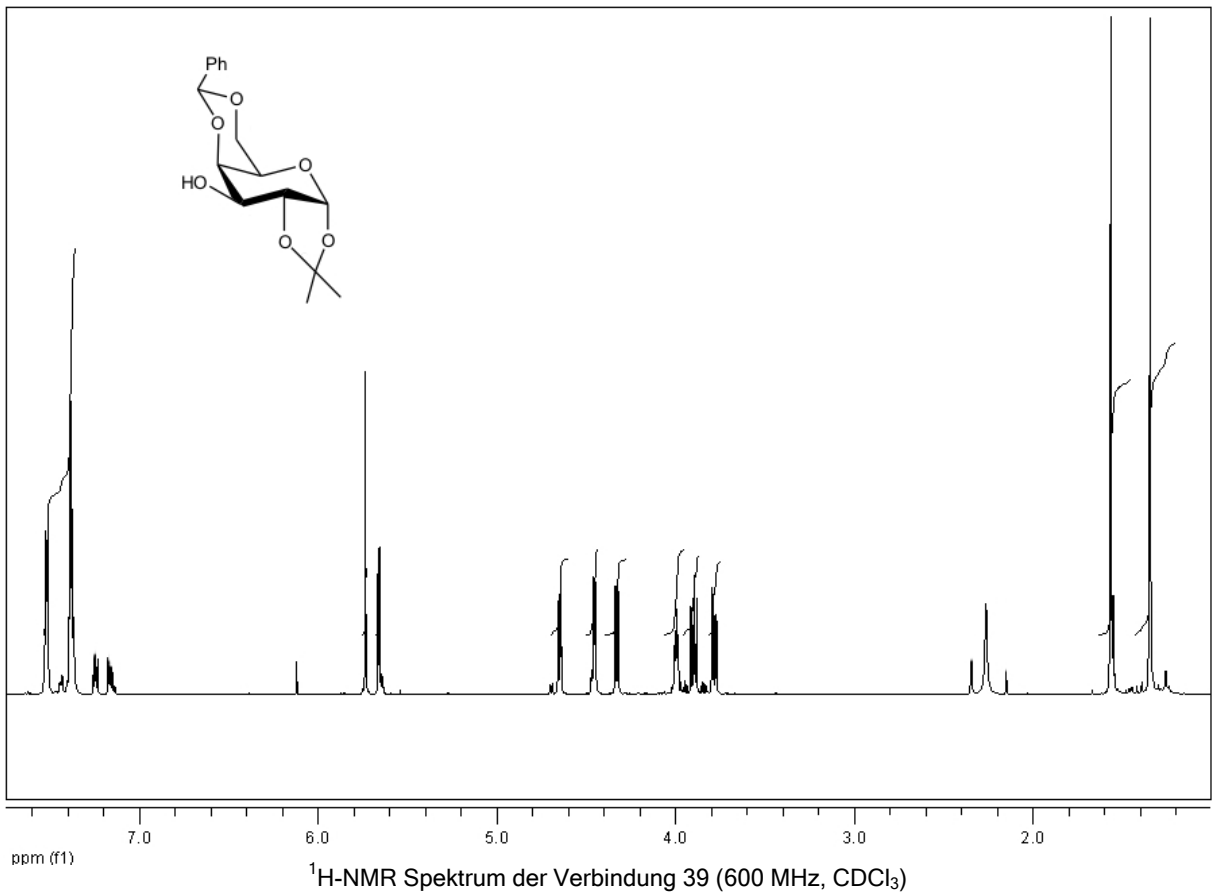
Abbildungen der NMR-Spektren



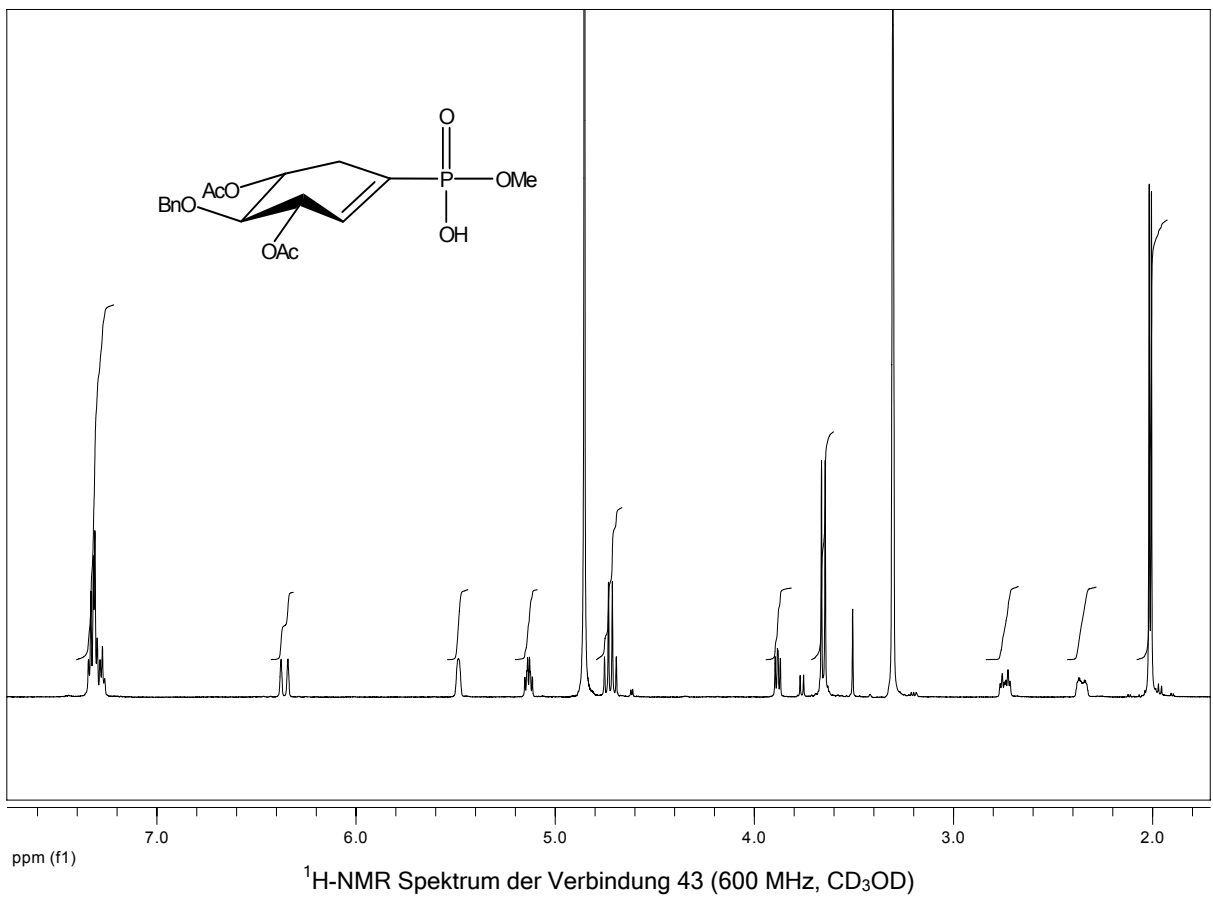
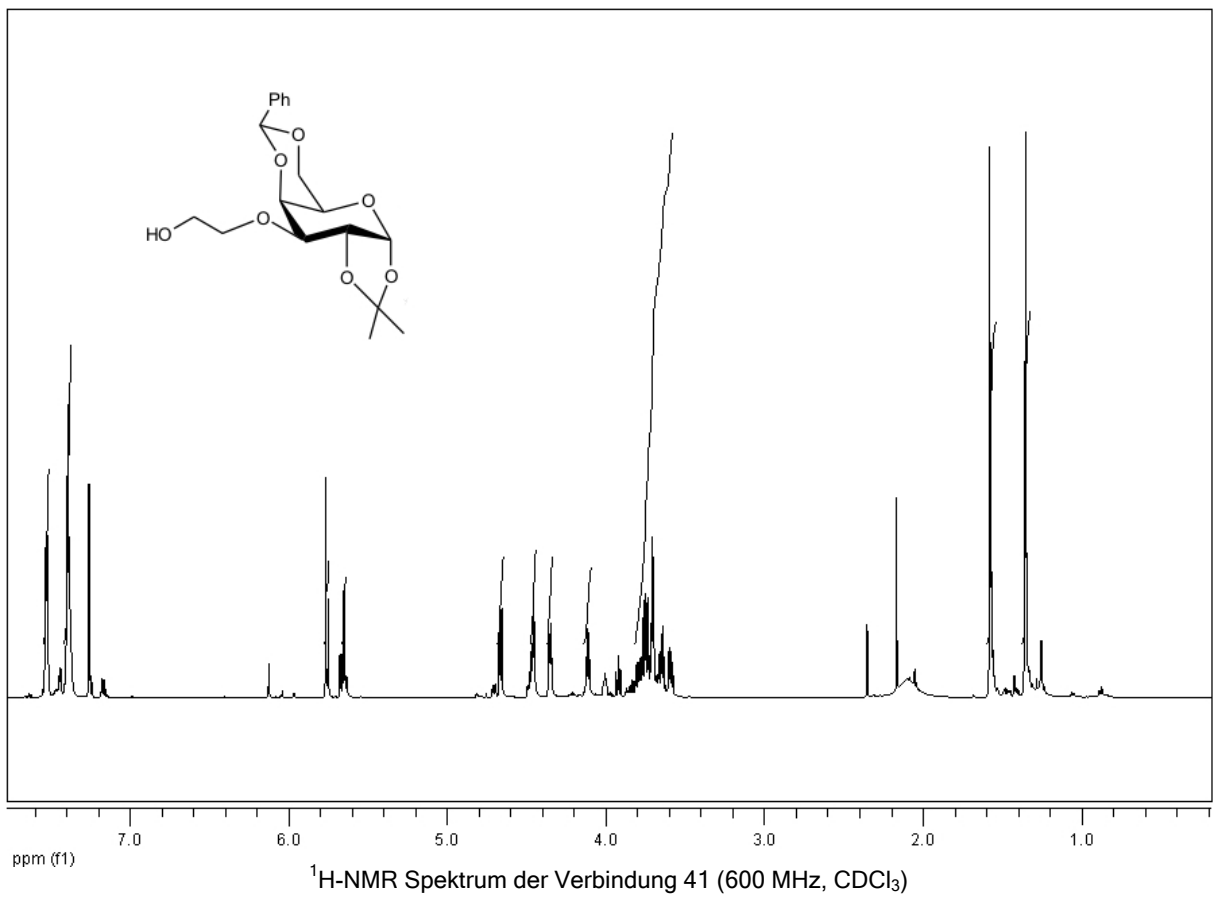
Abbildungen der NMR-Spektren



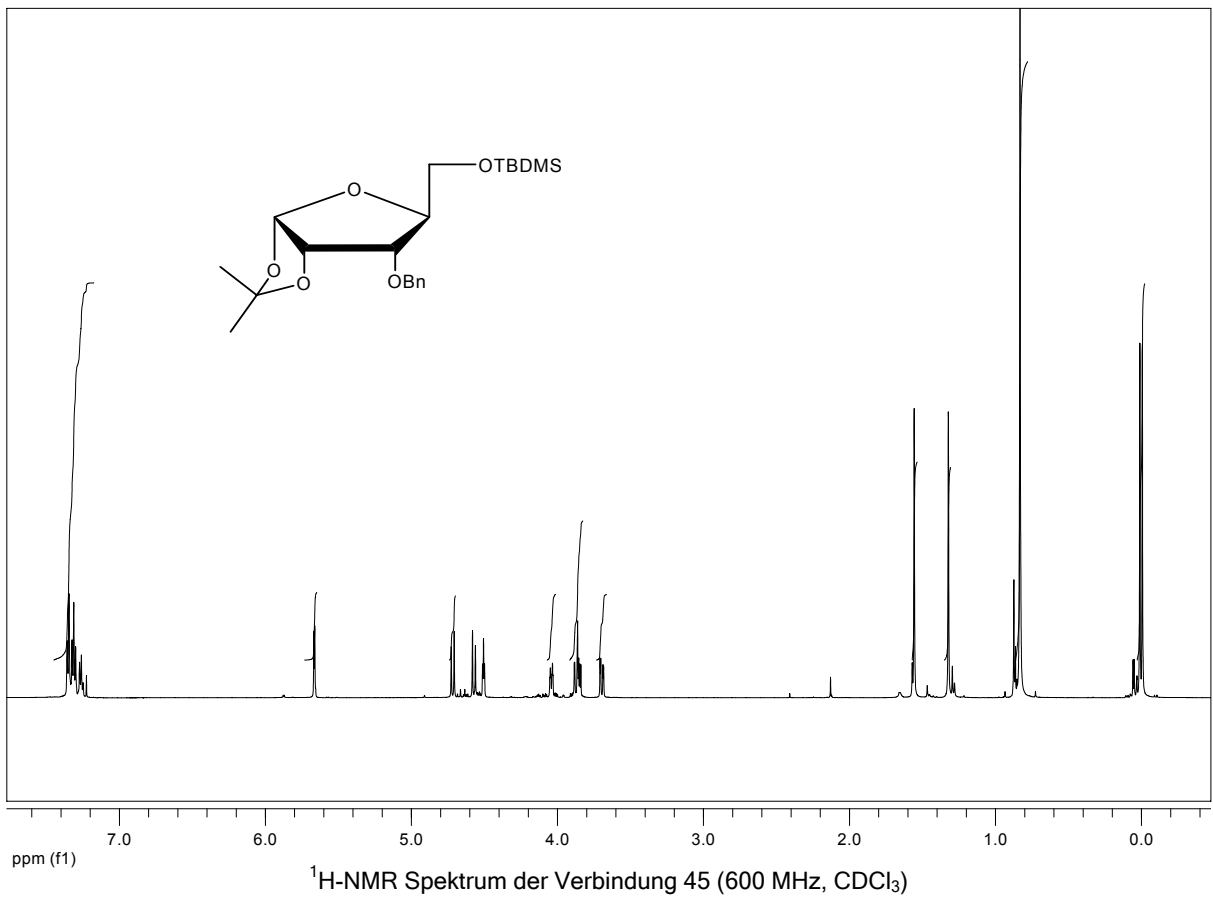
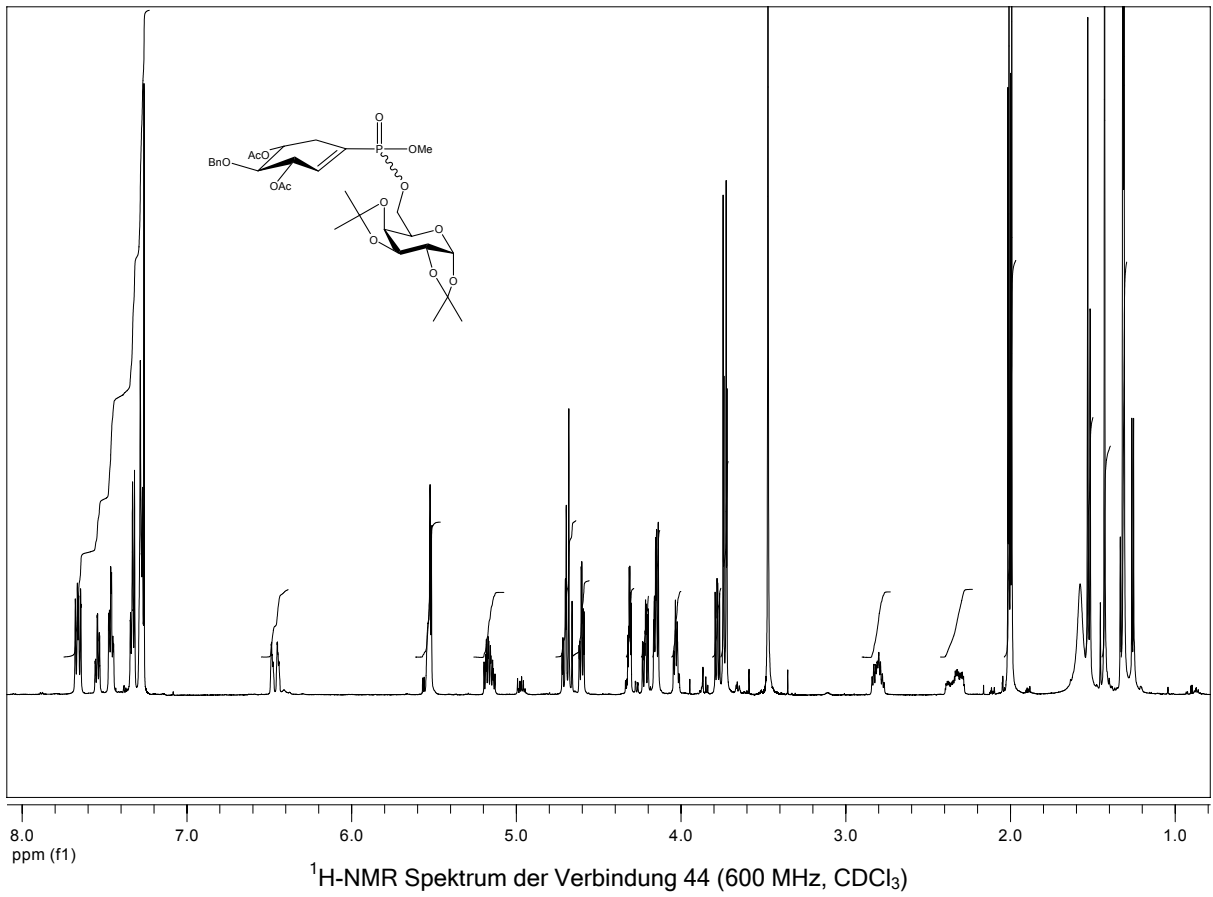
Abbildungen der NMR-Spektren



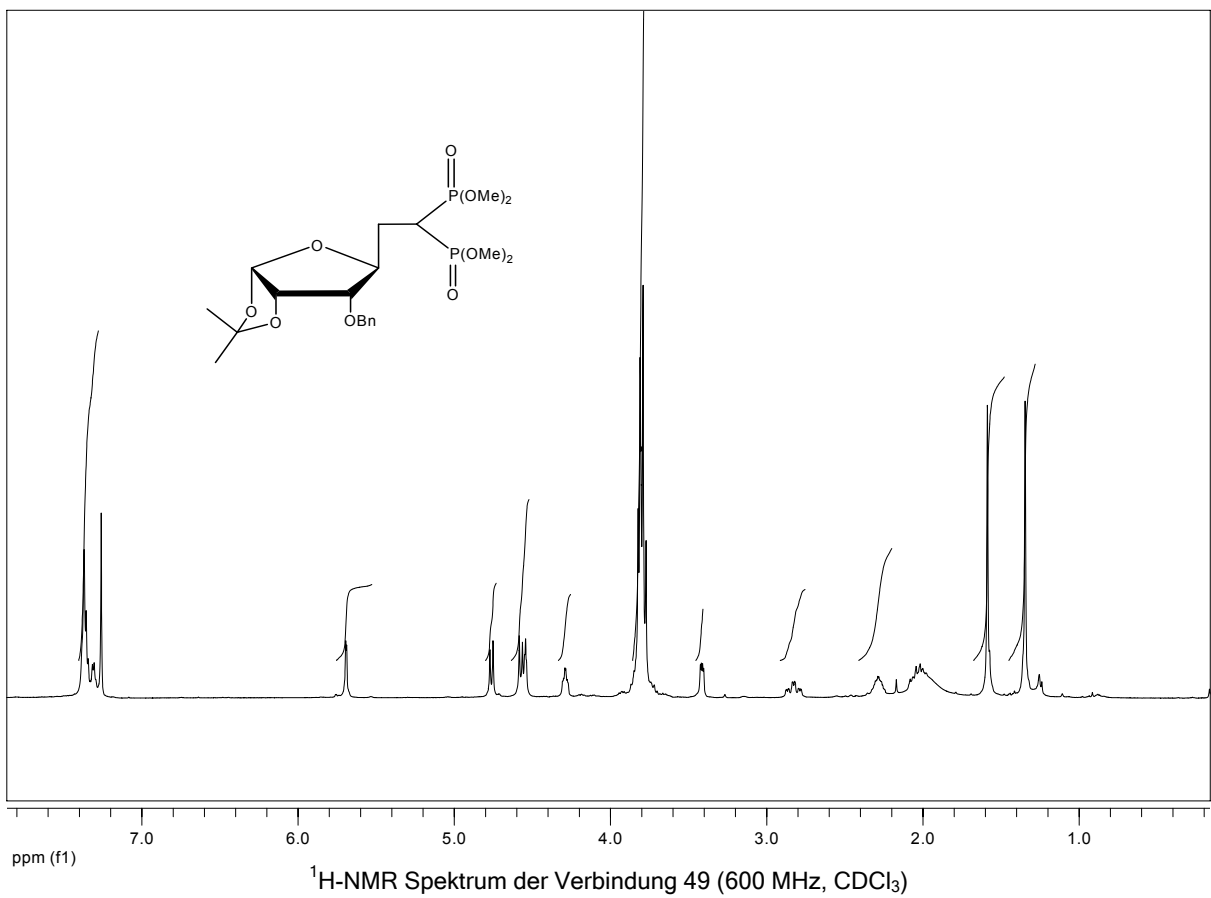
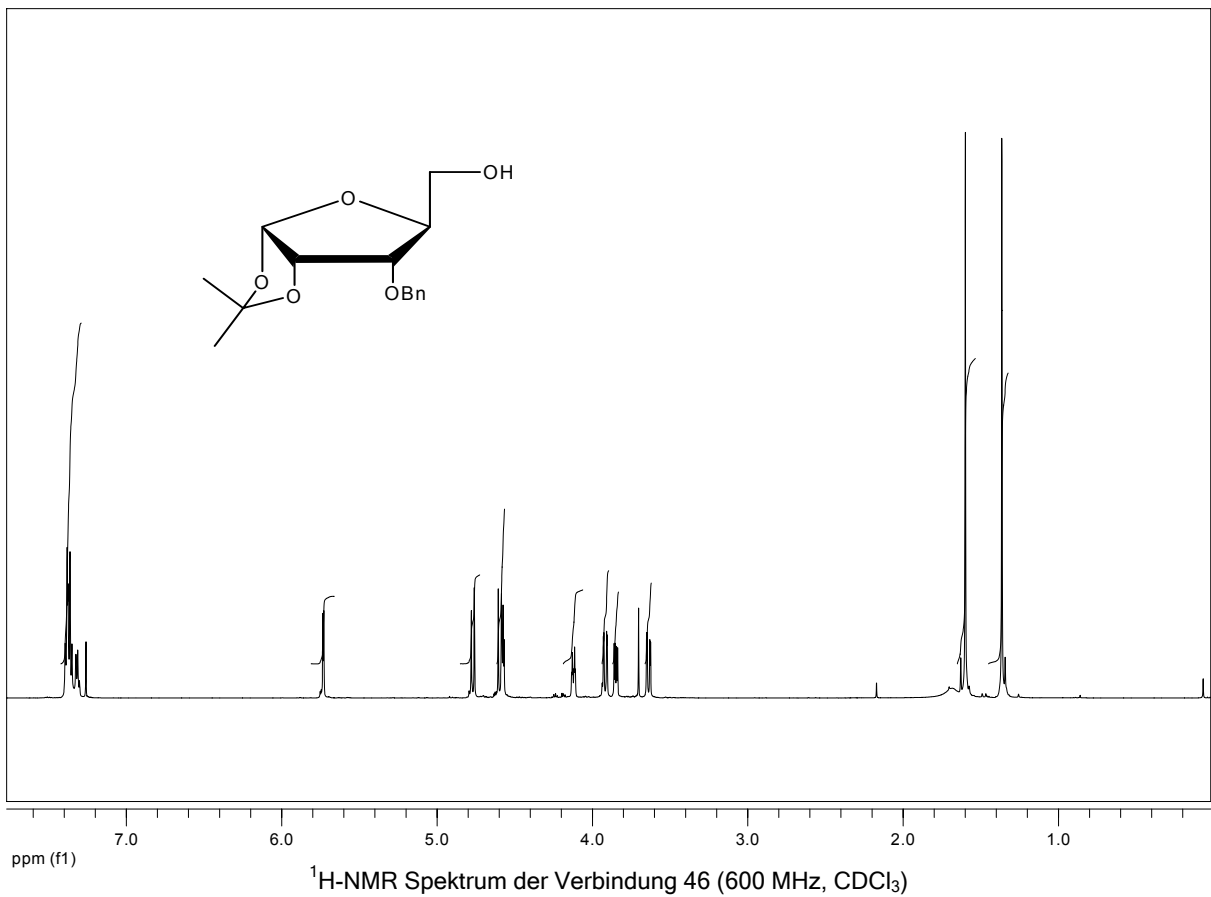
Abbildungen der NMR-Spektren



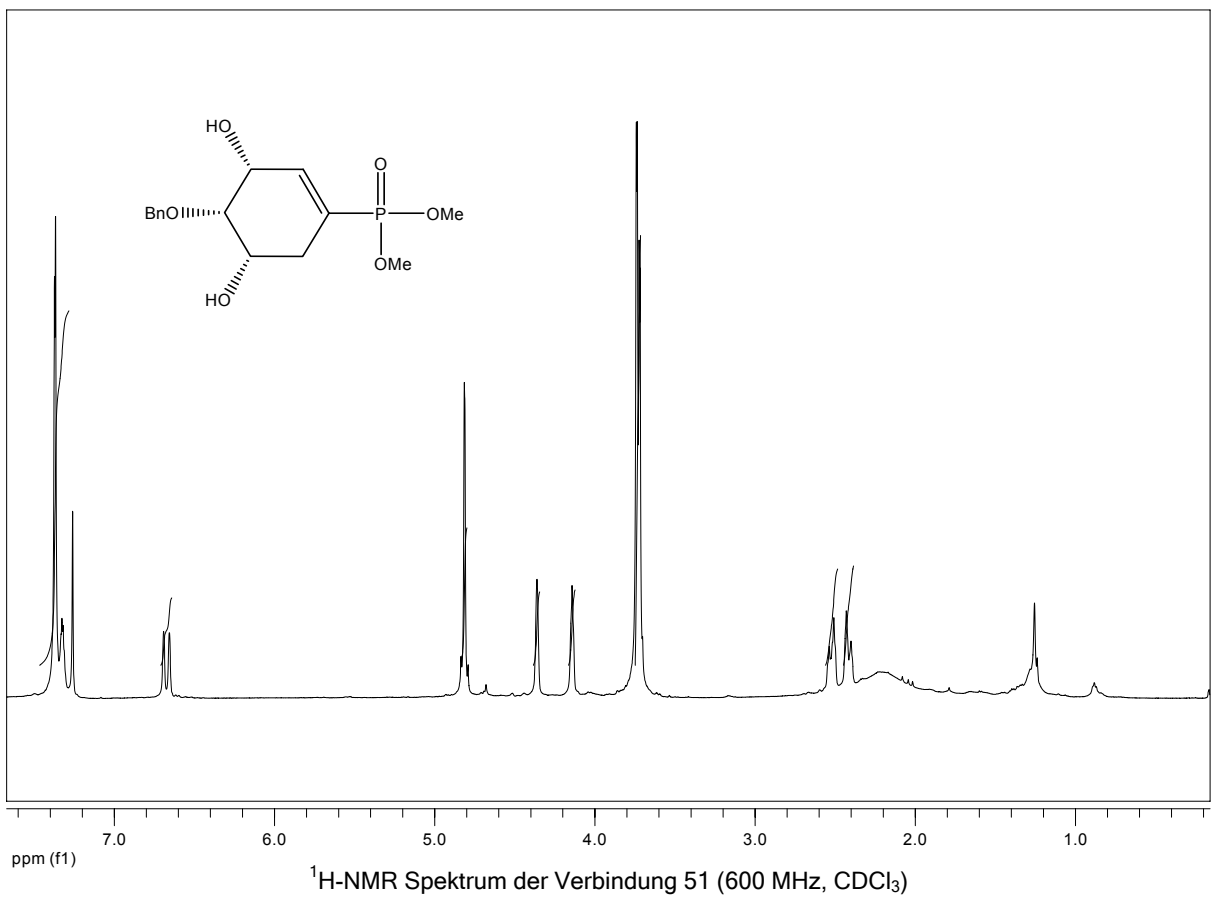
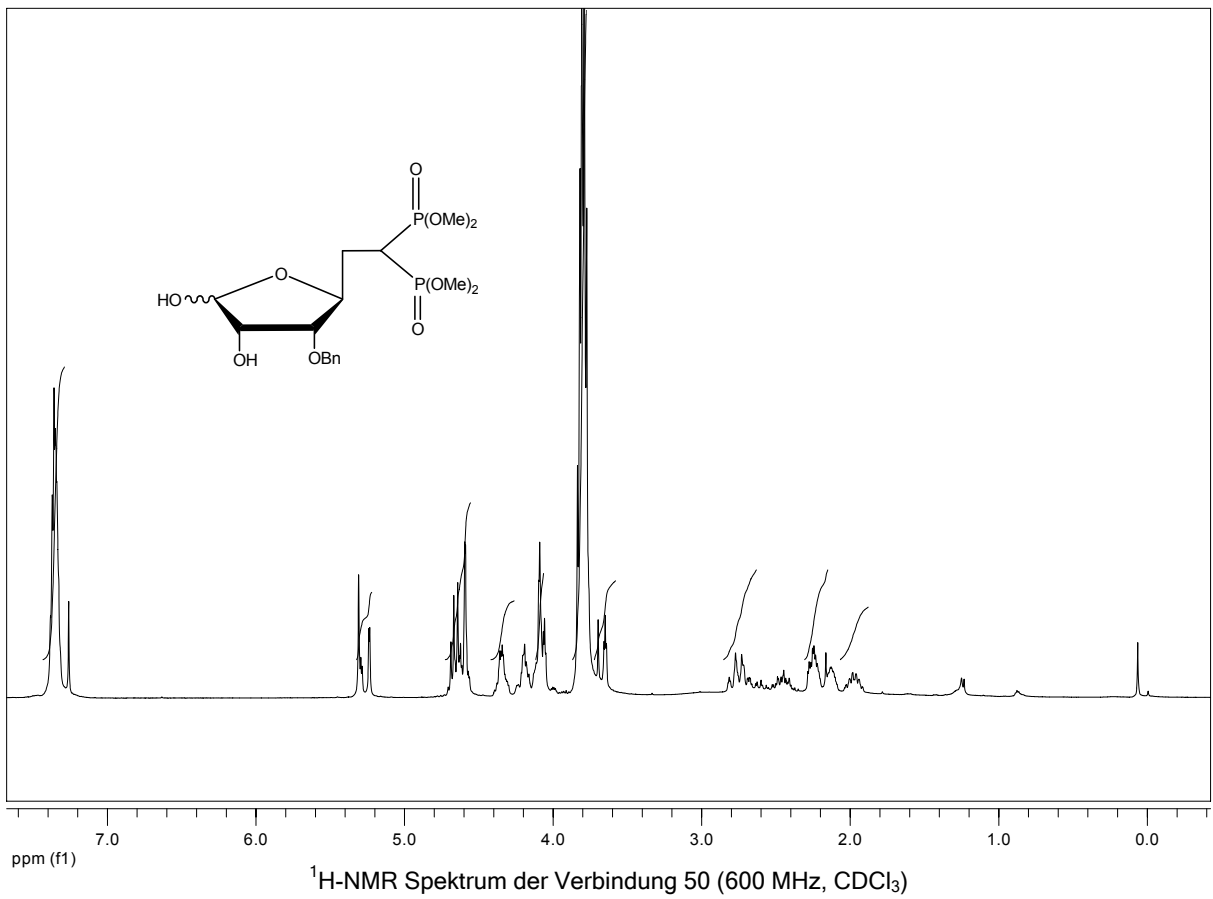
Abbildungen der NMR-Spektren



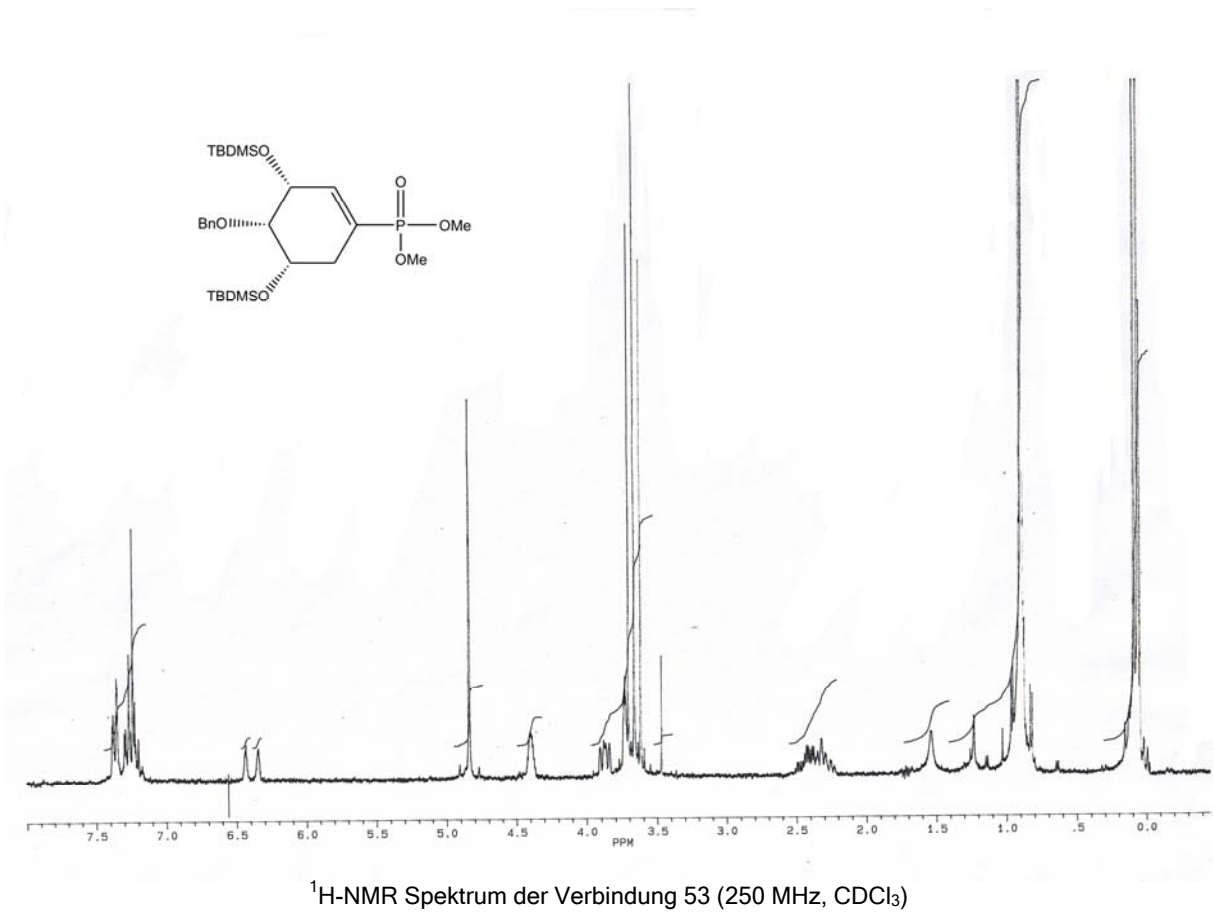
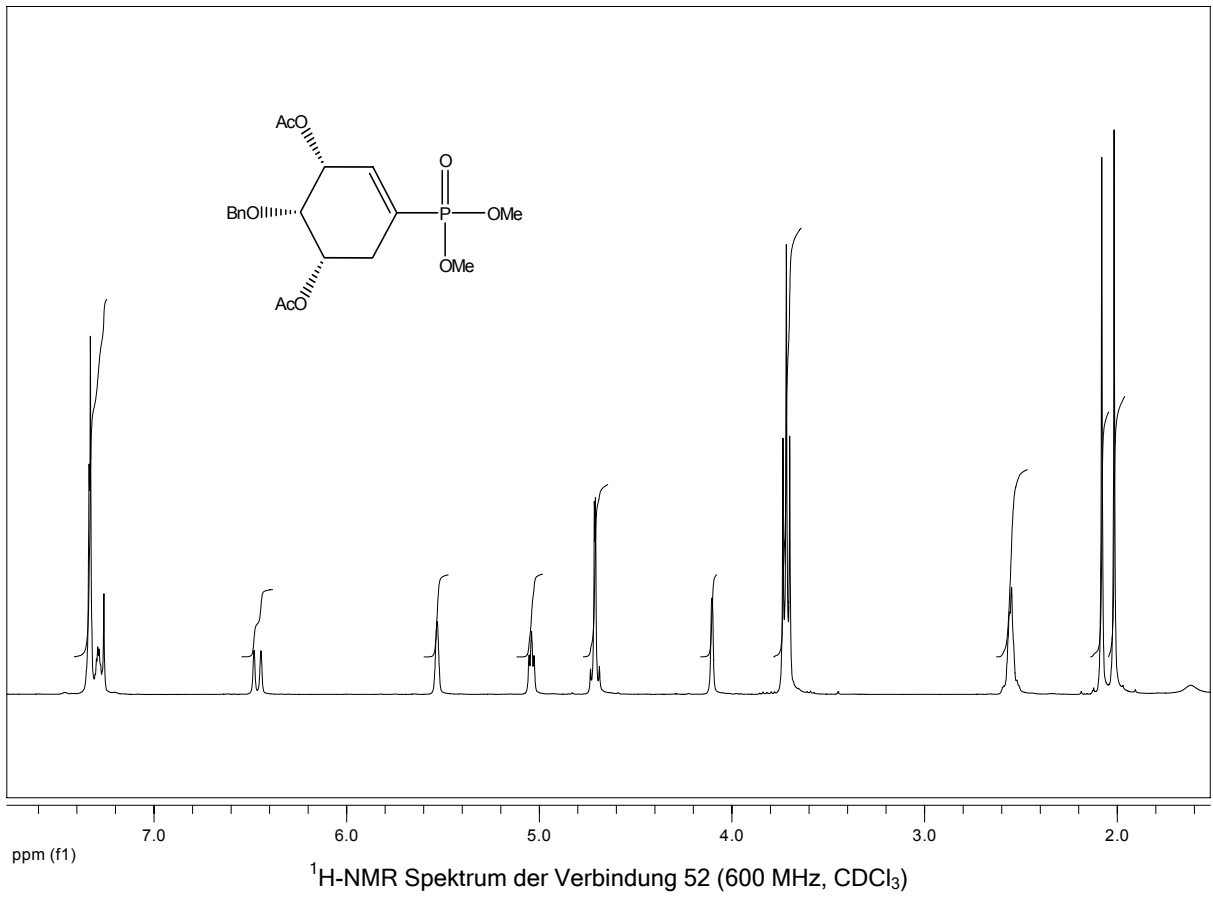
Abbildungen der NMR-Spektren



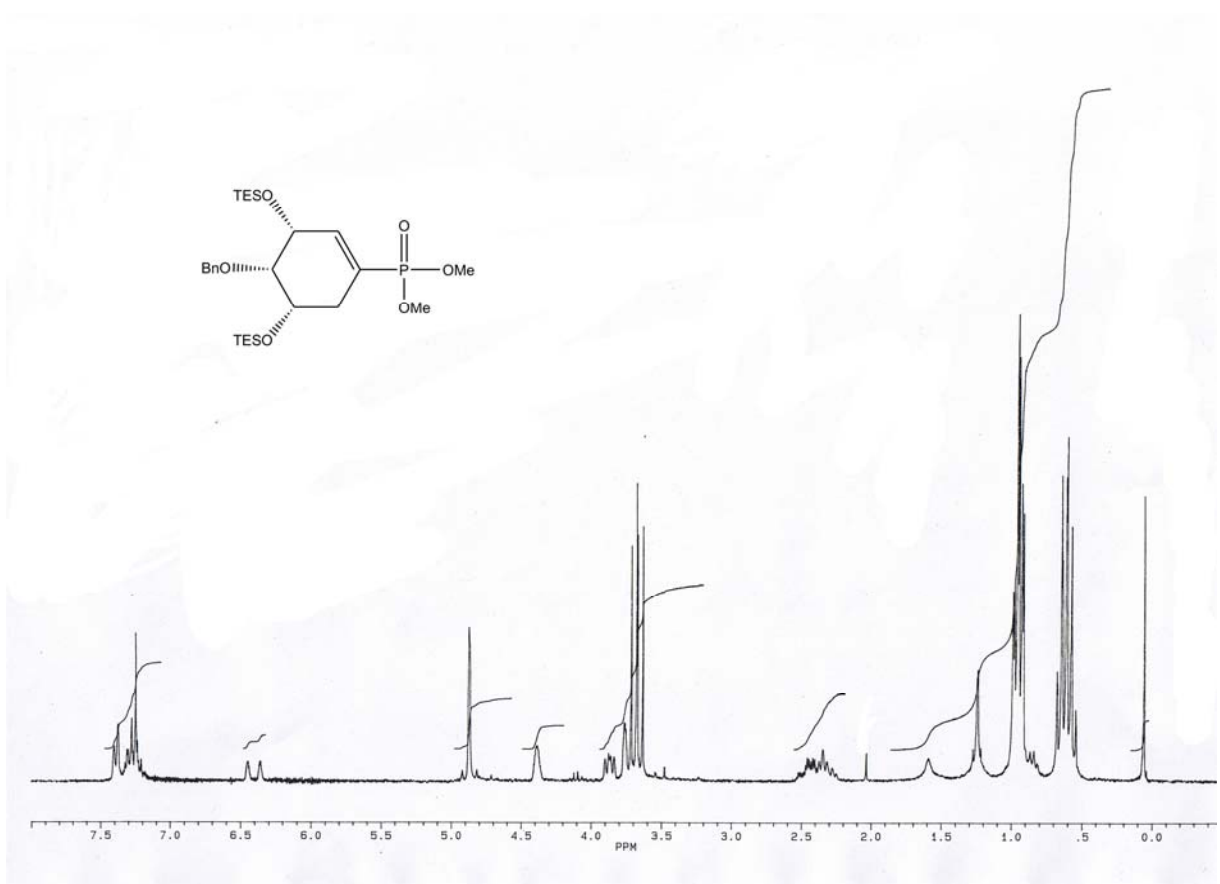
Abbildungen der NMR-Spektren



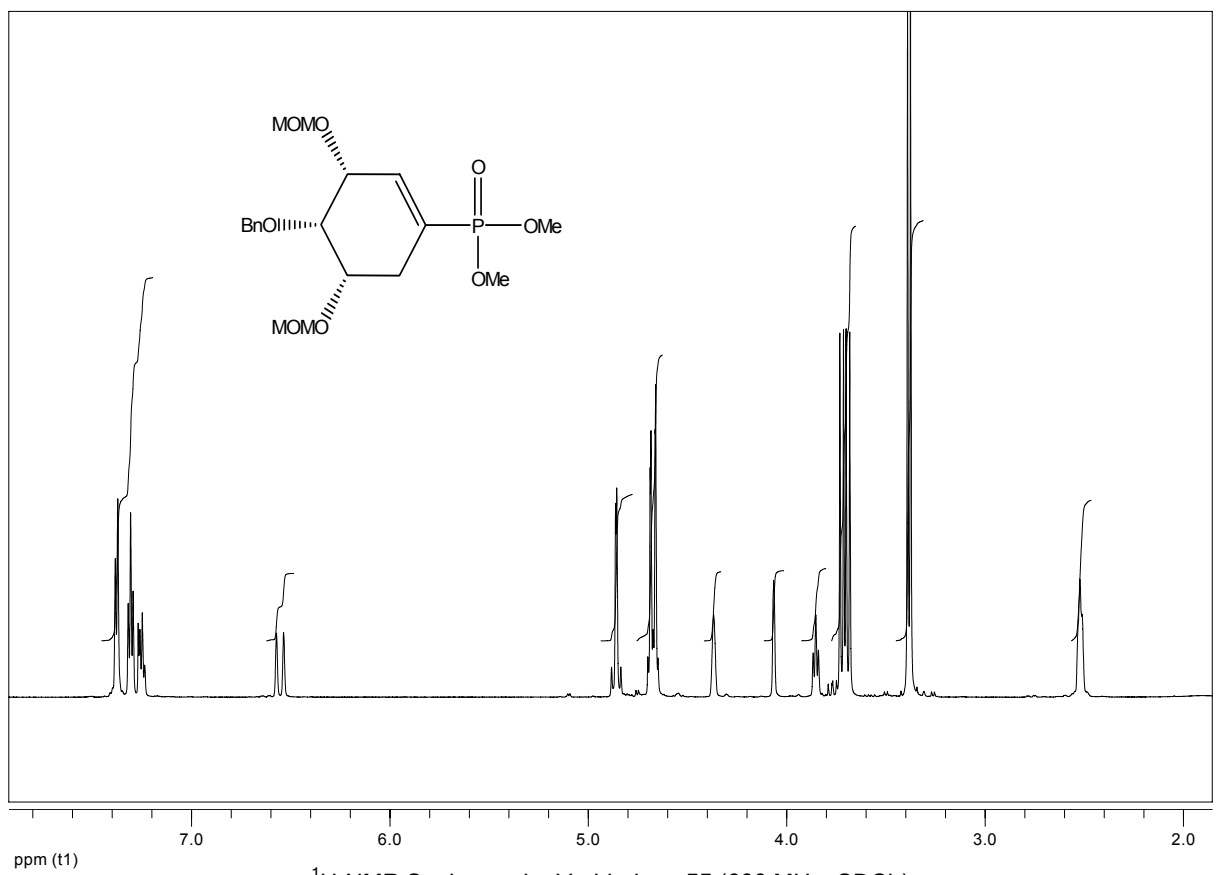
Abbildungen der NMR-Spektren



Abbildungen der NMR-Spektren

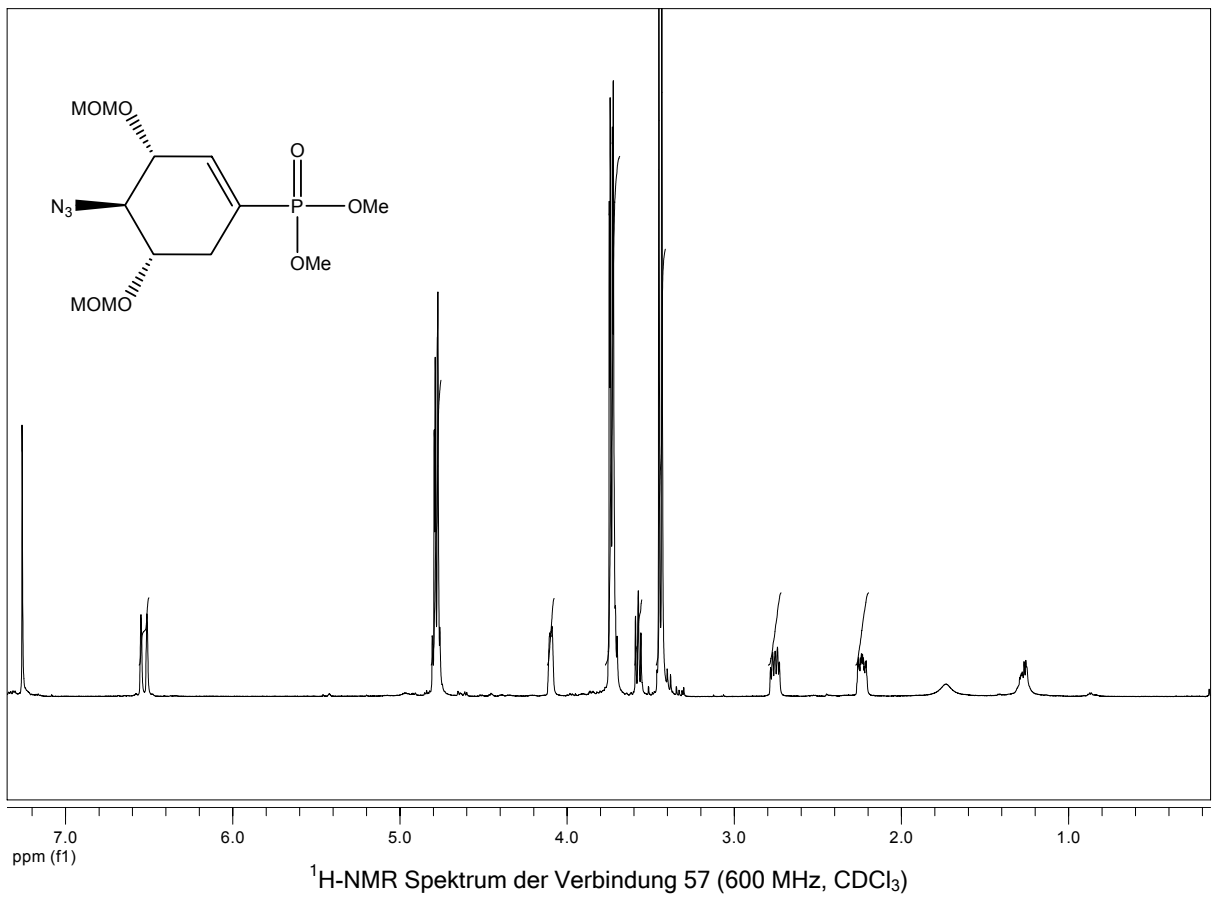
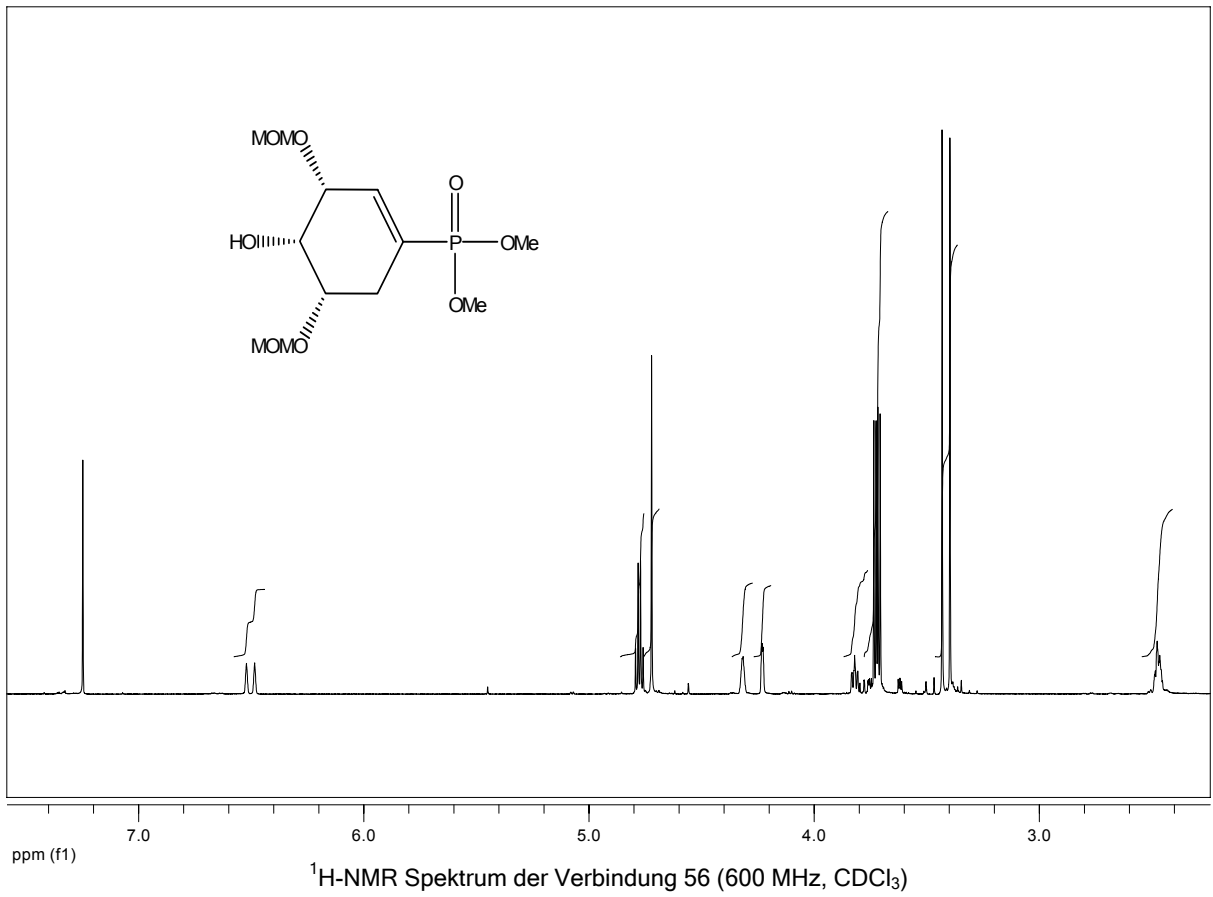


¹H-NMR Spektrum der Verbindung 54 (250 MHz, CDCl₃)

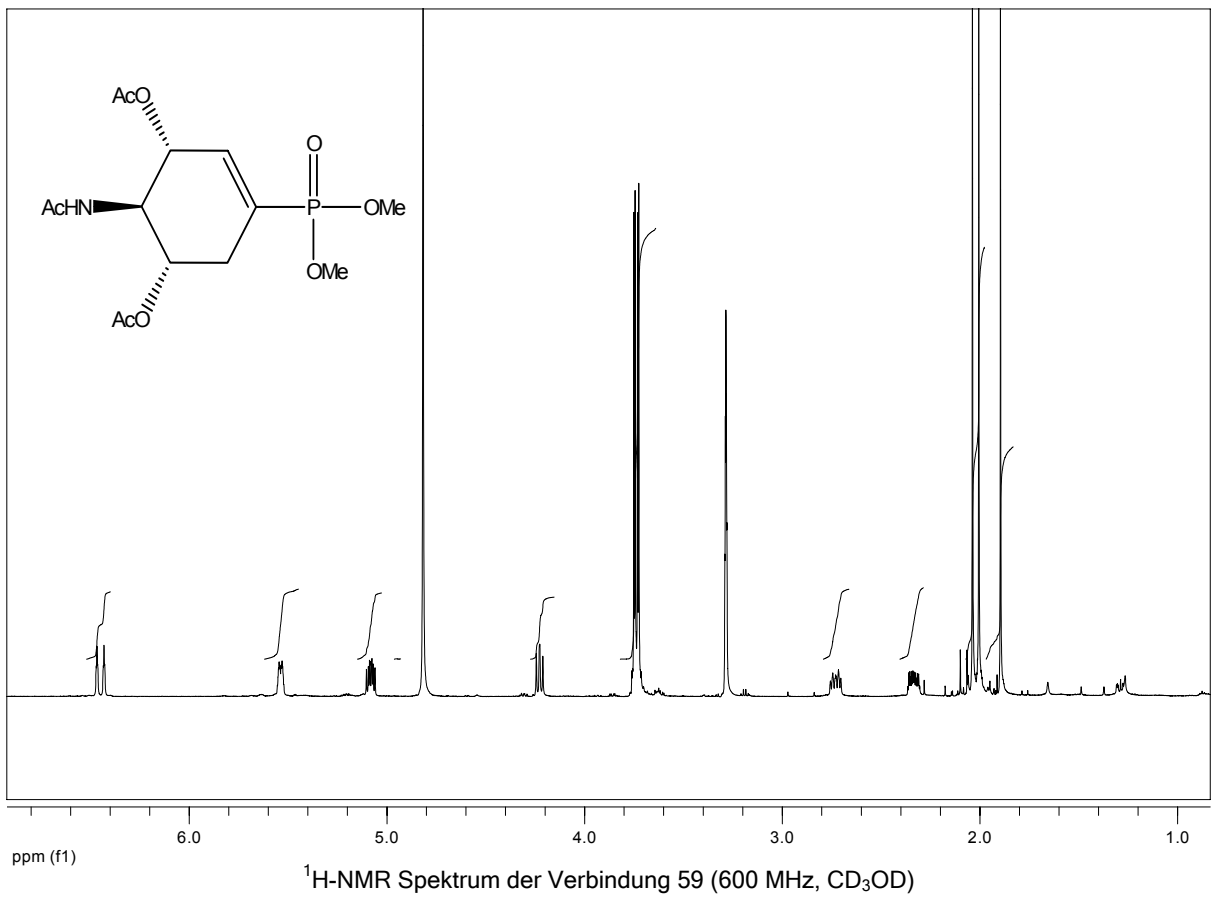
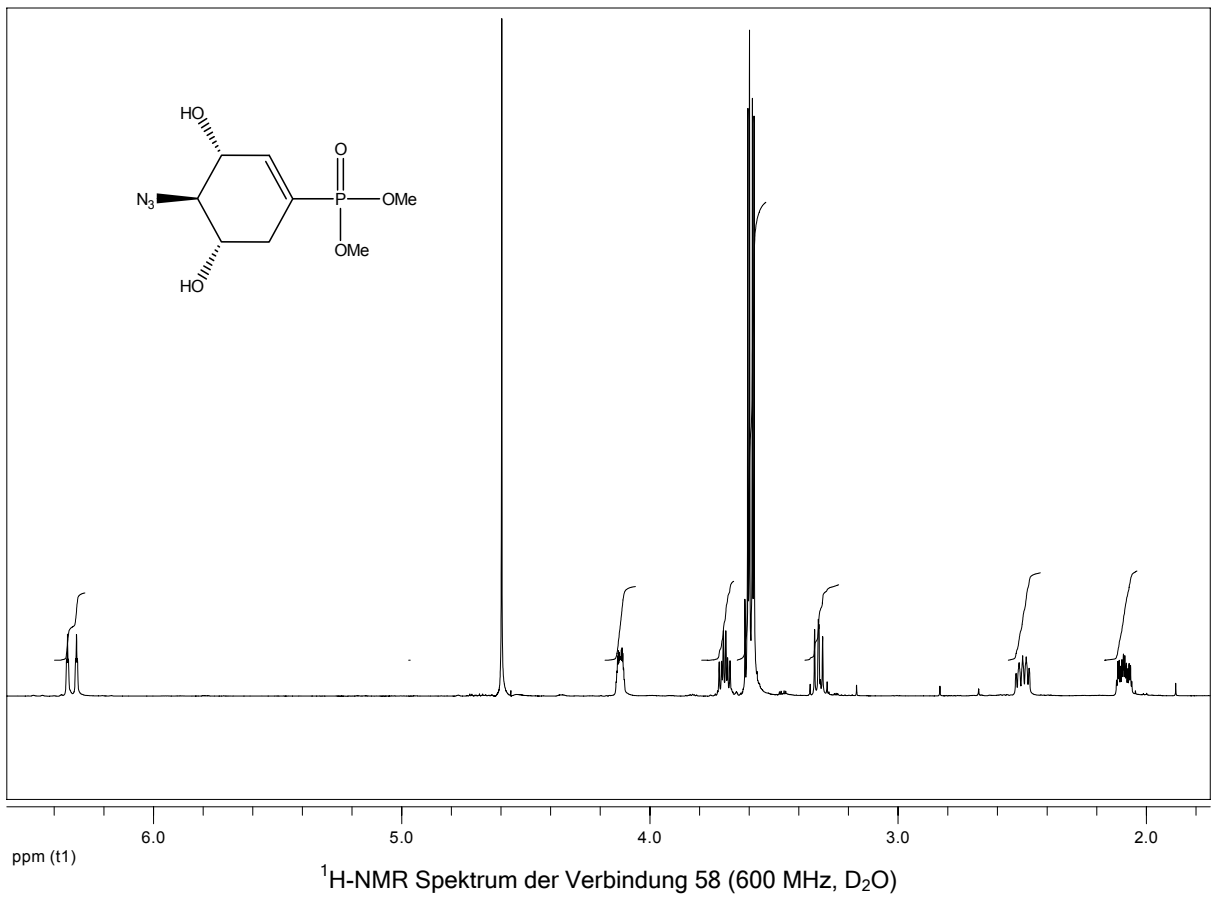


¹H-NMR Spektrum der Verbindung 55 (600 MHz, CDCl₃)

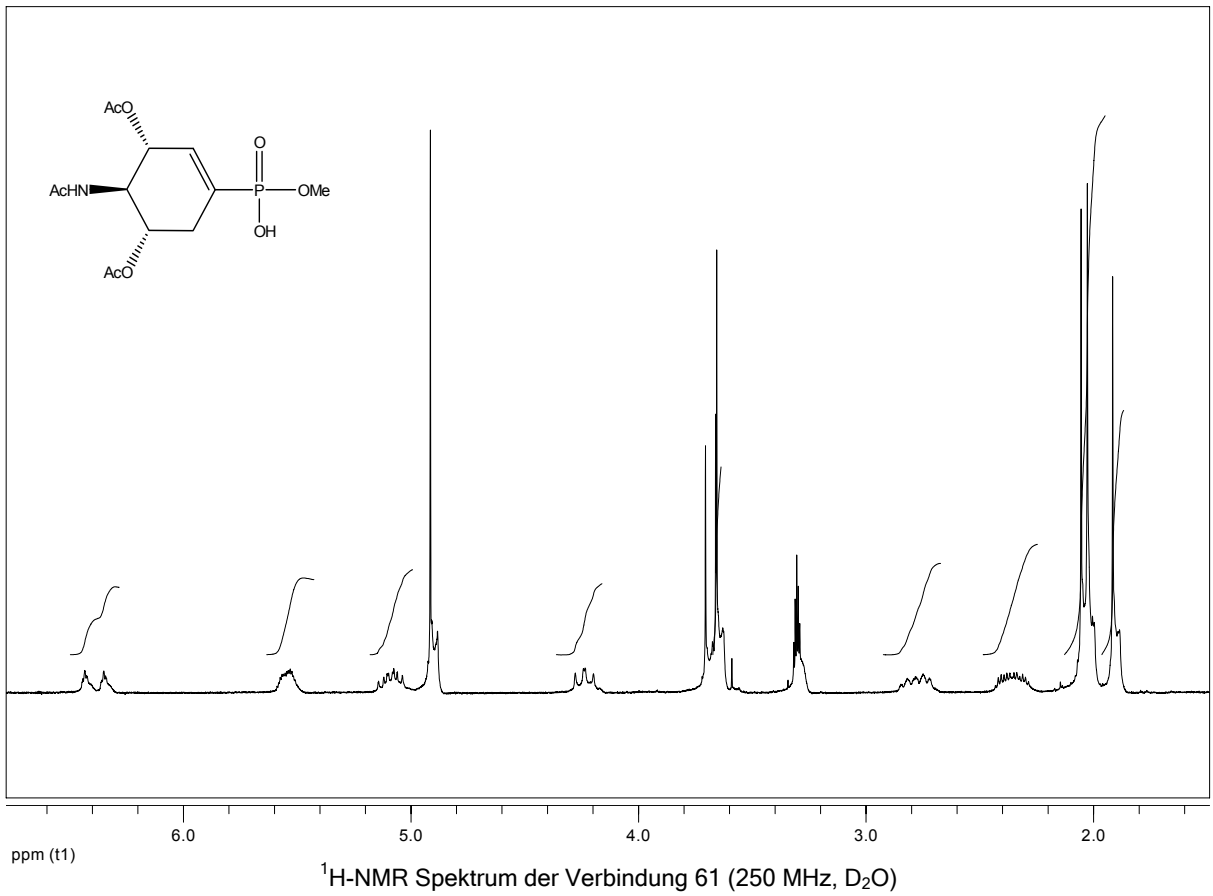
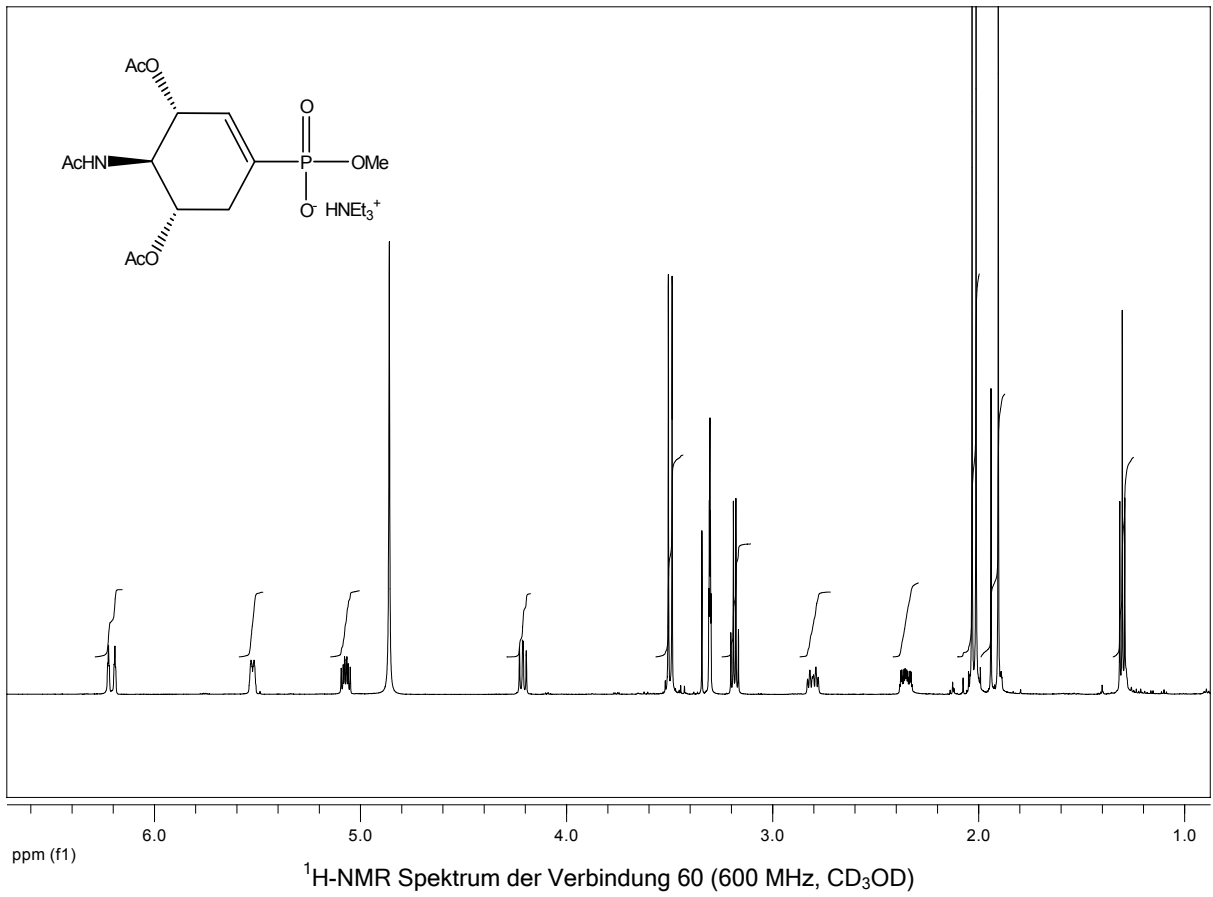
Abbildungen der NMR-Spektren



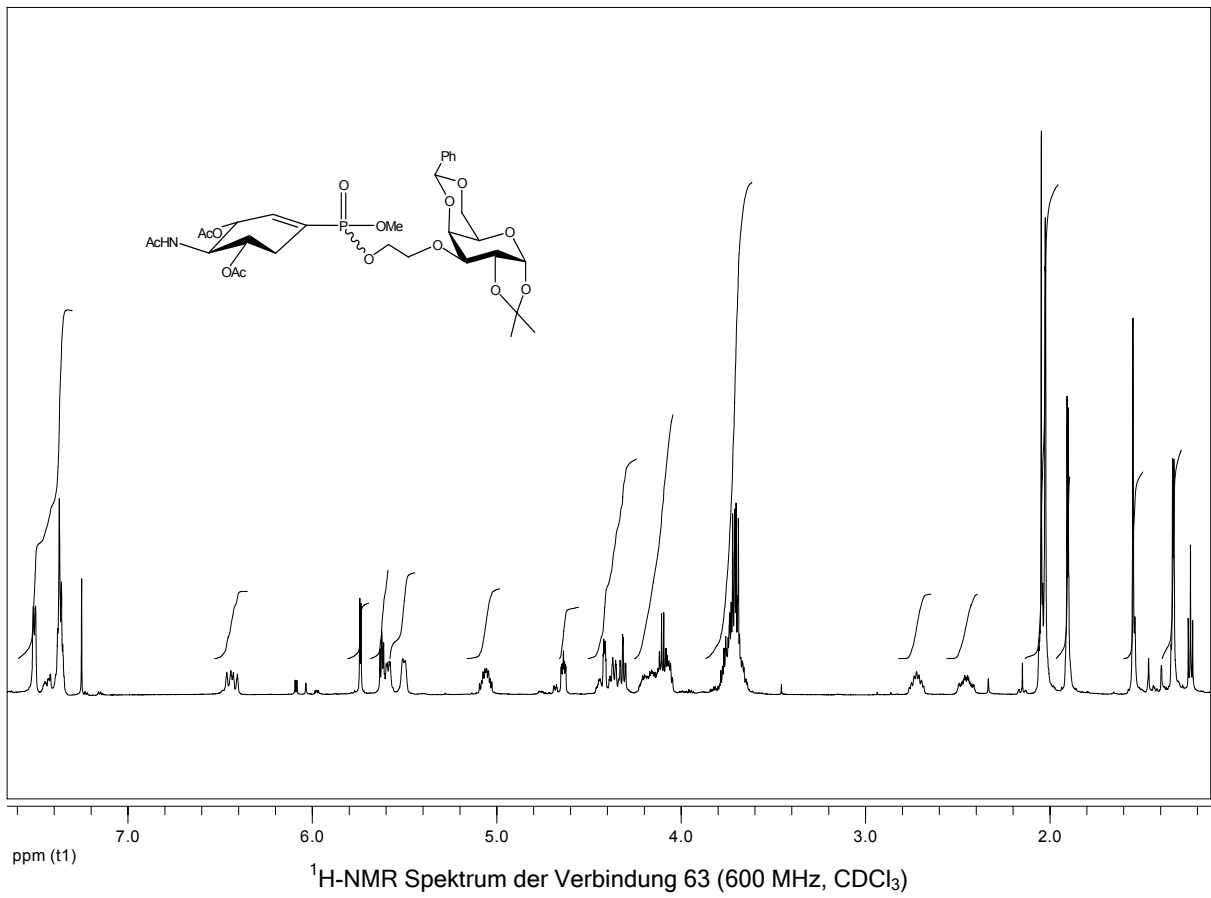
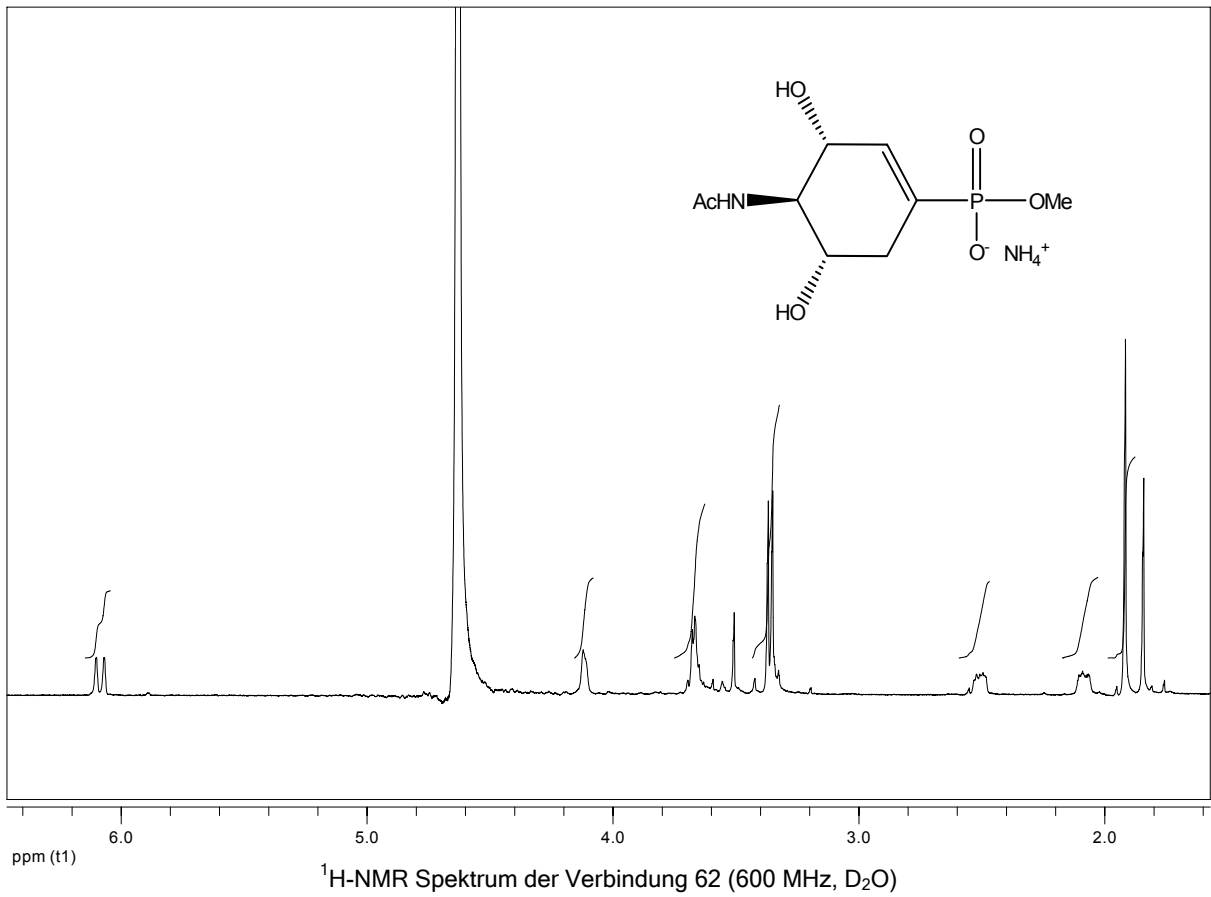
Abbildungen der NMR-Spektren



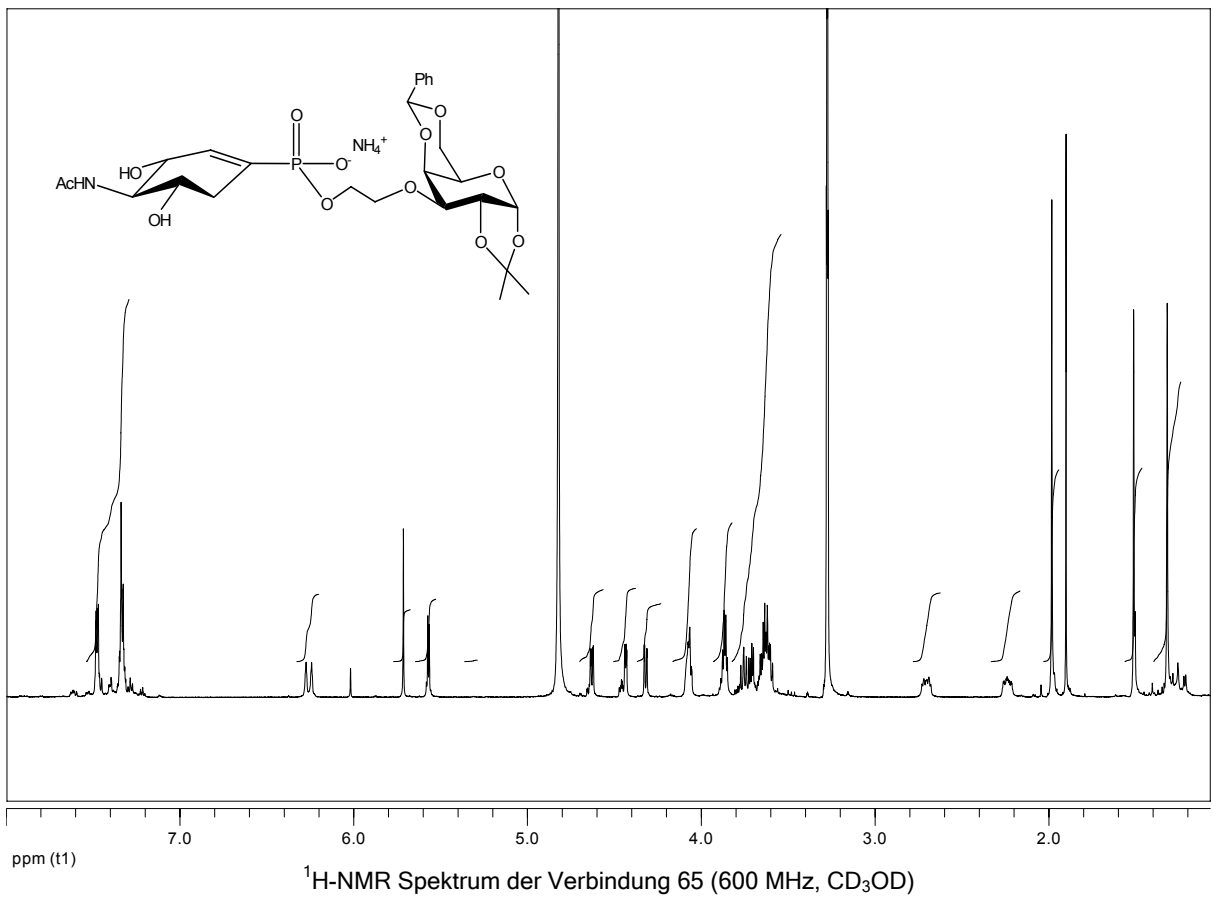
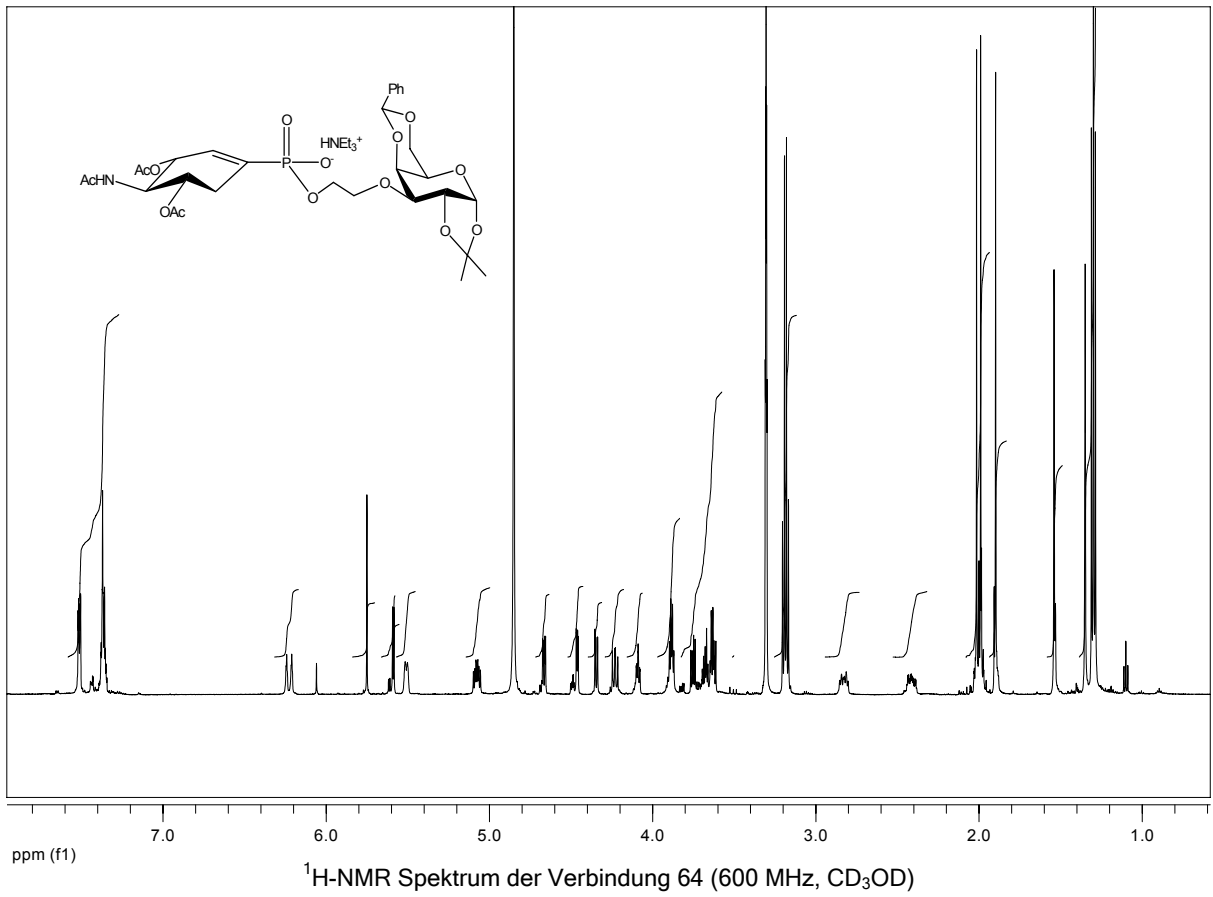
Abbildungen der NMR-Spektren



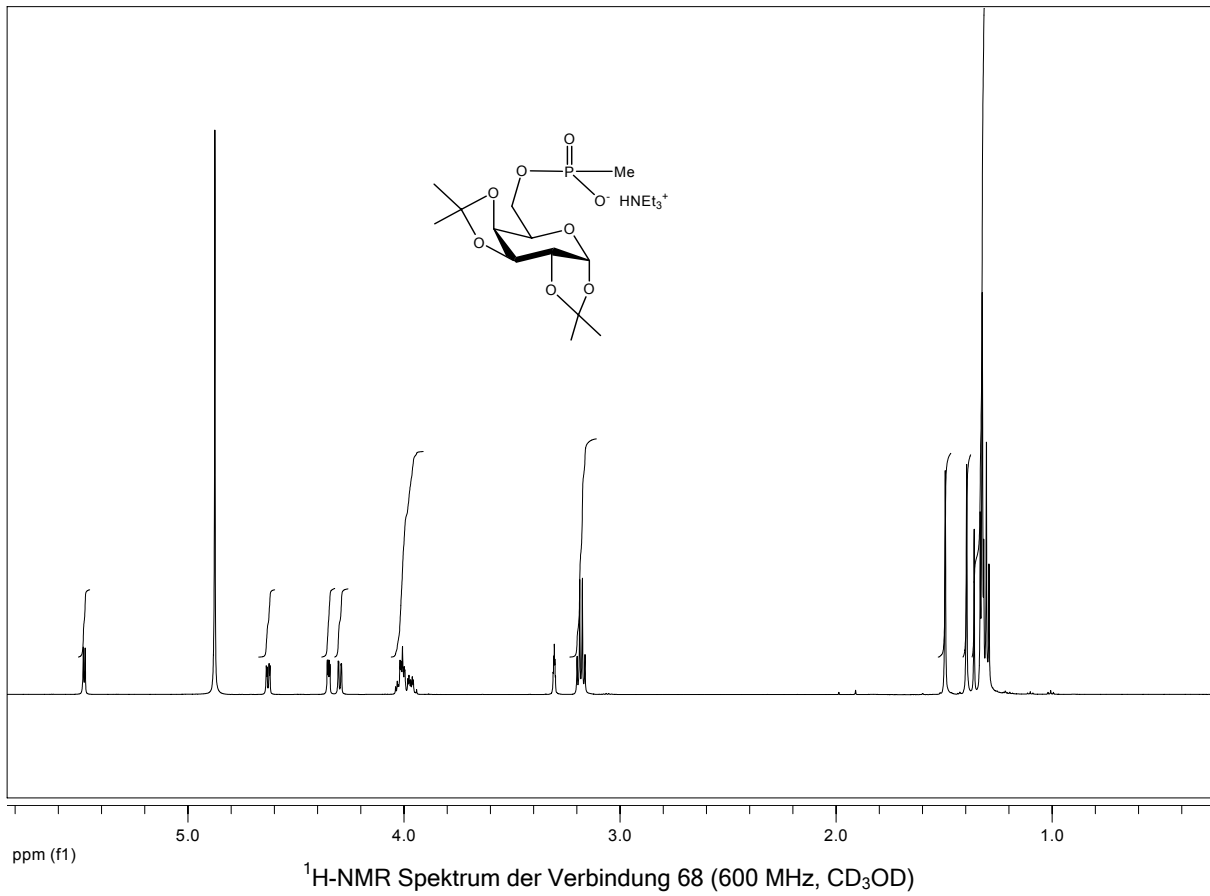
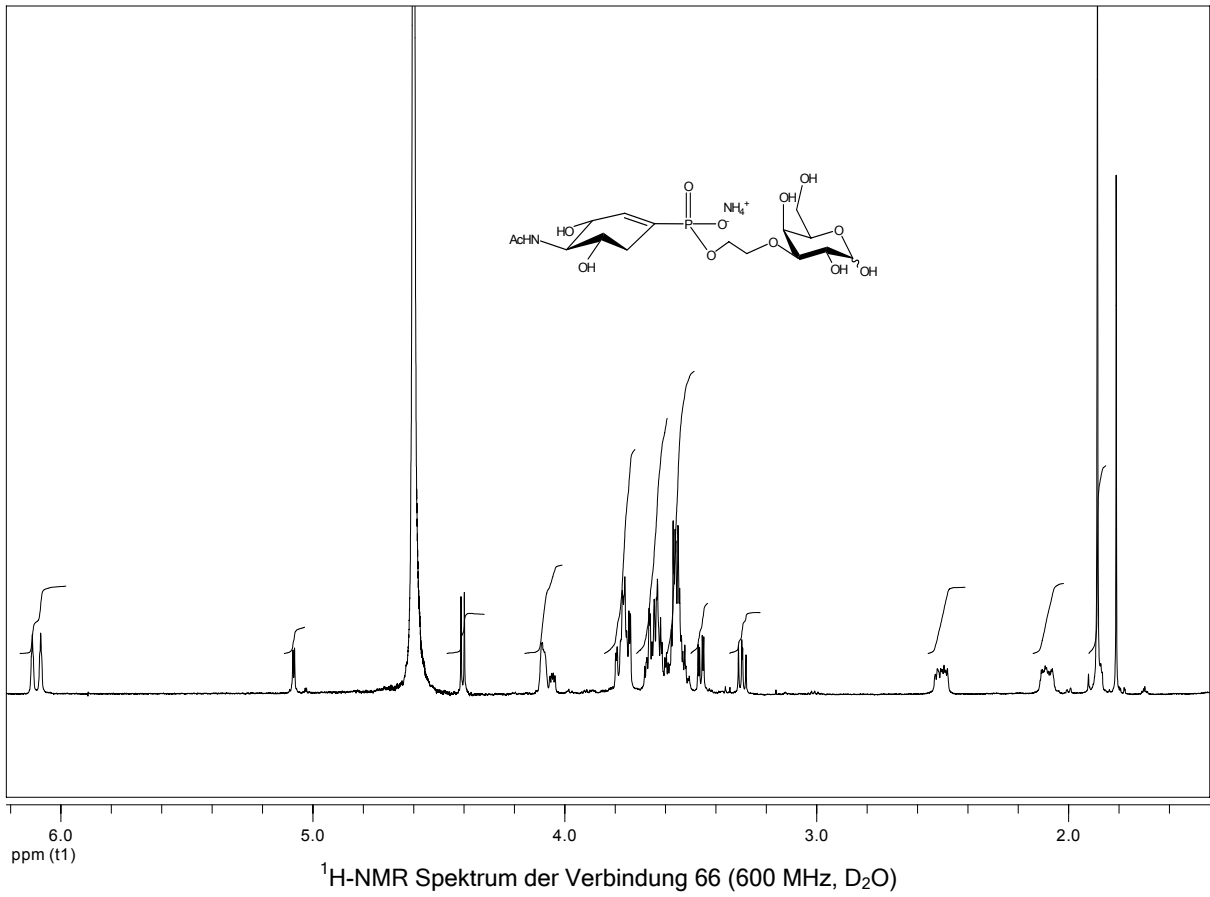
Abbildungen der NMR-Spektren



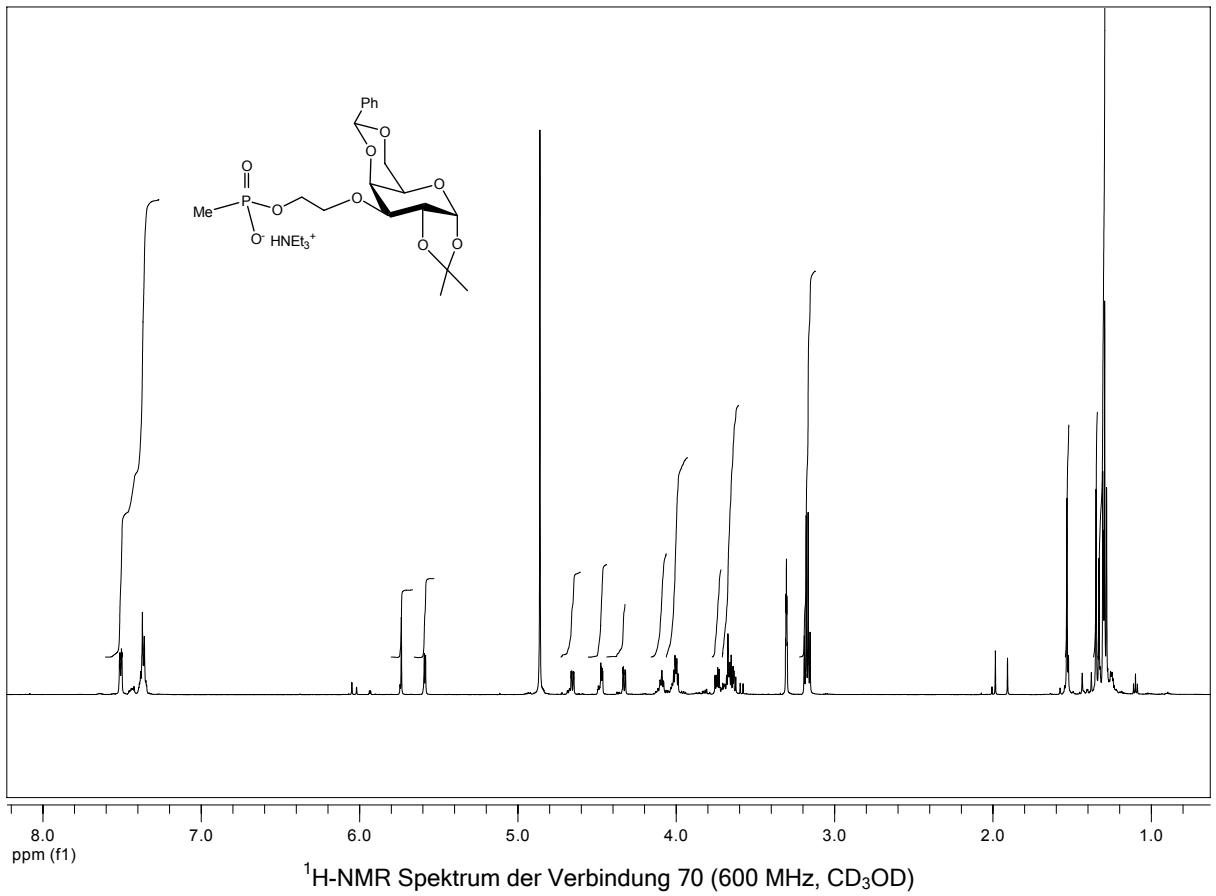
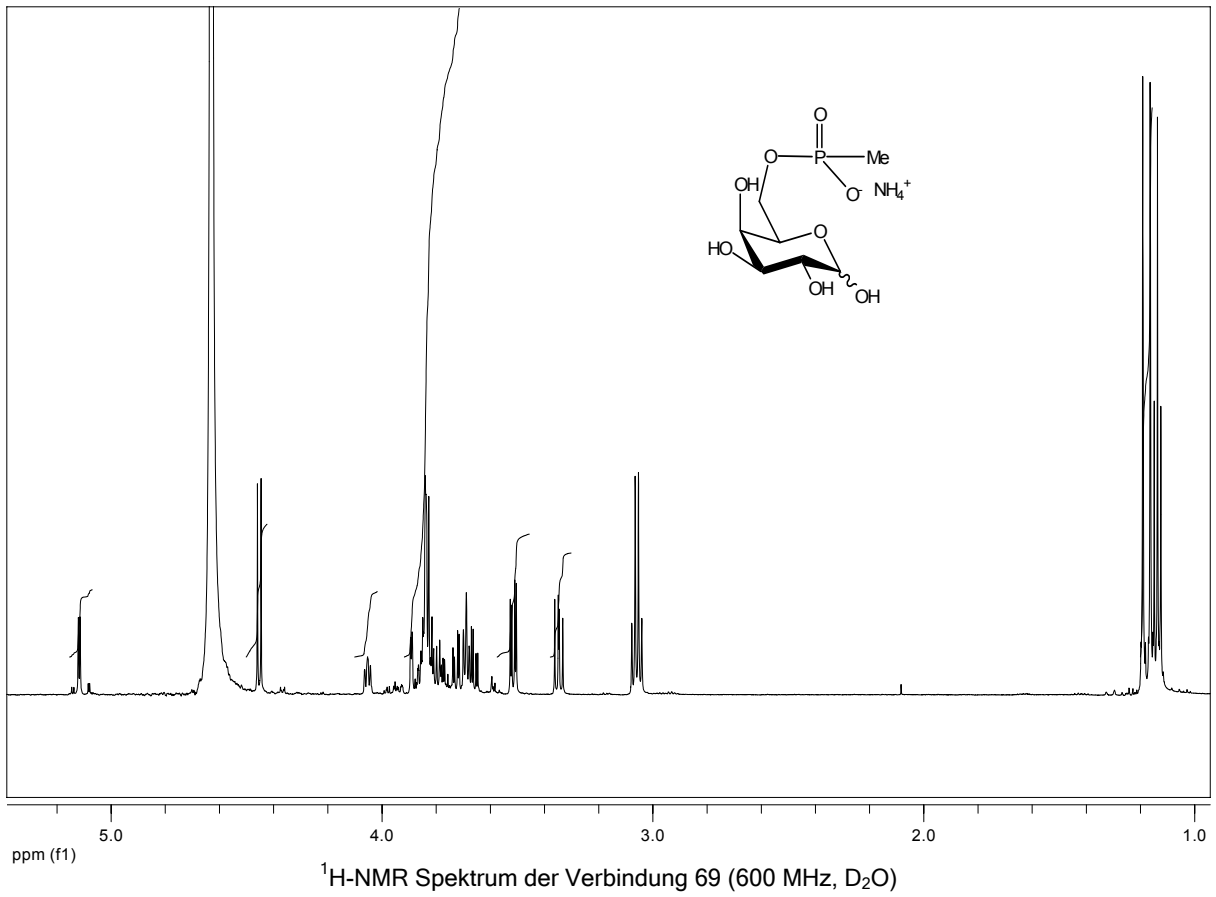
Abbildungen der NMR-Spektren



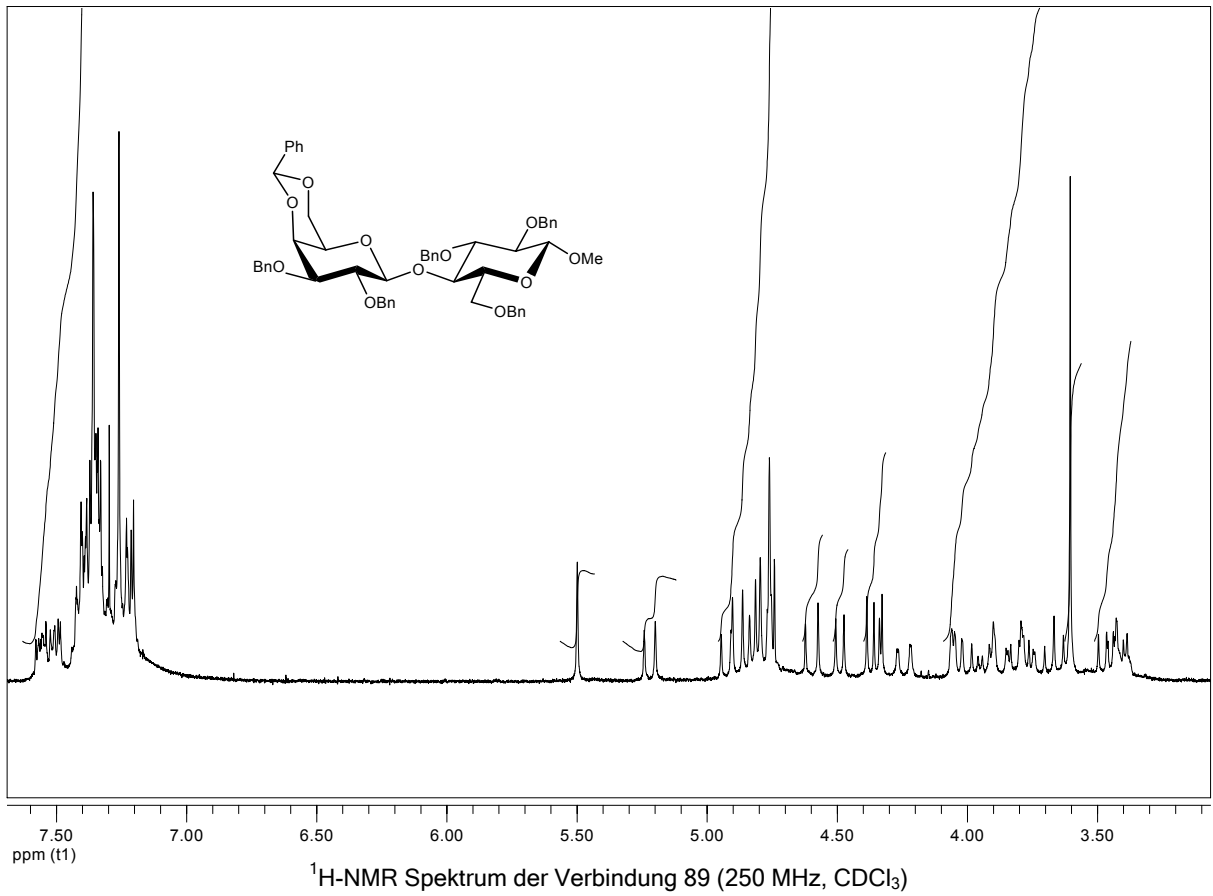
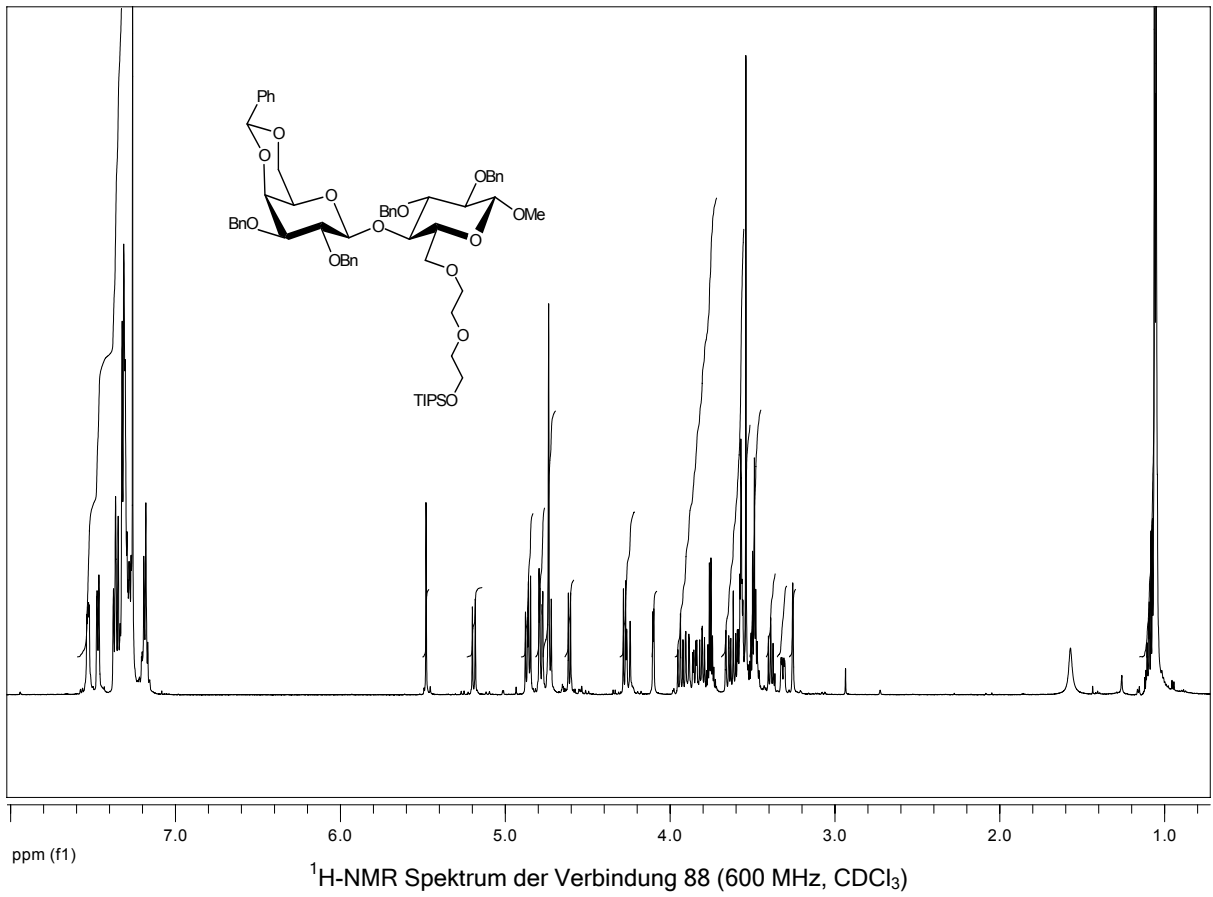
Abbildungen der NMR-Spektren



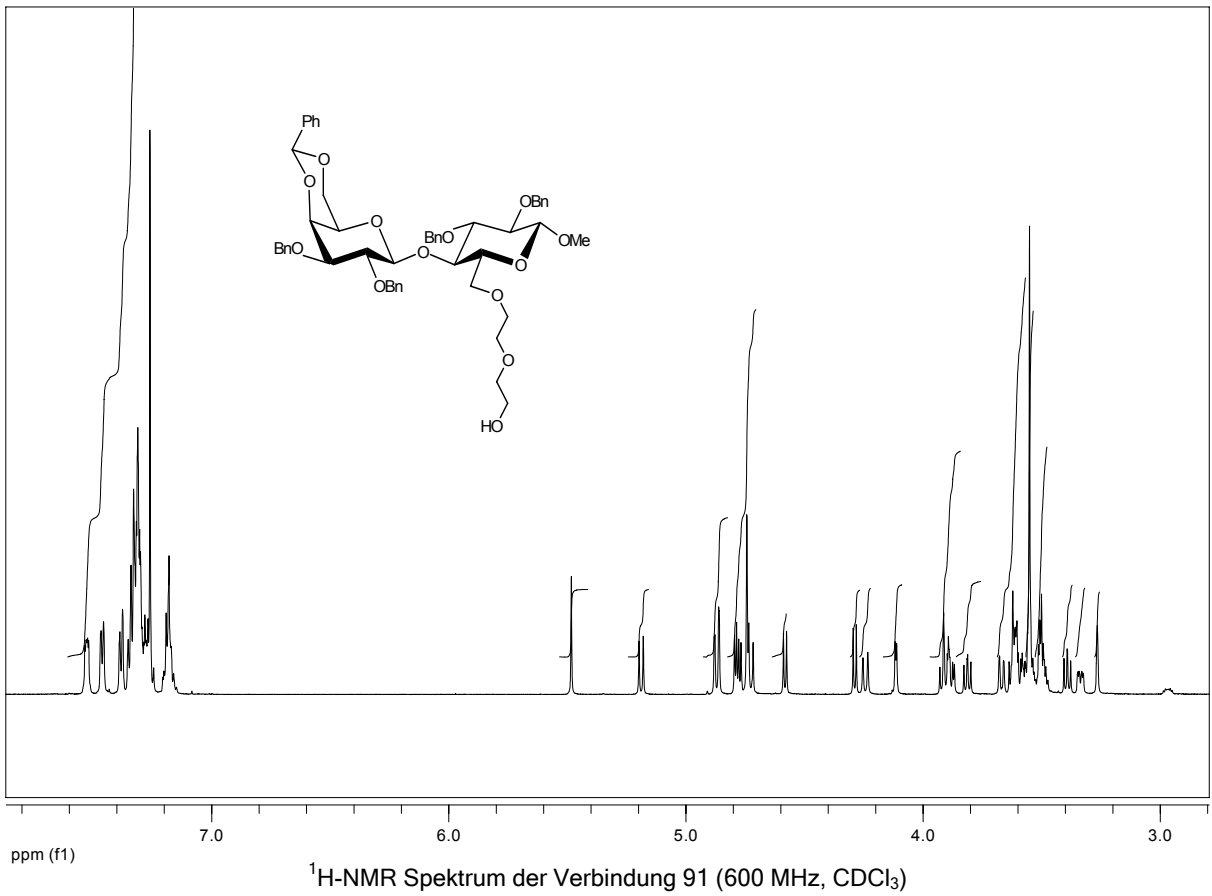
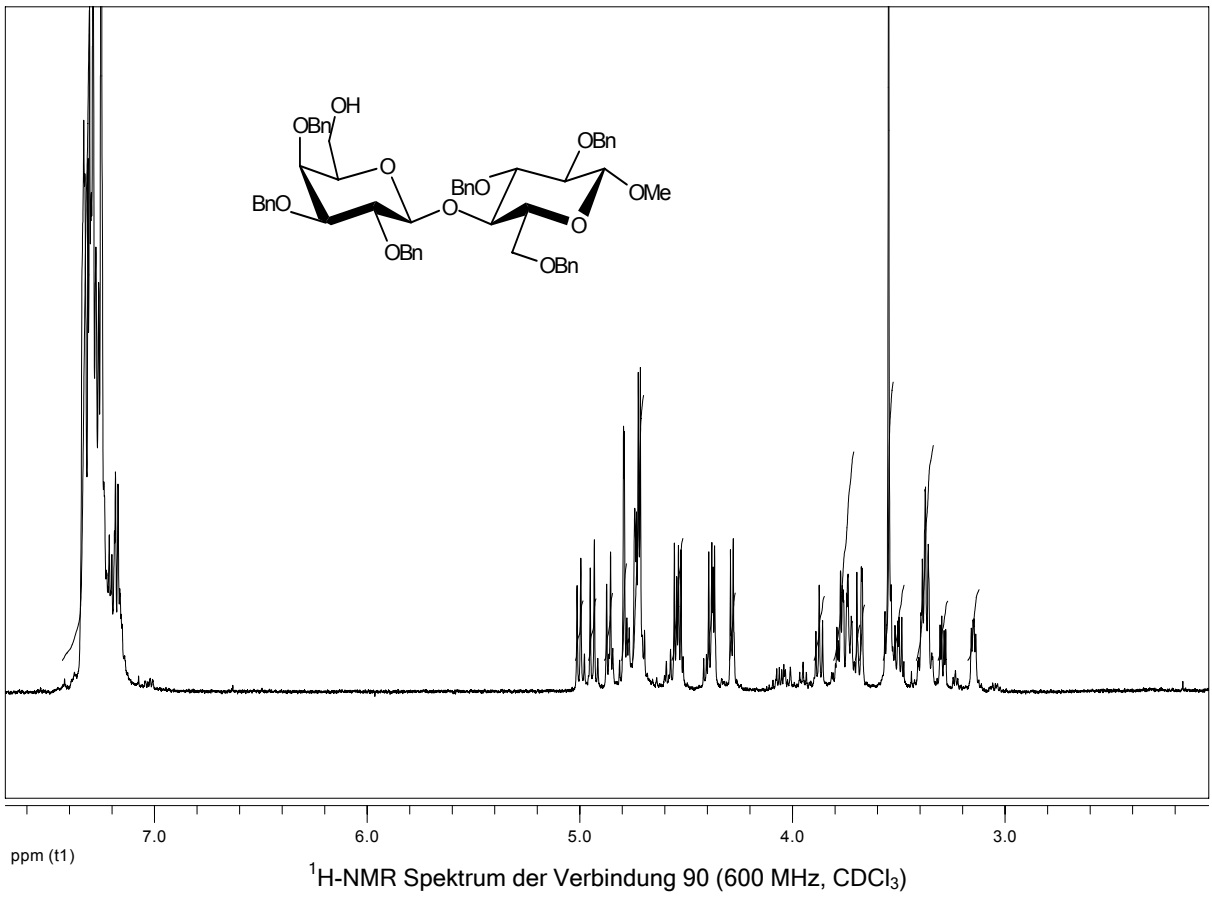
Abbildungen der NMR-Spektren



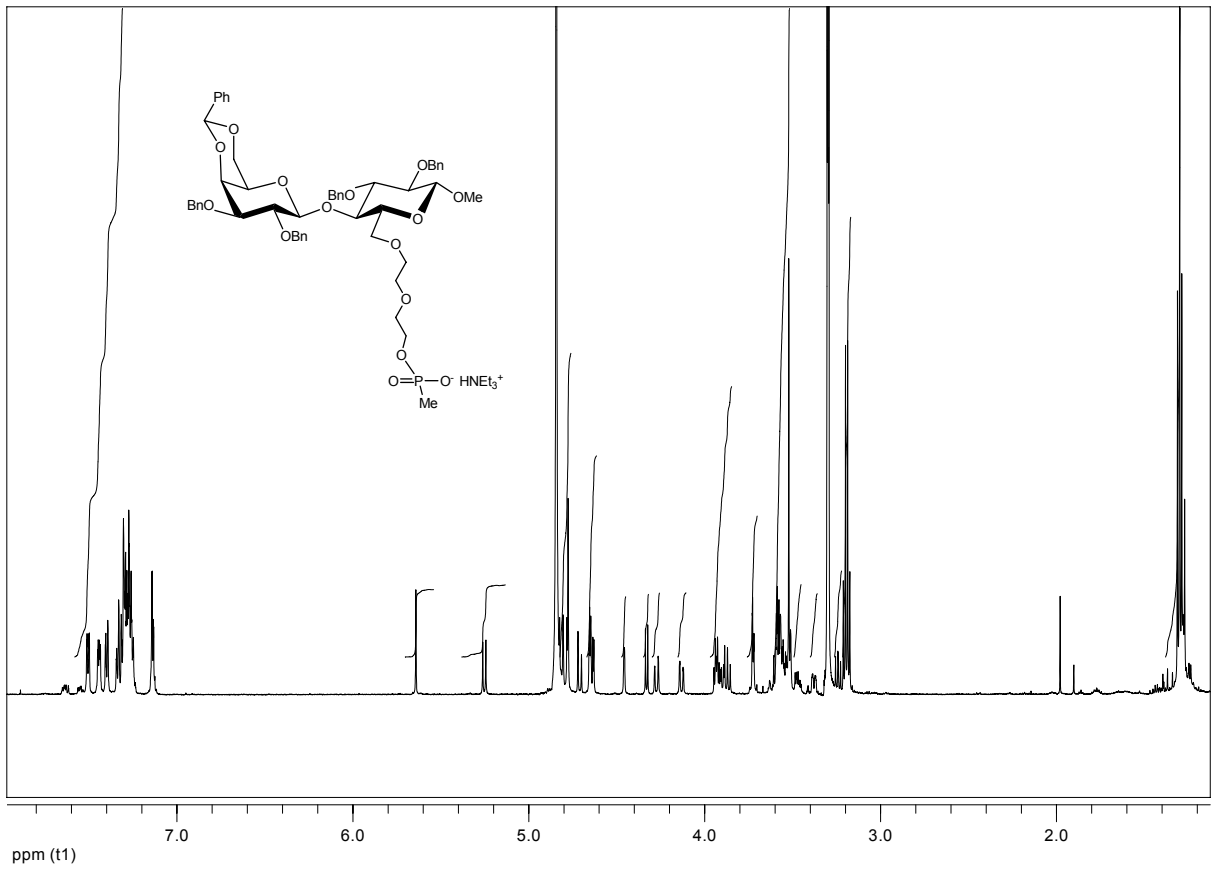
Abbildungen der NMR-Spektren



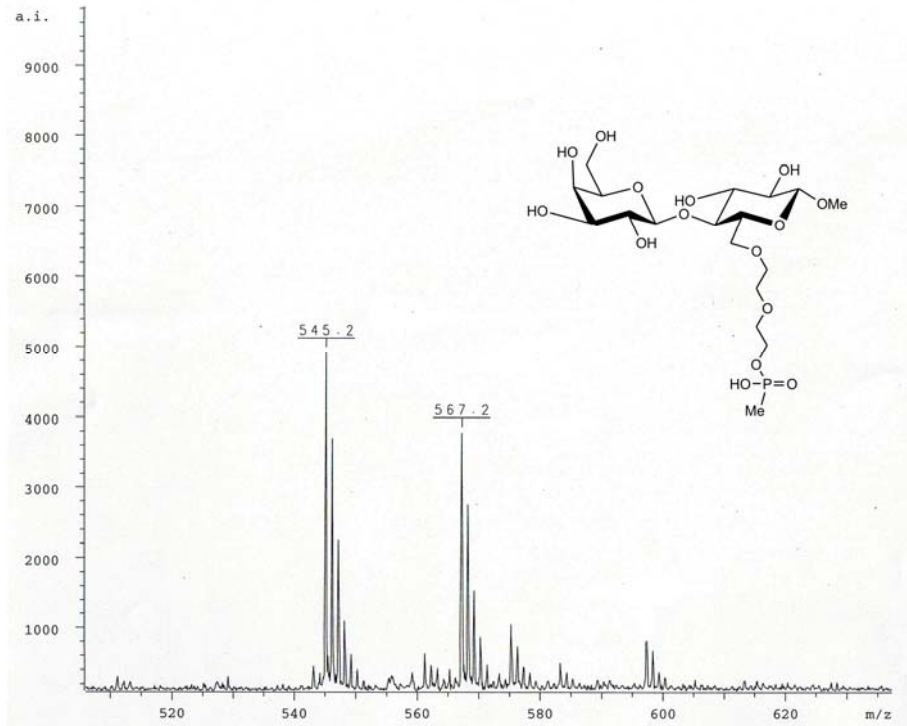
Abbildungen der NMR-Spektren



Abbildungen der NMR-Spektren



¹H-NMR Spektrum der Verbindung 92 (600 MHz, CD₃OD)

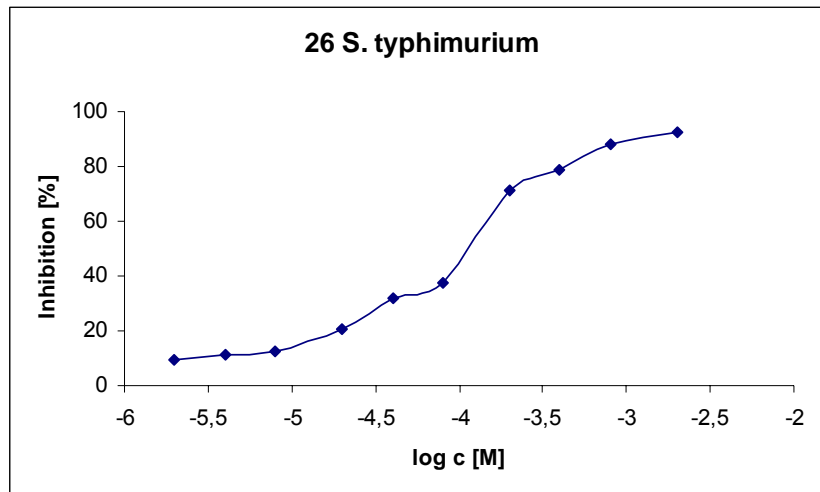


Maldi-ToF-Spektrum der Verbindung 93

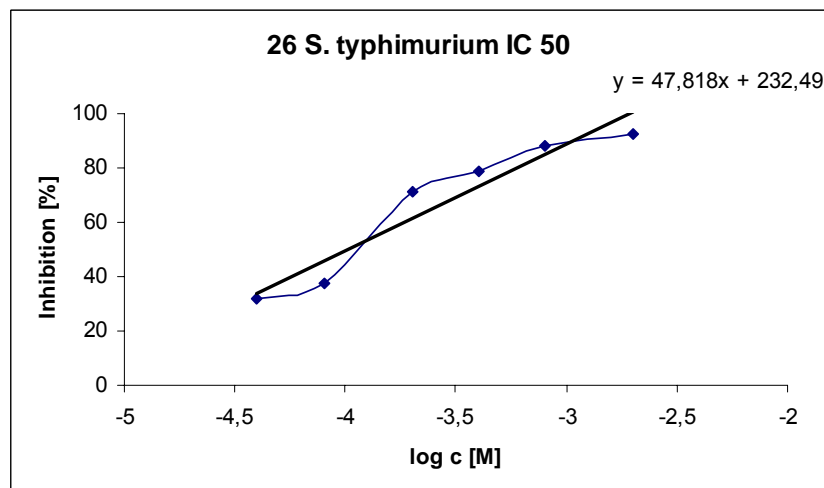
6. Diagramme zu den Inhibitionstests

Es wird jeweils ein Diagramm exemplarisch abgebildet. Der IC_{50} -Wert wurde aus mindestens drei Messung als arithmetisches Mittel gewonnen.

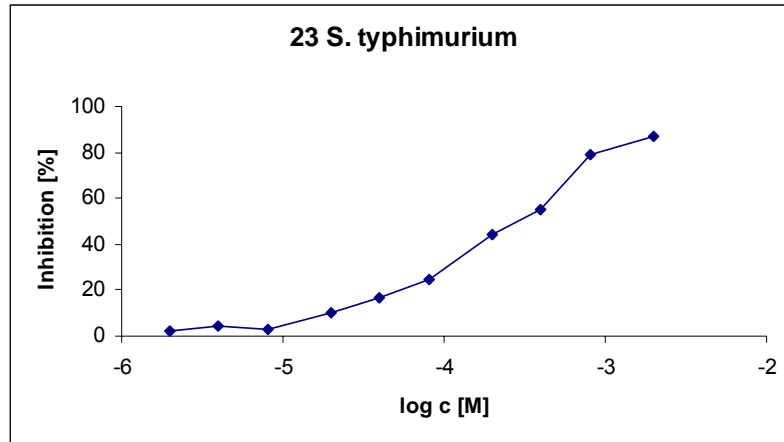
Test von Verbindung **26** an *S. typhimurium*:



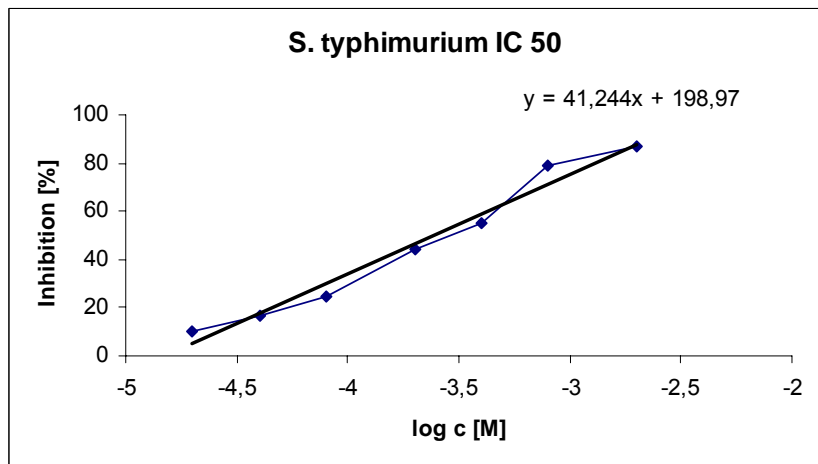
Bestimmung des IC_{50} -Werts (0.2 mM):



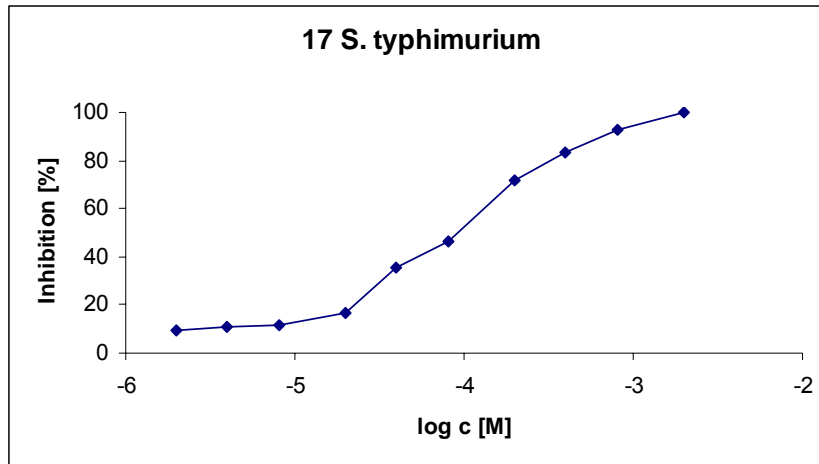
Test von Verbindung **23** an *S. typhimurium*:



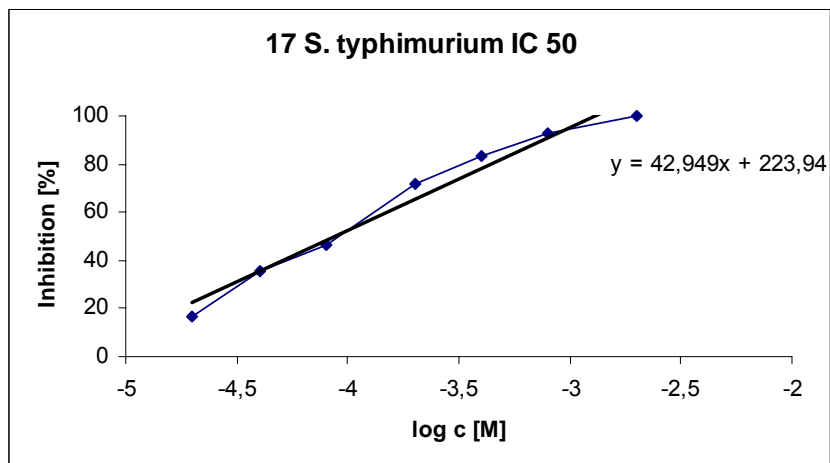
Bestimmung des IC₅₀ -Werts (0.2 mM).



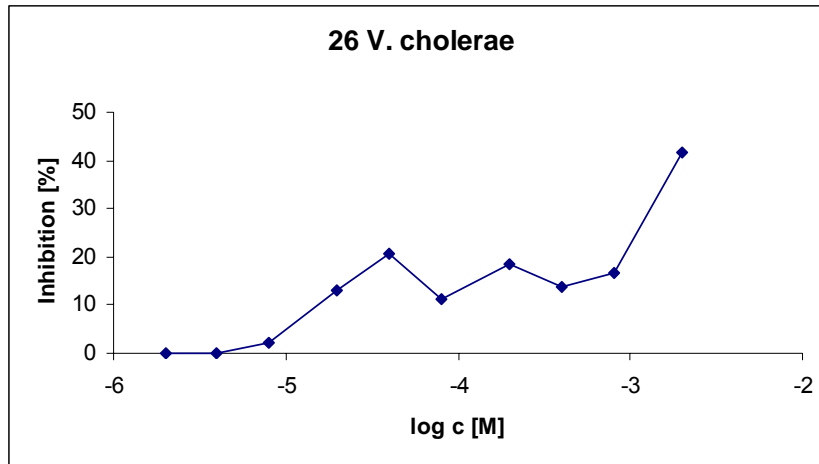
Test von Verbindung 17 an *S. typhimurium*:



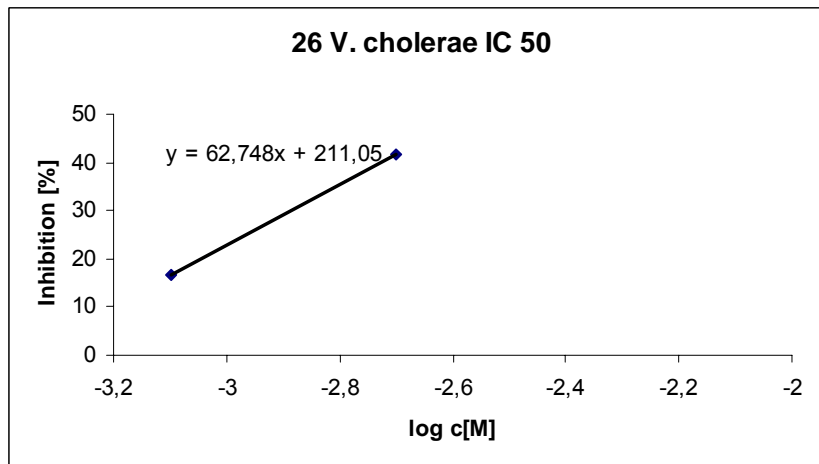
Bestimmung des IC₅₀ -Werts (0.09 mM):



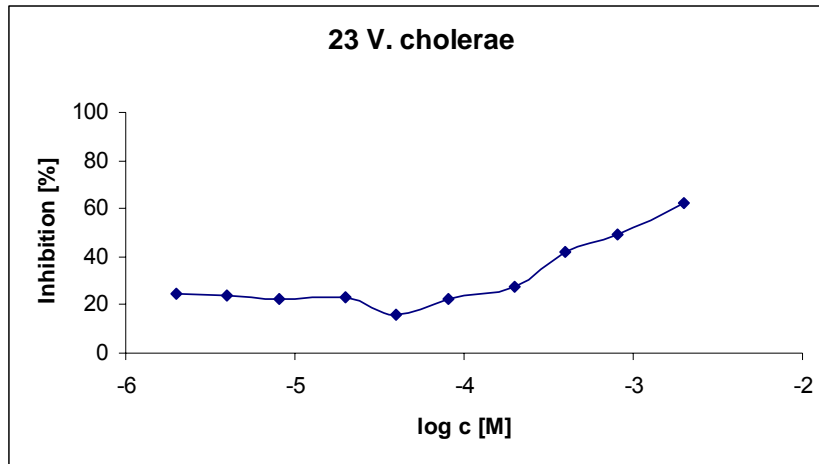
Test von Verbindung **26** an *V.cholerae*:



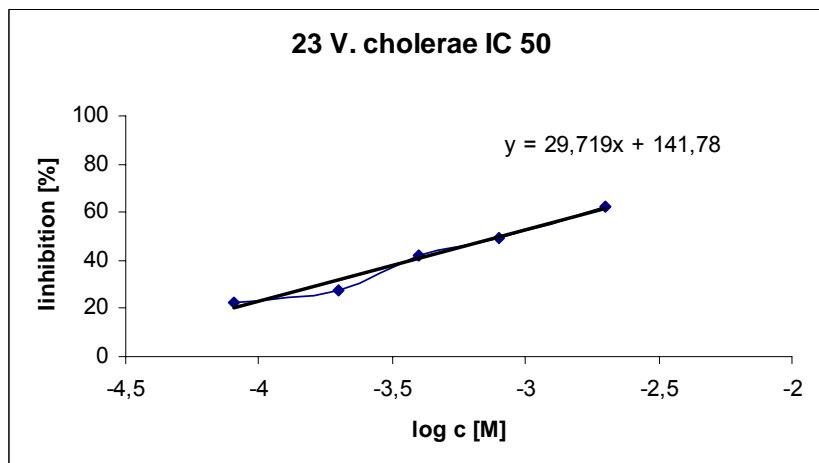
Bestimmung des IC₅₀ -Werts: (3 mM)



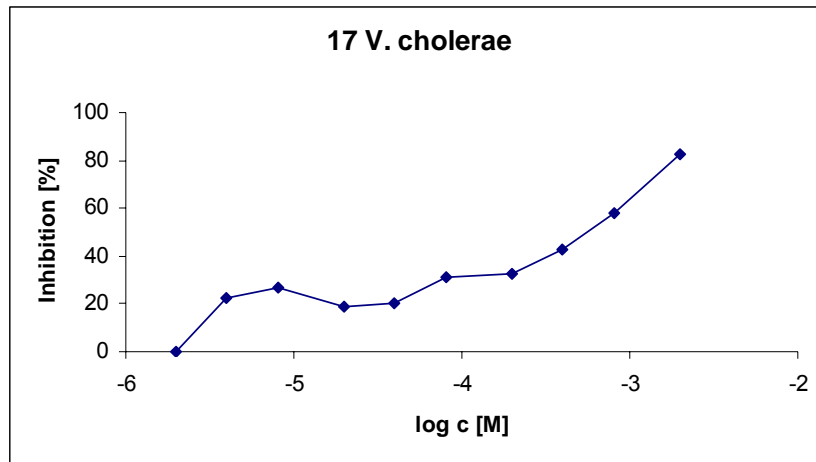
Test von Verbindung **23** an *V.cholerae*:



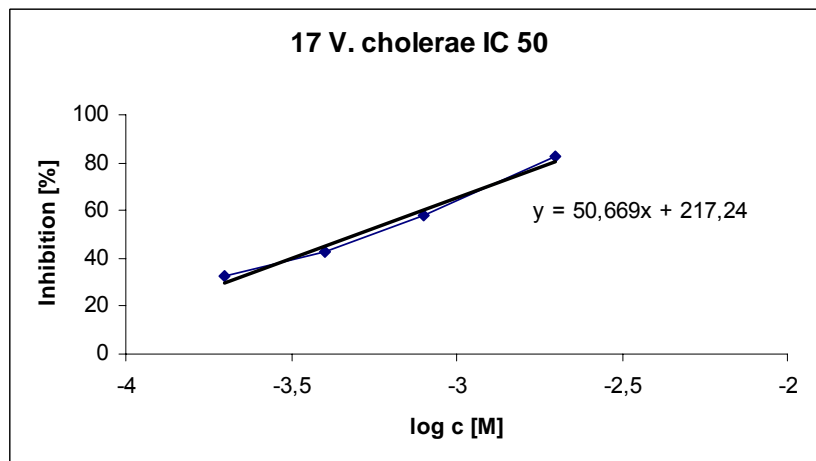
Bestimmung des IC₅₀ -Werts (0.8 mM):



Test von Verbindung **17** an *V. cholerae*.



Bestimmung des IC₅₀ -Werts: (0.5 mM)



7. Literaturverzeichnis

- [1] G. Taylor, in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Vol. 3 (Eds.: B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, pp. 485-495.
- [2] R. Schauer, *Trends Biochem. Sci* **1985**, *10*, 357-360.
- [3] T. Angata, A. Varki, *Chem Rev* **2002**, *102*, 439-469.
- [4] R. Schauer, J. P. Kamerling, in *Glycoproteins II* (Eds.: J. Montreuil, J.F.G. Vliegenthardt, H. Schachter), Elsevier, Amsterdam, **1997**, pp. 241-400.
- [5] A. K. J. Chong, M. S. Pegg, N. R. Taylor, M. Von Itzstein, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *207*, 335-343.
- [6] G. Taylor, *Curr Op Struct Biol.* **1996**, *6*, 830-837.
- [7] W. Graeme Laver, N. Bischofberger, R. G. Webster, *Spektrum der Wissenschaft* **1999**, *3*, 70-79.
- [8] R. G. Webster, E. J. Walker, *Spektrum der Wissenschaft* **2003**, *8*, 48-55.
- [9] A. P. Corfield, *Glycobiology* **1992**, *2*, 509-521.
- [10] C. Traving, R. Schauer, *Cell. Mol. Life. Sci.* **1998**, *54*, 1330-1349.
- [11] S. Schenkman, L. Pontes de Carvalho, V. Nussenzweig, *J.Exp. Med.* **1992**, *175*, 567-575.
- [12] S. Schenkman, D. Eichinger, M. E. Pereira, V. Nussenzweig, *Annu. Rev. Microbiol.* **1994**, *48*, 499-523.
- [13] J. O. Previato, A. F. Andrade, P. M.C., M.-P. L., *Mol.Biochem.Parasitol.* **1985**, *16*, 85-96.
- [14] A. Moncayo, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2003**, *98*, 577-591.
- [15] R. Wehner, W. Gehring, *Zoologie*, 22 ed., Thieme Verlag, Stuttgart, **1990**.
- [16] A. Stich, *Biologie in unserer Zeit* **2002**, *32*, 294-302.
- [17] A. Buschiazzo, M. F. Amaya, M. L. Cremona, A. C. Frasch, P. M. Alzari, *Mol Cell* **2002**, *10*, 757-768.
- [18] R. Agusti, G. Paris, L. Ratier, A. C. Frasch, R. M. de Lederkremer, *Glycobiology* **2004**, *14*, 659-670.
- [19] A. G. Watts, I. Damager, M. L. Amaya, A. Buschiazzo, P. Alzari, A. C. Frasch, S. G. Withers, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 7532-7533.
- [20] A. R. Todeschini, W. B. Dias, M. F. Girard, J. M. Wieruszkeski, L. Mendonca-Previato, J. O. Previato, *J.Biol.Chem* **2004**, *279*, 5323-5328.
- [21] P. M. Colman, B. J. Smith, *Structure* **2002**, *10*, 1466-1468.
- [22] M. F. Amaya, A. G. Watts, I. Damager, A. Wehenkel, T. Nguyen, A. Buschiazzo, G. Paris, A. C. Frasch, S. G. Withers, P. M. Alzari, *Structure (Camb)* **2004**, *12*, 775-784.
- [23] G. Watts Andrew, G. Withers Stephen, *Can. J. Chem.* **2004**, *82*, 1581-1588.
- [24] H. Streicher, *Curr Med Chem-Anti Infect. Agents* **2004**, *3*, 149-161.
- [25] J. C. Wilson, M. von Itzstein, *Curr Drug Targets* **2003**, *4*, 389-408.
- [26] M. J. Kiefel, M. von Itzstein, *Prog Med Chem* **1999**, *36*, 1-28.
- [27] P. Meindl, G. Bodo, B. Palese, J. Schulman, H. Tuppy, *Virology* **1974**, *58*, 457-463.
- [28] J. N. Varghese, W. G. Laver, P. M. Colman, *Nature* **1983**, *303*, 41-44.
- [29] M. C. Mann, R. J. Thomson, M. Von Itzstein, *Bioorg Med Chem Lett* **2004**, *14*, 5555-5558.
- [30] P. Florio, R. J. Thomson, A. Alafaci, S. Abo, M. Von Itzstein, *Bioorg Med Chem Lett* **1999**, *9*, 2065-2068.
- [31] K. Ikeda, M. Sato, Y. Torisawa, *Curr. Med. Chem.-Anti-infective Agents* **2004**, *3*, 339-350.

- [32] M. Von Itzstein, W.-Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. dyason, B. Jin, T. V. Phan, M. L. Smythe, H. F. White, S. W. Oliver, P. M. Colman, J. N. Varghese, D. M. Ryan, J. M. Wood, R. C. Bethell, V. C. Hotham, J. M. Cameron, C. R. Penn, *Nature (London)* **1993**, 363, 418-423.
- [33] T. Masuda, S. Shibuya, M. Arai, S. Yoshida, T. Tomozawa, A. Ohno, M. Yamashita, T. Honda, *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, 13, 669-673.
- [34] M. J. Kiefel, M. von Itzstein, *Chem Rev* **2002**, 102, 471-490.
- [35] E. Garman, G. Laver, *Curr Drug Targets* **2004**, 5, 119-136.
- [36] T. Masuda, S. Yoshida, M. Arai, S. Kaneko, M. Yamashita, T. Honda, *Chem Pharm Bull* **2003**, 51, 1386-1398.
- [37] T. Honda, T. Masuda, S. Yoshida, M. Arai, S. Kaneko, M. Yamashia, *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, 12, 1925-1928.
- [38] P. W. Smith, J. E. Robinson, D. N. Evans, S. L. Sollis, P. D. Howes, N. Trivedi, R. C. Bethell, *Bioorg Med Chem Lett* **1999**, 9, 601-604.
- [39] J. L. McKimm-Breschkin, P. M. Colman, B. Jin, G. Y. Krippner, M. McDonald, P. A. Reece, S. P. Tucker, L. Waddington, K. G. Watson, W.-Y. Wu, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3226-3229.
- [40] A. Vasella, R. Wyler, *Helv Chim Acta* **1990**, 73, 1742-1763.
- [41] K. Wallimann, A. Vasella, *Helv Chim Acta* **1990**, 73, 1359-1372.
- [42] A. Vasella, R. Wyler, *Helv Chim Acta* **1991**, 74, 451-463.
- [43] H. Mack, R. Brossmer, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 191-194.
- [44] C. Kim, W. Lew, M. Williams, H. Liu, L. Zhang, S. Swaminathan, N. Bischofberger, M. Chen, D. Mendel, C. Tai, W. Laver, R. Stevens, *J Am Chem Soc* **1997**, 119, 681-690.
- [45] C. Kim, W. Lew, M. Williams, H. Wu, L. Zhang, X. Chen, P. Escarpe, D. Mendel, W. Laver, R. Stevens, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 2451-2460.
- [46] H. Streicher, J. Meisch, C. Bohner, *Tetrahedron* **2001**, 57, 8851-8859.
- [47] H. Streicher, C. Bohner, *Tetrahedron* **2002**, 58, 7573-7581.
- [48] H. Streicher, *Monatsh. Chem.-Chemical-Monthly* **2002**, 133, 1263-1278.
- [49] H. Streicher, *Bioorg Med Chem Lett* **2004**, 14, 361-364.
- [50] H. Streicher, H. Busse, *Bioorg Med Chem* **2006**, 14, 1047-1057.
- [51] L. Gil, Y. Han, E. Opas, G. Rodan, R. Ruel, J. Seedor, P. Tyler, R. Young, *Bioorg Med Chem* **1999**, 7, 901-919.
- [52] G. W. J. Fleet, T. K. M. Shing, S. Warr, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1984**, 905-908.
- [53] D. B. Berkowitz, D. Bhuniya, G. Peris, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 1869-1872.
- [54] J.-P. Gourves, H. Couthon, G. Sturtz, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3489-3493.
- [55] L. Kovacs, E. Osz, V. Domokos, W. Holzer, Z. Györgydeak, *Tetrahedron* **2001**, 57, 4609-4621.
- [56] P. Boullanger, V. Maunier, D. Lafont, *Carbohydr. Res.* **2000**, 324, 97-106.
- [57] J. W. Wilt, M. D. Tufano, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 2601-2603.
- [58] G. A. Garcia, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 4841-4844.
- [59] I. Aumüller, *Dissertation*, Universität Kiel, **2002**.
- [60] P. Savignanc, G. Lavielle, *Bull. Soc. Chim. Fr* **1974**, 1506-1508.
- [61] W. P. Malachowski, J. K. Coward, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 7616-7624.
- [62] V. S. Borodkin, M. A. J. Ferguson, A. V. Nikolaev, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 5305-5308.
- [63] G. Hum, K. Wooler, J. Lee, S. D. Taylor, *Can. J. Chem.* **2000**, 78, 642-655.
- [64] K. Ohashi, S. Kosai, M. Arizuka, T. Watanabe, Y. Yamagiwa, T. Kamikawa, M. Kates, *Tetrahedron* **1989**, 45, 2557-2570.

- [65] C. A. A. Van Boeckel, J. J. Oltvoort, J. H. Van Boom, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 3751-3761.
- [66] D. A. Campbell, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6331-6335.
- [67] D. A. Campbell, J. C. Bermak, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 658-660.
- [68] I. B. Parr, B. A. Horenstein, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7489-7494.
- [69] A. Terjung, *Dissertation*, Universität Konstanz, **1993**.
- [70] T. Eisele, *Dissertation*, Universität Konstanz, **1996**.
- [71] R. Albert, K. Dax, R. W. Link, A. E. Stütz, *Carbohydr. Res.* **1983**, *118*, C5-C6.
- [72] R. Latrell, G. Lohaus, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 901-920.
- [73] Pacak, Cerny, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1963**, 541-542.
- [74] R. J. Herr, *Technical Reports* **1999**, *3*, 1-36.
- [75] D. H. Valentine, J. H. Hillhouse, *Synthesis* **2002**, *3*, 317-334.
- [76] V. S. Borodkin, M. A. J. Ferguson, A. V. Nikolaev, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7821-7825.
- [77] M. P. Groziak, A. Koohang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 940-944.
- [78] A. M. Felix, E. P. Heimer, T. J. Lambros, C. Tzougraki, J. Meienhofer, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4194-4196.
- [79] J. S. Bajwa, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2299-2302.
- [80] S. Hanessian, T. J. Liak, B. Vanesse, *Synthesis* **1981**, *5*, 396-397.
- [81] G. Brieger, T. J. Nestricks, *Chem Rev* **1974**, *74*, 567-580.
- [82] A. G. M. Barrett, J. C. Beall, D. C. Braddock, K. Flack, V. C. Gibson, M. M. Salter, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6508-6514.
- [83] F. Stolz, *Dissertation*, Universität Konstanz, **2004**.
- [84] S. J. Danishefsky, M. P. DeNinno, S. Chen, *J Am Chem Soc* **1988**, *110*, 3929-3940.
- [85] P. I. Kitov, D. R. Bundle, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **2001**, 838-853.
- [86] L. Collie, J. E. Denness, D. Parker, F. O'Carroll, C. Tachon, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2: Physical Organic Chemistry (1972-1999)* **1993**, 1747-1758.
- [87] R. Miethchen, V. Fehring, *Synthesis* **1998**, 94-98.
- [88] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed., Wiley Verlag, New York, **1999**.
- [89] E. Zbiral, H. H. Brandstetter, R. Christian, R. Schauer, *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 781-786.
- [90] S. Vorwerk, A. Vasella, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *110*, 1765-1766.
- [91] P. Bulman Page, M. McKenzie, J. Gallagher, *Synth. Comm.* **2002**, *32*, 211-218.
- [92] M. Brackhagen, H. Boye, C. Vogel, *J. Carbohydr. Chem.* **2001**, *20*, 31-43.
- [93] K. Kohata, S. A. Abbas, K. L. Matta, *Carbohydr. Res.* **1984**, *132*, 127-135.
- [94] E. G. Gros, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 3647-3654.
- [95] R. I. Duclos, *Chem. Phys. Lipids* **2001**, *111*, 111-138.
- [96] D. A. Nicholson, W. A. Cilley, O. T. Quimby, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 3149-3150.
- [97] M. Barczai-Martos, F. Körösy, *Nature* **1950**, *165*, 369.
- [98] K.-H. Jung, M. Hoch, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 1099-1106.
- [99] H.-P. Wessel, T. Iversen, D. R. Bundle, *Carbohydr. Res.* **1984**, *130*, 5-21.
- [100] P. M. Booth, H. B. Broughton, M. J. Ford, C. M. J. Fox, S. V. Ley, A. M. Z. Slawin, D. J. Williams, P. R. Woodward, *Tetrahedron* **1989**, *45*, 7565-7580.
- [101] C. Gennari, F. Molinari, U. Piarulli, M. Bartoletti, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 7289-7300.
- [102] J. T. Bamberg, T. Gabriel, N. E. Krauss, T. Mirzadegan, W. S. Palmer, D. B. Smith, (Roche Palo Alto, LLC, USA). Application: US

US, **2004**, pp. 141 pp, Cont -in-part of U S Ser No 308,963.

[103] C. J. Moody, D. J. Miller, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 2257-2268.

8. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

H. Busse and H. Streicher: "*Synthesis of pseudo-sialosides containing a GS 4071 resembling moiety*", Poster presentation at the 12th European Carbohydrate Symposium, Grenoble, FR, **2003**

H. Busse: "*Sialidase inhibitors based on carbocyclic Sialylmimetics*", Oral presentation at the Carbohydrate Workshop, Borstel, DE, **2004**

H. Busse and H. Streicher: "*Towards new antimicrobials based on carbocyclic Sialylmimetics*", Poster presentation at the XXII International Carbohydrate Symposium, Glasgow, UK, **2004**

H. Busse; H. Streicher; S. Schrader; R. Schauer: "*Novel Sialylmimetics and their action of microbial Sialidases*", Poster presentation at the Sialobiology **2004**, St. Andrews, UK, **2004**

H. Busse and H. Streicher: "*Pseudo-Sialosides Containing Carbocyclic Sialylmimetics*", Poster presentation at the Eurocarb XIII, Bratislava, SK, **2005**

H. Busse and H. Streicher: "*Towards Bisubstrate-Type Inhibitors of Trans-Sialidases*", Poster presentation at the Glyco XVIII, Florence, IT, **2005**

Streicher, H., Busse, H., *Building a successful structural motif into sialylmimetics–cyclohexenephosphonate monoesters as pseudo-sialosides with promising inhibitory properties*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14, 4, **2006**, 1047-1057