

**Darstellung und chemoenzymatische  
Umsetzung modifizierter Substrate  
zur Synthese von Ligandbausteinen  
für Myelin assoziiertes Glycoprotein**

**DISSERTATION**

Zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Lars Kröger**

aus Hamburg

Hamburg 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Thiem
  2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Francke
  3. Gutachter: Prof. Dr. T. Peters
  4. Gutachter: Prof. Dr. V. Wittmann
- Tag der Disputation: 06.02.2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 1998 bis April 2003 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. J. Thiem am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt. Zwischenzeitlich fanden Forschungsaufenthalte von September bis Oktober 2000 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. V. Křen am Institut für Mikrobiologie der Tschechischen Akademie der Wissenschaften, Prag, Tschechische Republik und von Oktober 2001 bis Januar 2002 in der Gruppe von Herrn Dr. R. H. Furneaux, Industrial Research Ltd., Lower Hutt, Neuseeland statt.

Herrn Prof. Dr. Joachim Thiem möchte ich für die freundliche Aufnahme in seinem Arbeitskreis, die großzügige Unterstützung sowie die interessante Themenstellung und den gewährten wissenschaftlichen Freiraum bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Bei Herrn Dr. Richard H. Furneaux, Herrn Dr. Andrew Falshaw und Herrn Prof. Dr. Vladimir Křen möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitsgruppen und die Einblicke in das Leben und wissenschaftliche Arbeiten in Neuseeland und in der Tschechischen Republik bedanken.



Meinen Eltern  
und  
meiner Schwester



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1. Glycoproteine	2
1.2. Glycolipide	5
1.3. Aufbau des Nervensystems	6
1.4. Myelin assoziiertes Glycoprotein	8
<b>2. ENZYMATISCHE OLIGOSACCHARIDSYNTHESE</b>	<b>11</b>
2.1. Glycosyltransferasen	11
2.1.1. Leloir Glycosyltransferasen	11
2.1.2. Non-Leloir Glycosyltransferasen	13
2.2. Glycosidasen	13
2.2.1. Klassifizierung	13
2.2.2. Mechanismus	15
2.2.3. Glycosidasen in der organischen Synthese	17
<b>3. ZIELSETZUNG</b>	<b>21</b>
<b>4. SYNTHESE MODIFIZIERTER GALNAC-AKZEPTOREN</b>	<b>23</b>
4.1. GalNAc-Akzeptoren mit unterschiedlichen Aglycon-Strukturen	24
4.1.1. Einfache <i>O</i> -Glycoside	24
4.1.2. Thioglycoside	31
4.1.3. <i>C</i> -Glycoside	32
4.1.4. 1,5-Anhydroglycitole	34
4.2. Akzeptoren ohne Acetamido-Funktion	35
4.2.1. 2-Desoxyglycoside	35
4.2.2. Galactoside	38
4.2.3. Modifikationen an Position 1 und 2	39
4.3. Modifikationen an Position 4 des GalNAc-Referenz-Akzeptors	40
4.4. Darstellung von FucNAc-Derivaten als Akzeptoren	45
<b>5. CHEMOENZYMATISCHE GALACTOSYLIERUNGEN</b>	<b>51</b>
5.1. Chemoenzymatische Galactosylierung von GalNAc-Akzeptoren mit unterschiedlichen Aglycon-Strukturen	55
5.2. Enzymatische Umsetzungen mit Akzeptoren ohne Acetamido-Funktion	62
5.3. Einfluss der Modifikationen an Position 4 auf die Enzymerkennung	68
5.4. FucNAc-Derivate als Akzeptoren bei Galactosylierungen	73

<b>6. MODIFIZIERTE DONOREN FÜR ENZYMATISCHE GALACTOSYLIERUNGEN</b>	<b>75</b>
6.1. Darstellung der modifizierten Donoren	76
6.2. Chemoenzymatische Galactosylierungen mit modifizierten Donoren	78
<b>7. GLYCOSYLDONOREN MIT NEUEN ABGANGSGRUPPEN</b>	<b>82</b>
7.1. Disaccharide als Donoren für die Transglycosylierung	83
7.2. Aromatische Abgangsgruppen in Analogie zu <i>p</i> NP-Gal	84
7.2.1. Darstellung	84
7.2.2. Donoreigenschaften	91
<b>8. ENZYMATISCHE GALACTOSYLIERUNG VON INOSITOLEN</b>	<b>94</b>
<b>9. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>103</b>
<b>10. EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>110</b>
10.1. Allgemeine Methoden	110
10.2. Enzymisolierung und Assays zur Enzymaktivität	112
10.3. Allgemeine Arbeitsvorschriften	114
10.4. Spezielle Synthesevorschriften	116
10.5. Gefahrenhinweise	228
<b>11. LITERATUR</b>	<b>230</b>

## Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut, wasserfrei
Ac	Acetyl
AcCl	Acetylchlorid
$\alpha$ -Gal-F	$\alpha$ -D-Galactopyranosylfluorid
AIBN	$\alpha,\alpha'$ -Azobisisobutyronitril
All	Allyl
Ar	aromatisch, Aryl
Ara	L-Arabinose
ax	axial
Bn	Benzyl
BSA	Rinderserumalbumin
Bu	Butyl
Bz	Benzoyl
CAN	Ammoniumcer(IV)-nitrat
CSA	Campher-10-sulfonsäure
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCE	1,2-Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EE	Ethylacetat
eq	äquatorial, Äquivalent
Et	Ethyl
FAB	Fast-Atom-Bombardment
Gal	D-Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
Glc	D-Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin
Glc-1-P	$\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat
Fuc	D-Fucose
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Im	Imidazol
LacNAc	<i>N</i> -Acetylactosamin

MAG	Myelin assoziiertes Glycoprotein
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight
Man	D-Mannose
Me	Methyl
Ms	Mesyl, Methansulfonyl
MU	Methylumbelliferyl
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
<i>o</i> NP	<i>ortho</i> -Nitrophenyl
<i>o</i> NP-Gal	<i>ortho</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
PE	Petrolether (50-70)
Ph	Phenyl
Phth	Phthalimido
P <sub>i</sub>	Phosphat
Piv	Pivaloyl, Trimethylacetyl
<i>p</i> NP	<i>para</i> -Nitrophenyl
<i>p</i> NP-Ara	<i>para</i> -Nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinopyranosid
<i>p</i> NP-Fuc	<i>para</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-fucopyranosid
<i>p</i> NP-Gal	<i>para</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
<i>p</i> NP-Glc	<i>para</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoopyranosid
<i>p</i> NP-OH	<i>para</i> -Nitrophenol
PNS	peripheres Nervensystem
py	Pyridin
quant	quantitative
Res-Gal	Resorufinyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
RT	Raumtemperatur
SE	2-Trimethylsilylethyl
Smp.	Schmelzpunkt
T-Antigen	Thomsen-Friedenreich-Antigen
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBAT	Tetrabutylammonium(triphenylsilyl)difluorosilicat
TCDI	1,1'-Thiocarbonyldiimidazol
TCP	Tetrachlorophthalimido
Tf	Triflyl, Trifluormethansulfonyl
THF	Tetrahydrofuran
Tol	Toluol
Ts	Tosyl, <i>p</i> -Toluolsulfonyl
U	Units
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

Mit etwa zwei Drittel des in der Biosphäre gebundenen Kohlenstoffs stellen die Kohlenhydrate neben Proteinen, Nucleinsäuren und Lipiden die mengenmäßig bedeutendste der vier großen Naturstoffklassen dar. Durch die Photosynthese werden jährlich  $2 \cdot 10^{11}$  t D-Glucose gebildet, wovon der Großteil in der Form von Mono-, Oligo- und Polysacchariden auf der Stufe der Kohlenhydrate verbleibt. Nur 5 % finden Verwendung in der Synthese anderer primärer und sekundärer Metaboliten.<sup>1</sup> Schon lange war bekannt, dass Kohlenhydrate nicht nur als metabolische Intermediate dienen, sondern auch als Energiespeicher in Form von Stärke in Pflanzen und Glycogen in Tieren, die schnell den Brennstoff Glucose freisetzen können. Des Weiteren sind Polysaccharide weit verbreitet als strukturelle Elemente in den Zellwänden von Bakterien und Pflanzen und im Exoskelett von Arthropoden. Cellulose, der Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwände, ist die am häufigsten auftretende organische Verbindung in der Biosphäre.<sup>2</sup>

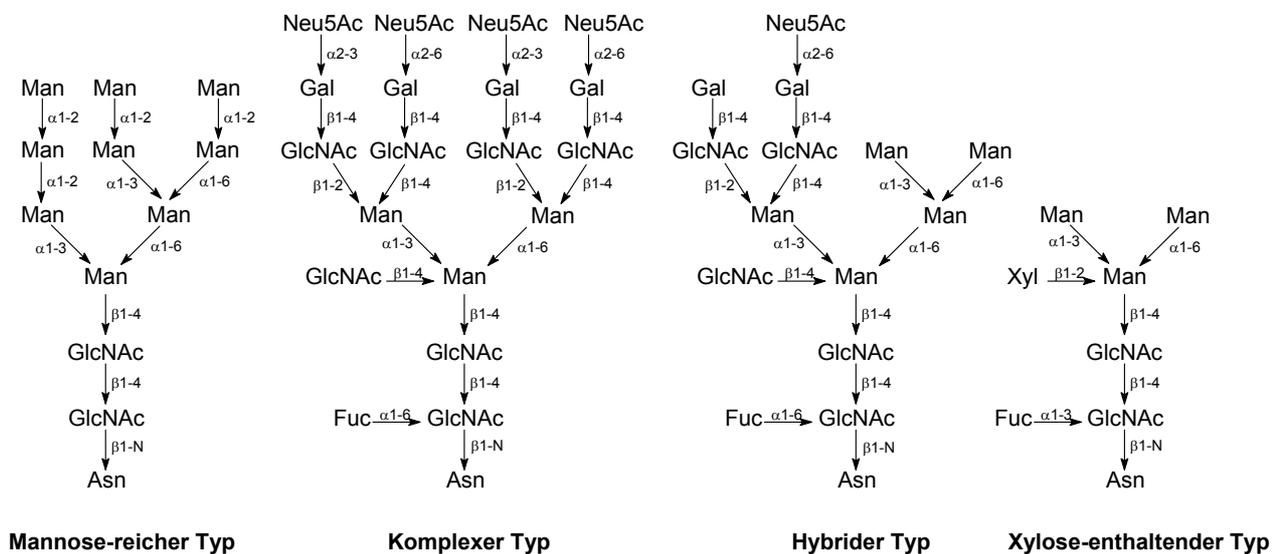
Als Watson und Crick 1953 die Struktur der DNA und den Mechanismus ihrer Replikation herleiteten, gewannen die Nucleinsäuren als Informationsspeicher des Lebens die herausragende Bedeutung. Kohlenhydrate dagegen wurden aus molekularbiologischer Sicht kaum beachtet, und ihre Erforschung erfolgte hauptsächlich durch die Nahrungsmittel- und Papierindustrie.<sup>3</sup> Erst die Entwicklung immer leistungsfähigerer chromatographischer und spektroskopischer Methoden einerseits und die Einführung moderner Verfahren zur Oligosaccharidanalytik und -synthese andererseits ermöglichten die Entdeckung und Untersuchung der Funktion komplexer Kohlenhydratstrukturen im Organismus, die häufig heterogen und nur in geringen Mengen auftreten. Es wurde erkannt, dass die meisten Proteine und Lipide<sup>4</sup> einen gewissen kovalent gebundenen Anteil an Kohlenhydraten mit sehr unterschiedlichen und komplexen Strukturen besitzen, wohingegen die Kohlenhydrate mit Energiespeicher- und Stützfunktion sehr einfach aufgebaut sind.

In den linear aufgebauten Peptiden und Nucleinsäuren kann die Information nur in der Anzahl und Sequenz der monomeren Bausteine enthalten sein, wohingegen in Kohlenhydraten zusätzlich die Position und Konfiguration der glycosidischen Bindung und das Auftreten von Verzweigungen zu einer extrem hohen Informationsdichte führt; es gibt  $10^{12}$  mögliche Oligosaccharid-Isomere für ein reduzierendes Hexasaccharid.<sup>5</sup> Modifikationen der Kohlenhydratbausteine durch Acetyl-, Sulfat- und Phosphatgruppen führen zu einer weiteren strukturellen Diversifikation. Glycoproteine und Glycolipide sind ein wesentlicher Bestandteil der Zellmembran, wobei der Kohlenhydratanteil immer zur extrazellulären Seite ausgerichtet ist und so als Glycocalix die Asymmetrie gewährleistet. Eukaryotische Zellen präsentieren auf ihrer Oberfläche, abhängig von Entwicklungsstadium, Zelltyp und ihrer Umgebung, eine Vielzahl von verzweigten Oligosacchariden, die wichtige Funktionen bei der Zell-Zell-Erkennung und -Wechselwirkung erfüllen.<sup>6</sup> Die Kohlenhydratlignanden dienen als Bindungsstellen für Rezeptoren von Bakterien, Viren, Toxinen, Antikörpern, Enzymen, Lectinen und Selectinen.<sup>7-10</sup>

## 1.1. Glycoproteine

Die Glycosylierung von Proteinen ermöglicht durch sich ausbildende Wasserstoffbrücken die Induktion und Stabilisierung der Proteinkonformation, beeinflusst die Löslichkeit der Proteine, verhindert durch Maskierung den proteolytischen Abbau des Proteins und die Erkennung durch Antikörper.<sup>11</sup> Glycoproteine sind Bestandteil der Zellmembran und kommen gelöst in den Körperflüssigkeiten wie Blut und Schleimsekreten vor. Man unterscheidet drei Arten von Glycoproteinen: *N*- und *O*-Glycoproteine und GPI-Anker. Der Aufbau der Kohlenhydratanteile erfolgt im rauen endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat.

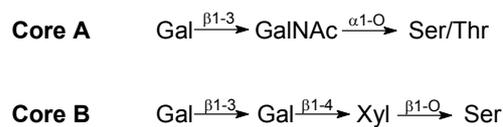
In *N*-Glycoproteinen ist der Kohlenhydratanteil in der Regel durch eine *N*-glycosidische Bindung über *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) mit der Amidseitengruppe von L-Asparagin (Asn) der Peptidkette verknüpft.<sup>12</sup> Vereinzelt erfolgt die Anbindung in Bakterien aber auch über einen anderen Kohlenhydratbaustein.<sup>13</sup> Es gibt vier Typen von *N*-Glycoproteinen, die einen gemeinsamen Pentasaccharid-Kern aus zwei *N*-Acetyl-D-glucosamin und drei D-Mannose (Man) Bausteinen von der Struktur  $\text{Man}\alpha 1-6[\text{Man}\alpha 1-3]\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$  („*Trimannosyl*“) besitzen. Innerhalb dieser Klassen gibt es eine erhebliche Mikroheterogenität bezüglich der Zusammensetzung der Oligosaccharidstrukturen (Abb. 1). Im Gegensatz zur post-translationalen Synthese der *O*-Glycoproteine ist die *N*-verknüpfende Glycosylierung co-translational, sie erfolgt also während der Proteinsynthese.<sup>14</sup>



**Abb. 1** Struktur der Kohlenhydratanteile von *N*-Glycoproteinen

Die *O*-Glycosylierung, komplexer und weniger erforscht als die *N*-Glycosylierung, erfolgt zwischen der Kohlenhydratseitenkette und einer Hydroxylaminosäure, in den meisten Fällen L-Serin (Ser) oder L-Threonin (Thr). Am häufigsten wird *N*-Acetyl-D-galactosamin (GalNAc)  $\alpha$ -*O*-glycosidisch (Core A) oder D-Xylose  $\beta$ -*O*-glycosidisch (Core B) gebunden. Die Core A und

B Strukturen enthalten weiterhin noch eine  $\beta$ -glycosidisch verknüpfte D-Galactose (Gal) bzw. ein Galactosedimer (Abb. 2), die ihrerseits in der Regel durch weitere Bausteine substituiert werden. O-Glycoproteine mit Core A Struktur sind in Mucinen weit verbreitet<sup>15</sup> und werden deshalb auch als Mucin-Typ klassifiziert. Es gibt acht verschiedene Unterstrukturen, die sich durch die Substitution des an Serin oder Threonin gebundenen N-Acetyl-D-galactosamin-Rests unterscheiden. Am weitesten verbreitet ist das so genannte Thomsen-Friedenreich-Antigen (T-Antigen)<sup>16</sup> von der Struktur Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-OSer/Thr.<sup>17</sup> Der Core B tritt in Proteoglycanen des Bindegewebes auf.<sup>18</sup> Es sind aber auch weitere Core-Strukturen bekannt, in denen andere Aminosäuren glycosyliert werden. In Kollagen tritt eine Bindung zwischen D-Galactose und 5-Hydroxy-L-lysin auf,<sup>19</sup> in den Zellwänden höherer Pflanzen zwischen L-Arabinose und 4-Hydroxy-L-prolin.<sup>20</sup> Des Weiteren wurden O-glycosidische Bindungen von D-Mannose, D-Glucose, N-Acetyl-D-glucosamin, D-Galactose und L-Fucose an L-Serin oder L-Threonin beobachtet.<sup>21-24</sup> O-Glycoproteine weisen eine sehr hohe Mikroheterogenität auf, die ihre Charakterisierung erschwert.<sup>25</sup>

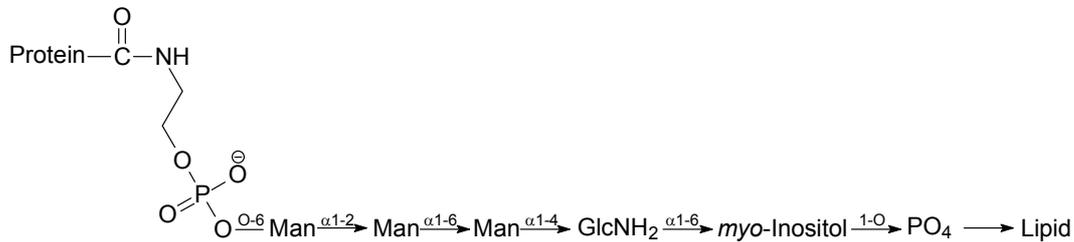


**Abb. 2** Core-Strukturen der O-Glycoproteine

Die post-translationale Biosynthese von O-Glycoproteinen findet im Golgi-Apparat statt, indem in einem ersten Schritt N-Acetyl-D-galactosamin an einen geeigneten Serin- oder Threonin-Rest des Proteins unter Bildung des so genannten T<sub>N</sub>-Epitops geknüpft wird. Die weiteren Kohlenhydratbausteine werden bei der Wanderung durch die Golgi-Kompartimente schrittweise durch Glycosyltransferasen eingefügt, ohne dass die Einwirkung von Glycosidasen erforderlich ist. Eine Regulierung erfolgt über Spezifität, Aktivität und Verfügbarkeit der Glycosyltransferasen, die häufig in Konkurrenz zueinander stehen, und das Vorhandensein der entsprechend benötigten Nucleosiddiphosphat-aktivierten Monosaccharid-Bausteine. Die Kohlenhydratreste in O-Glycoproteinen, die linear oder biantennär aufgebaut sind, können aus sehr wenigen Bausteinen oder auch recht langen Ketten bestehen, die vielfach L-Fucose oder Sialinsäuren am terminalen Ende aufweisen oder durch Sulfatierung und Acetylierung modifiziert wurden.<sup>26</sup> In vielen Glycoproteinen treten O- und N-Glycosylierung nebeneinander auf.<sup>27</sup>

Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker sind im Tierreich ubiquitär und werden aufgrund ihrer Struktur ebenfalls den Phospholipiden zugerechnet. Der zentrale Kohlenhydratbaustein ist ein Tetrasaccharid der Struktur Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-6Man $\alpha$ 1-4GlcN, wobei das D-Glucosamin in nicht-acetylierter Form vorliegt.<sup>28</sup> Das reduzierende Ende des Kohlenhydratkerns ist über eine myo-Inositolgruppe und einen Phosphatrest an ein Lipid gebunden, welches das Molekül in einer Membran verankert.<sup>29</sup> Das nichtreduzierende Ende ist über eine Phosphoethanolamin-Brücke mit

dem C-Terminus des Proteins verbunden (Abb. 3). Variationen erfolgen durch Einfügen weiterer Kohlenhydrate an die Kern-Mannosen sowie Kettenlänge und Sättigungsgrad der Fettsäuren des Lipidanteils.<sup>30</sup>



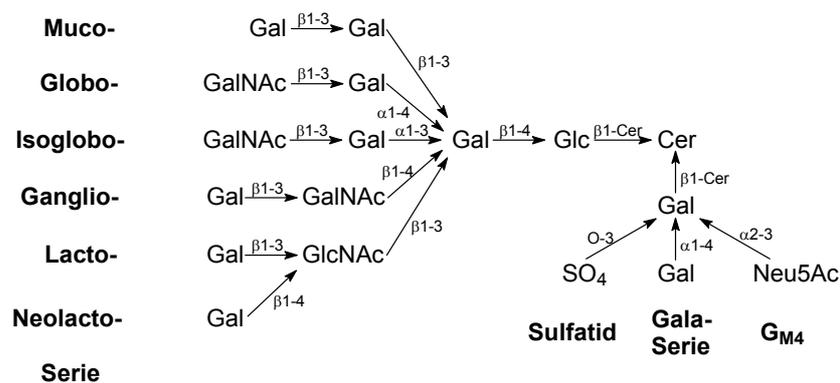
**Abb. 3** Schema eines GPI-Ankers

Wie bereits erwähnt, kann die Glycosylierung neben einer strukturellen, stabilisierenden oder schützenden Wirkung auf das Substrat auch Informationen zur biologischen Erkennung enthalten. Lectine sind sehr allgemein definiert als Kohlenhydrat-bindende Proteine, die weder Enzyme noch Antikörper sind.<sup>14</sup> Die Grundlage für zahlreiche essentielle und pathologische Prozesse wird durch eben diese Lectin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen geschaffen. Das T- und das T<sub>N</sub>-Antigen sind Vorstufen von komplexen Kohlenhydratketten auf gesunden, somatischen Zellen und sind derart maskiert durch *N*-Acetylneuraminsäure oder neutrale Oligosaccharide für das Immunsystem nicht zu erkennen. An der Oberfläche von Tumorzellen werden bedingt durch unvollständige Glycosylierung oder vorzeitige Sialylierung freie T- und T<sub>N</sub>-Antigenstrukturen und andere veränderte Kohlenhydratseitenketten beobachtet, die sich von normalen Zellen deutlich unterscheiden.<sup>31</sup> Über die biochemischen und molekularen Mechanismen hierfür gibt es nur wenige Erkenntnisse. Eine wesentliche Reduzierung der Aktivität der Core 3-Transferase scheint im Falle von Darmkrebs für die Zunahme der Tumor-assoziierten Antigene verantwortlich zu sein.<sup>32</sup> Diese Veränderungen werden häufig durch Verwendung von Lectinen als histochemische Probe, z. B. von einem Lectin aus Erdnüssen (Peanut Agglutinin, PNA) für das T-Antigen, erkannt.<sup>33</sup> Das T<sub>N</sub>-Antigen wird auf der Membran von menschlichen Epithel-Tumoren gefunden,<sup>34</sup> sein an Position 6 sialyliertes Derivat, das Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen wird bei Brust- und Prostatakrebs exprimiert.<sup>35</sup> In Brustgewebe ist das T-Antigen nachweislich Tumor-spezifisch.<sup>36</sup> Das an der Galactose  $\alpha 2-3$ -sialylierte Sialyl-T-Antigen wird auf Darm-<sup>37</sup> und Brustkrebszellen<sup>38</sup> und gemeinsam mit seinem am *N*-Acetyl-D-galactosamin  $\alpha 2-6$ -sialylierten Isomeren Sialyl-T-Antigen auf den Leukocyten von Leukämiepatienten gefunden.<sup>39,40</sup> Durch die Veränderung der Glycosylierung kann es auch zu einer Veränderung der Konformation des Peptides und der Bildung eines neuen Tumor-spezifischen Epitops kommen.<sup>41</sup> Die Prognose für Krebspatienten ist bei einer höheren Anzahl Tumor-assoziierten Antigene an der Oberfläche von Krebszellen in der Regel schlechter.<sup>42</sup> Eine Therapiemöglichkeit eröffnen Impfstoffe, die auf synthetischen Tumor-assoziierten Determinanten basieren und durch eine Aktivierung des Immunsystems eine Tumor-spezifische Immunantwort und eine Bekämpfung der Krebszellen bewirken können.<sup>43,44</sup> Besonders wirkungsvoll ist die Immunantwort gegen im Blut zirkulierende Krebszellen und sich

bildende Mikrometastasen, bevor sie zu groß werden.<sup>45,46</sup> Ein monoklonaler Antikörper konnte aus Mäusen gewonnen werden, denen ein T-Antigen-BSA-Konjugat ohne einen *O*-glycosidisch verknüpften Serin-/Threonin-Baustein injiziert wurde. Er bindet selektiv an Brustkrebsgewebe, indem er ausschließlich den Disaccharidanteil des T-Antigens erkennt, der Proteinanteil ist für diesen Antikörper ohne Bedeutung.<sup>47,48</sup> Weiterhin wird vermutet, dass das T-Antigen verantwortlich für die Adhäsion von Krebszellen und damit für die Bildung von Metastasen ist.<sup>34</sup> Dementsprechend könnten Mimetika des T-Antigens diese Adhäsion inhibieren und somit als anti-metastatische Krebsmedikamente Anwendung finden.<sup>49</sup>

## 1.2. Glycolipide

Als Glycolipide werden allgemein amphiphile Glycoconjugate bezeichnet, in denen ein Kohlenhydrat aus bis zu 30 Monosaccharid-Bausteinen an ein hydrophobes Lipid gebunden ist. Sie werden nach ihren Lipidresten in die Glycerol enthaltenden Glycoglycerolipide und in Glycosphingolipide, die Ceramid (Cer) enthalten, unterteilt. Bei Ceramid handelt es sich um ein langkettiges, ungesättigtes Amin, das Sphingosin, welches amidisch mit einer Fettsäure verknüpft ist. Die Glycosphingolipide werden nach ihrem Kohlenhydratrest in die nur ein Monosaccharid enthaltenden Cerebroside, die Sulfatide mit einem sulfatveresterten Monosaccharid und die sialylierten Ganglioside eingestuft. Ist an Ceramid  $\beta$ -glycosidisch eine D-Galactose gebunden, kann diese galactosyliert (Gala-Serie), sialyliert (Gangliosid  $G_{M4}$ ) oder sulfatiert (Sulfatid) vorkommen. Häufiger ist eine  $\beta$ -glycosidische Verknüpfung von Lactose mit Ceramid, wobei die weitere Glycosylierung der Lactose zur Klassifizierung in Muco-, Globo-, Isoglobo-, Ganglio-, Lacto- und Neolacto-Glycosphingolipid-Serien herangezogen werden kann (Abb. 4).<sup>50,51</sup>



**Abb. 4** Klassifizierung der Glycosphingolipid-Serien

Glycosphingolipide sind Bausteine der Plasmamembranen aller eukaryotischer Zellen und sind in intrazellulären Membranen von Zellorganellen mit sekretorischer und endocytotischer Funktion zu beobachten. Die Verankerung des Ceramidrestes in der Zellmembran ermöglicht dabei

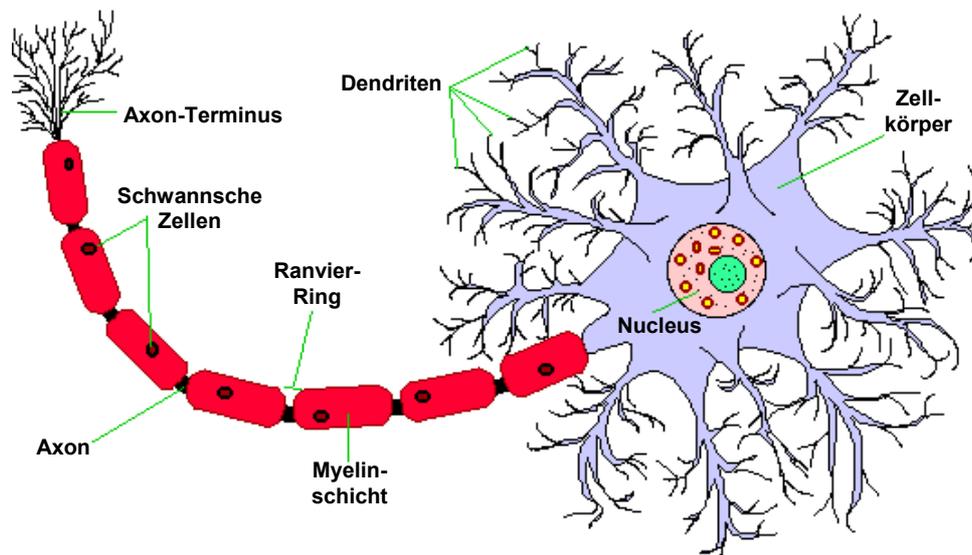
die Präsentation der hydrophilen Oligosaccharidkette in den extrazellulären Raum.<sup>52</sup> Dort kann der Kohlenhydratrest an essentiellen und pathologischen Prozessen, wie der Zell-Zell-Wechselwirkung, der Zelladhäsion und der Erkennung durch Toxine, Bakterien oder Viren beteiligt sein.<sup>53</sup> Ganglioside können an Tyrosin-Kinase-aktivierende Rezeptoren, z. B. für den Nervenwachstums-Faktor<sup>54</sup> oder Insulin,<sup>55</sup> binden und somit die entsprechenden Kinasen inhibieren und die Signalübertragung beeinflussen.<sup>56</sup> Besondere Beachtung verdient die Anreicherung und Bedeutung von Glycosphingolipiden im Nervengewebe, wo sie für biochemische, zellbiologische und Erkennungsprozesse verantwortlich sind.<sup>57</sup>

### **1.3. Aufbau des Nervensystems**

Reizaufnahme, Erregungsleitung und Reizverarbeitung sind allgemeine Eigenschaften der lebenden Substanz. Sie ermöglichen es, sich in der Umwelt zu orientieren und auf sie einzuwirken. Gehirn und im Rückenmark bilden das zentrale Nervensystem (ZNS), von dem ausgehend zahlreiche Nerven als peripheres Nervensystem (PNS) den Körper durchziehen. Die Leitungsbahnen des PNS unterteilt man in sensorische (zuleitende) und motorische (ableitende) Bahnen. Steuern die beteiligten Nerven die Skelettmuskulatur, dann spricht man vom willkürlichen somatischen Nervensystem, werden die inneren Organe gesteuert, dann handelt es sich um das unwillkürliche autonome (vegetative) Nervensystem.<sup>58</sup> Die Neuronen besitzen die gleiche Grundstruktur mit zentralem Zellkörper (Soma mit Zellkern) und werden ebenso von Genen gesteuert wie alle Körperzellen. Dennoch gibt es Unterschiede: Nach Abschluss der Gehirnwachstumsphase können sie sich nicht mehr teilen, sie haben besondere Zellfortsätze und eine Zellmembran, die elektrische Signale erzeugt und mit Hilfe von Botenstoffen und Rezeptoren Signale empfangen kann. Man unterscheidet Fortsätze, die Informationen von anderen Nervenzellen empfangen (Dendriten) von solchen, die Informationen weiterleiten (Neuriten oder Axons). Während ein Neuron über zahlreiche kurze und verästelte Dendriten verfügen kann, existiert nur jeweils ein Neurit, welcher allerdings am Ende vielfach verzweigt sein kann und Synapsen mit anderen Neuronen oder Muskelzellen bildet.<sup>59</sup> Die Erregungsübertragung erfolgt diskontinuierlich mit Hilfe von Neurotransmittern, die durch den Erregungsimpuls aus den Endungen des präsynaptischen Neurits freigesetzt werden, über Vesikel transportiert werden und die Permeabilität der postsynaptischen Membran für Natrium-Ionen für kurze Zeit um den Faktor 500 erhöhen.

Die Gliazellen des Nervengewebes erfüllen Stütz-, Ernährungs- und immunologische Schutzfunktionen für die Neuronen.<sup>60</sup> Nervenzellen stehen untereinander lediglich über Synapsen in Kontakt, im Übrigen werden sie voneinander wie auch von den Blutgefäßen und der Nervenflüssigkeit räumlich und elektrisch isoliert. Im ZNS erfolgt dies durch die Oligodendrocyten. Bei den peripheren Nerven wird jeder Neurit schlauchartig von den Schwannschen Zellen umhüllt.<sup>61</sup> Bei einigen Nervenfasern wickeln sich die Oligodendrocyten oder die Schwannschen

Zellen zwiebelartig mehrfach um die Neuriten und bilden eine schützende Myelinummantelung, die Markscheide.<sup>62</sup> Markhaltige Nervenfasern haben eine dicke Myelinschicht, die eine hohe Leitungsgeschwindigkeit ermöglicht, die marklosen Nervenfasern haben dagegen eine dünne Myelinschicht und damit eine geringe Leitungsgeschwindigkeit. Betrachtet man einen bemerkten Nerv von der Längsseite, so lassen sich in regelmäßigen Abständen Unterbrechungen der Markscheiden finden, die so genannten Ranvier-Ringe (Abb. 5).<sup>63</sup> Sie entsprechen jeweils dem Übergang zwischen zwei Schwannschen Zellen. Nur hier ist Stoffdiffusion durch Natrium-Kanäle möglich und tritt das elektrische Nervensignal mit der umgebenden Interzellulärsubstanz in Kontakt. Das Signal breitet sich in Sprüngen saltatorisch von Schnürring zu Schnürring aus<sup>64</sup> und erreicht so die hohen Geschwindigkeiten bei einem kleinen Querschnitt.<sup>65</sup> Ein Verlust des Myelins bewirkt eine starke Abnahme der Geschwindigkeit und damit einen dramatischen Einbruch der Funktionen des Nervensystems, zu beobachten bei den demyelinierenden Neuropathien Multiple Sklerose und Guillain-Barré-Syndrom.<sup>66</sup>



**Abb. 5** Schematischer Aufbau eines Neurons

Galactosylcerebrosid und dessen 3-*O*-Sulfat (Sulfatid) sind verantwortlich für die Entstehung, strukturierte Anordnung<sup>67</sup> und Erhaltung<sup>68</sup> der Myelinschicht. Auch wenn Ganglioside in allen Geweben von Wirbeltieren anzutreffen sind, ist ihre Anreicherung im Nervensystem sehr deutlich, in dem sie 25 % der Glycoconjugate ausmachen. Ganglioside können die Nervenzellen auf zwei Arten beeinflussen: mittels *cis*-Regulierung von Proteinen in derselben Membran durch laterale Assoziation und mittels *trans*-Erkennung von komplementären Lectinen – z. B. Myelin assoziiertes Glycoprotein (MAG) – auf benachbarten Zellen.<sup>53</sup>

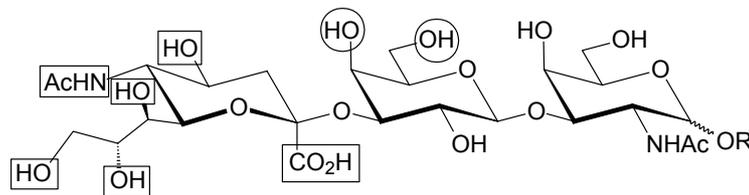
## 1.4. Myelin assoziiertes Glycoprotein

Die mehr als 40 verschiedenen natürlichen Sialinsäuren können an unterschiedliche Kohlenhydratreste gebunden sein. Häufig ist das nicht-reduzierende Ende von Oligosacchariden durch eine dieser Sialinsäuren maskiert, die somit einen erheblichen Anteil an der strukturellen Heterogenität von Glycoconjugaten haben und sich als Liganden für Erkennungsprozesse anbieten.<sup>69</sup> Es ist lange bekannt, dass Pathogene wie Bakterien oder der Influenza-Virus Sialinsäuren an der Zelloberfläche erkennen und selektiv an sie binden,<sup>70</sup> aber erst Anfang der 90er Jahre wurde auch die Bedeutung für die Zell-Zell-Kommunikation erkannt.<sup>71</sup> Mit den Siglecs<sup>72</sup> (Sialinsäurebindende Immunoglobulin-ähnliche Lectine) wurde eine neue Klasse von Rezeptoren entdeckt, die im Gegensatz zu den Selectinen an sehr unterschiedlichen biologischen Prozessen des hämopoietischen, des Immun- und des Nervensystems beteiligt sind. Die vier Gründungsmitglieder Sialoadhäsine<sup>71</sup> (Makrophagen), CD22<sup>73</sup> (B-Zellen), CD33<sup>74</sup> (Monocyten) und MAG<sup>75</sup> (Oligodendrocyten und Schwannsche Zellen) besitzen in der extrazellulären Region eine Sequenzgemeinschaft von ca. 30 %. In den letzten Jahren konnten beim Menschen noch sieben weitere Siglecs gefunden werden, die untereinander sehr ähnlich sind und mit CD33 50-80 % der Aminosäuresequenz gemein haben. Sie werden als CD33-verwandte Siglecs bezeichnet und bilden eine funktionale und evolutionäre Untergruppe. Durch Genomanalyse der Siglecs in Vertebraten und der Abwesenheit entsprechender Sequenzen in einfachen Wirbellosen ist davon auszugehen, dass die Siglecs durch Mutation eines I-Typ Lectins<sup>76</sup> erst relativ spät in der Evolution ihre Spezifität für Sialinsäuren erhielten.<sup>77</sup> Um selektiv ihre biologischen Funktionen erfüllen zu können, erkennen die einzelnen Siglecs nicht nur spezifische Sialinsäuren, sondern auch spezifische Bindungen an die subterminalen Kohlenhydrateinheiten. Siglecs können dabei sowohl an *cis*- als auch *trans*-Interaktionen beteiligt sein. Eine zusätzliche Möglichkeit der Regulierung ist die Bindung eines *cis*-Liganden auf derselben Zelle, die das Siglec maskiert und so eine Zell-Zell-Wechselwirkung verhindern kann.<sup>78</sup>

Seit dem ersten Fund von MAG wurde ihm eine Schlüsselfunktion bei der Bildung der Myelinschicht zugeordnet.<sup>79</sup> Unterstützt wurde diese Vermutung durch *in vitro* Untersuchungen: einerseits hat die Infektion von Schwannschen Zellen mit einem MAG-cDNA-enthaltenden Retrovirus die vorzeitige MAG-Expression und Bildung der Myelinschicht zur Folge,<sup>80</sup> andererseits wird durch MAG-antisense RNA die Expression von MAG und die Myelinierung verhindert.<sup>81</sup> Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen weisen  $MAG^{(-/-)}$ -Knockout-Mäuse mit einer null Mutation von MAG zunächst die Bildung einer normalen Myelinschicht auf; ein anderes Molekül (NCAM) übernimmt anscheinend die Funktion von MAG.<sup>82</sup> Im fortgeschrittenen Alter kommt es aber zu einer Demyelinierung und Degeneration des Axons, was die Bedeutung von MAG für den langfristigen Erhalt der Myelinschicht und die Stabilisierung des Neurons verdeutlicht.<sup>83</sup> Identische Symptome sind bei  $GalNAcT^{(-/-)}$ -Knockout-Mäusen zu beobachten, denen eine N-Acetylgalactosaminyl-Transferase zur Synthese höherer Ganglioside fehlt.<sup>84</sup> Dies legt die

Vermutung nahe, dass höhere Ganglioside die endogenen Liganden von MAG sind und bei der Myelinierung eine entscheidende Rolle spielen.

*In vitro* bindet MAG vorzugsweise an Glycoconjugate, die das Motiv Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc (( $\alpha$ 2-3)-Sialyl-T-Antigen-Determinante) enthalten,<sup>85,86</sup> wie die in der Membran von Nervenzellen vorkommenden Ganglioside G<sub>Q1b $\alpha$</sub> , G<sub>D1a</sub> und G<sub>T1b</sub>.<sup>87</sup> Modifikationen an der *N*-Acetylneuraminsäure werden nicht toleriert:<sup>88</sup> Desoxygenierung oder Modifizierung einer der Hydroxygruppen oder der *N*-Acetylgruppe verhindern ebenso die Erkennung durch MAG wie das Entfernen der Carbonsäure-Funktionalität.<sup>89</sup> Die Positionen 4 und 6 der subterminalen D-Galactose üben bei der Bindung eine leichte sterische Hinderung aus,<sup>90</sup> so dass ihre Substitution durch D-Glucose oder D-Fucose eine höhere Affinität zur Folge haben sollte. Systematische Untersuchungen zur Bedeutung der einzelnen Funktionalitäten in der *N*-Acetyl-D-galactosamin-Einheit wurden bisher nicht durchgeführt.

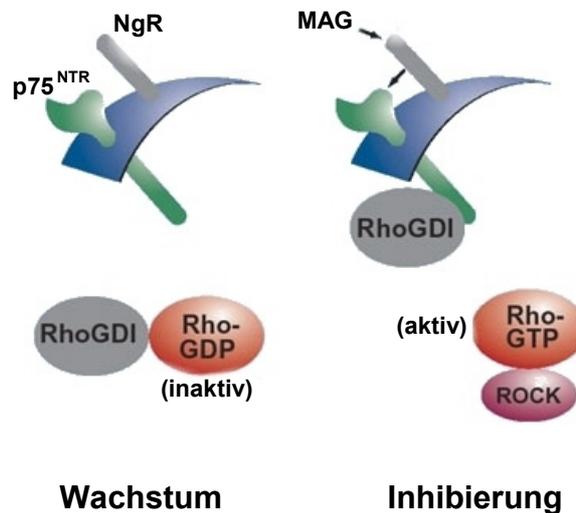


**Abb. 6** ( $\alpha$ 2-3)-Sialyl-T-Antigen-Determinante. Funktionelle Gruppen, die für die Erkennung durch MAG von Bedeutung sind, wurden durch einen Kasten hervorgehoben, leicht störende sind eingekreist. Die Bedeutung der anderen Funktionalitäten ist bisher nicht untersucht worden

Auf das Wachstum von Neuriten hat MAG einen bifunktionalen Effekt, indem es ihr Wachstum im neonatalen Zustand fördert, bei erwachsenen Neuronen allerdings als signifikanter Inhibitor wirkt.<sup>91</sup> Dies hat zur Folge, dass im erwachsenen Nervensystem keine ungewollten Verzweigungen entstehen, es bei einer Verletzung des ZNS aber zu keiner Reparatur kommen kann. Bei einer Verletzung des PNS dagegen kommt es zur Waller'schen Degeneration, bei der das Myelin kontrolliert abgebaut wird und die Schwannschen Zellen sich in einen nicht-myelinierenden Phänotyp umwandeln. Erst jetzt ist ein Wachstum der Nervenzellen möglich und die Verletzung kann repariert werden.<sup>92</sup> Der Funktionswechsel von MAG bei der Entwicklung des Nervensystems geht einher mit einer Änderung der Gangliosidzusammensetzung: während G<sub>D3</sub>, dem das Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc-Motiv fehlt, im neonatalen Zustand vorherrscht, übernimmt mit Beginn der Myelinierung G<sub>D1a</sub> die Hauptrolle.<sup>93</sup> Die inhibitorischen Eigenschaften monoklonaler Antikörper gegen G<sub>D1a</sub><sup>94</sup> und G<sub>T1b</sub><sup>95</sup> beim Neuritenwachstums zeigen, dass diese höheren Ganglioside die endogenen Liganden von MAG sind und somit für dessen Wirkung verantwortlich sind. Da MAG das Wachstum von Neuronen, denen der p75 Neurotrophin Rezeptor (p75<sup>NTR</sup>) fehlt, nicht blockiert, scheint dieser ebenfalls an der Wechselwirkung beteiligt zu sein, wenn er auch kein Bindungspartner von MAG ist.<sup>96</sup> Allerdings assoziieren in der Membran G<sub>T1b</sub> und p75<sup>NTR</sup> durch *cis*-Interaktion, so dass MAG indirekt auch an p75<sup>NTR</sup> bindet. Als weiterer Bindungspartner wurde kürzlich der Nogo-Rezeptor (NgR) ins Spiel gebracht, an den

MAG in einer Sialinsäure-unabhängigen Wechselwirkung bindet.<sup>97</sup> Somit ergibt sich die Inhibition des Neuronenwachstums aus dem komplexen Wechselspiel von vier Bindungspartnern.

In Abwesenheit von MAG bindet der Rho-Guanin-Dissoziations-Inhibitor (Rho-GDI) an Rho, ein kleines GDP-/GTP-bindendes Protein, und verhindert so die Bildung von aktiviertem Rho-GTP. Das Wachstum von Nervenzellen wird nicht beeinträchtigt (Abb. 7, linke Seite). Bei Anwesenheit von MAG, das sowohl an  $G_{T1b}$  als auch an NgR bindet, entstehen durch diese Vernetzung in der Membran funktionale Flöße aus  $G_{T1b}$ ,  $p75^{NTR}$  und NgR. Durch extrazelluläre *cis*-Wechselwirkung kann  $p75^{NTR}$  von NgR aktiviert werden und bindet in dieser Form an Rho-GDI. Das damit freie Rho wird aktiviert, bindet als Rho-GTP an das Signalprotein Rho-Kinase (ROCK) und inhibiert damit das Wachstum und die Regeneration von Nervenzellen (Abb. 7, rechte Seite).<sup>98</sup>



**Abb. 7** Mechanismus der Inhibition von Nervenwachstum<sup>98</sup>

## 2. Enzymatische Oligosaccharidsynthese

In den letzten Jahren gab es erhebliche Fortschritte auf den Gebieten der Biochemie und Molekularbiologie. Eine Vielzahl an Rezeptoren, beteiligt an den unterschiedlichsten biologischen Vorgängen, konnten identifiziert werden; zur Bestimmung ihrer Funktionen ist es aber erforderlich, ihre natürlichen Liganden zu ermitteln. Für die *in vitro* Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen ist es nötig, die entsprechenden potentiellen Liganden zu synthetisieren oder zu isolieren, wobei besonders im Hinblick auf mögliche pharmazeutische Anwendungen ein großes Interesse an der Synthese auch modifizierter Liganden besteht. Es stehen etablierte automatisierte Methoden für die Synthese und Sequenzierung von Polypeptiden und Oligonucleotiden zur Verfügung. Bei einer Glycosylierung jedoch enthalten sowohl Donor als auch Akzeptor mehrere ähnliche Funktionalitäten, die in Konkurrenz zueinander stehen. Für eine gezielte Synthese ist die Verwendung einer ausgefeilten Schutzgruppenchemie unabdingbar, die die Differenzierung und selektive Schützung der einzelnen funktionalen Gruppen ermöglicht, aber auch einen Einfluss auf die Reaktivität der Reaktionspartner hat.<sup>99</sup> Das Produkt muss anschließend selektiv entschützt werden, um bei weiteren Reaktionen wieder zur Verfügung zu stehen. Zusätzlich ist nicht nur die Regioselektivität einer Glycosylierung, sondern auch die Stereospezifität, also die Bildung einer  $\alpha$ - oder  $\beta$ -glycosidischen Bindung, zu kontrollieren. Eine sehr interessante Möglichkeit zur Lösung dieser Probleme eröffnet uns die Natur: Enzyme werden als effiziente Biokatalysatoren zur Synthese auch hochkomplexer Glycoconjugate verwendet und ihr Einsatz in der organischen Synthese gewinnt immer mehr an Bedeutung.<sup>100-103</sup> Enzyme ermöglichen nicht nur regio- und stereospezifische Reaktionen in nur einem Schritt unter Verzicht aufwendiger Schutzgruppenmanipulationen, die milden Reaktionsbedingungen eignen sich auch für die Darstellung empfindlicher Strukturen. Außerdem kann die Verwendung von bedenklichen Katalysatoren und Lösungsmitteln der klassischen Glycosylierungsmethoden vermieden werden. Für die enzymatische Oligosaccharidsynthese finden die Glycosyltransferasen des Leloir- und des Non-Leloir-Weges sowie die Glycosidasen und Transglycosidasen Anwendung.<sup>104</sup>

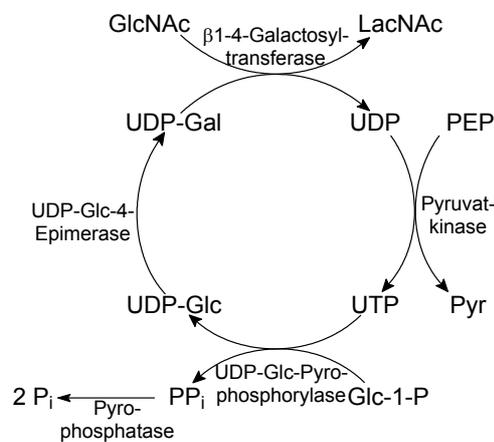
### 2.1. Glycosyltransferasen

#### 2.1.1. Leloir Glycosyltransferasen

Die Glycosyltransferasen des Leloir-Weges sind *in vivo* zuständig für die Synthese der meisten Glycoconjugate und verwenden hierzu Monosaccharid-Donoren, die als Glycosylester von Nucleosidmono- oder Nucleosiddiphosphaten aktiviert sind.<sup>105</sup> Bei Säugetieren handelt es sich hierbei um UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-GalNAc, GDP-Man, GDP-Fuc, UDP-GlcUA und CMP-Neu5Ac; alle anderen Monosaccharide werden durch Modifikation eines dieser genannten Bausteine nach dessen Einbau erhalten. Glycosyltransferasen sind hochspezifisch

im Hinblick auf die Stereochemie der gebildeten Bindung und die Regioselektivität der Verknüpfung. Sie sind *in vivo* substratspezifisch bezüglich Donor und Akzeptor und erlauben so die Synthese definierter Informationsträger ohne Templat – ein Prinzip, das auch als Ein-Enzym/Eine-Bindung bekannt ist.<sup>106</sup> In einigen Fällen akzeptieren sie aber *in vitro* eine Variation des Donors oder Akzeptors und ermöglichen somit auch die Synthese nicht-physiologischer Kohlenhydratstrukturen: Die Galactosylierung verschiedener Acylgruppenderivate des natürlichen Akzeptors *N*-Acetyl-D-glucosamin wird durch  $\beta$ 1-4-Galactosyltransferase katalysiert,<sup>107</sup>  $\alpha$ 1-2-L-Galactosyltransferase aus *Helix pomatia* toleriert neben GDP-L-Gal auch GDP-L-Fuc als Donor<sup>108</sup> und D-Glucose kann durch  $\beta$ 1-4-Galactosyltransferase auf Chitooligomere übertragen werden.<sup>109</sup>

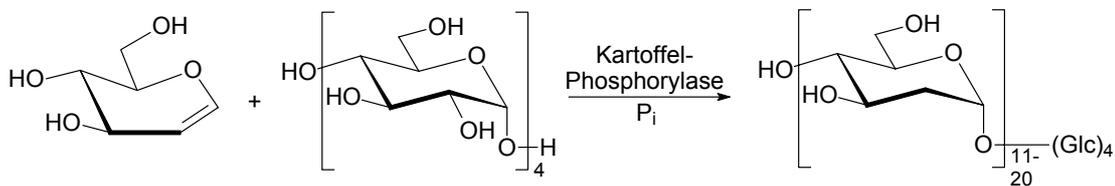
Wenn auch inzwischen viele Glycosyltransferase-katalysierte Reaktionen beschrieben wurden,<sup>110</sup> stehen einer praktikablen Anwendung in der präparativen organischen Chemie die hohen Kosten der Monosaccharid-Bausteine bzw. ihre recht aufwendige chemische oder enzymatische Synthese<sup>111</sup> und die Produktinhibierung durch die entstandenen Nucleosidmono- oder Nucleosiddiphosphate entgegen. Die Feedback-Inhibierung kann verhindert werden, da die entsprechenden Nucleosidphosphate durch den Zusatz von alkalischer Phosphatase hydrolysiert werden. Wesentlich eleganter ist die *in situ*-Regenerierung der Zuckernucleotide in einem Multienzymsystem unter Verwendung von Glycosyltransferase, Pyruvat-Kinase, Phosphorylase und Pyrophosphatase. Dies ermöglicht den Einsatz von katalytischen Mengen an Glycosylnucleotiddiphosphat und stöchiometrischen Mengen an Monosaccharid bzw. Monosaccharid-1-phosphat und trägt auf diese Weise erheblich zur Kostenreduktion bei. Die erste Anwendung fand diese Strategie bei der Darstellung von *N*-Acetyl-D-lactosamin (LacNAc) aus D-Glucose-1-phosphat (Glc-1-P) und *N*-Acetyl-D-glucosamin (Abb. 8).<sup>112</sup> Eine katalytische Menge UDP-Gal wird von  $\beta$ 1-4-Galactosyltransferase auf GlcNAc übertragen und anschließend durch eine Sequenz mehrerer Enzyme aus dem freigesetzten UDP und Glc-1P über UDP-Glc zurückgewonnen. Hierbei wird eine äquimolare Menge des Phosphorylierungsmittels Phosphoenolpyruvat (PEP) verbraucht.



**Abb. 8** Darstellung von *N*-Acetyl-D-lactosamin durch  $\beta$ 1-4-Galactosyltransferase<sup>112</sup>

### 2.1.2. Non-Leloir Glycosyltransferasen

Die Glycosyltransferasen des Non-Leloir-Weges setzen als Donoren Glycosylphosphate um. Glucan-Phosphorylasen z. B. katalysieren *in vivo* die Phosphorolyse von Polysacchariden und übertragen einen Glycosylrest auf anorganisches Phosphat. Die Reaktion ist reversibel und die Rückreaktion kann *in vitro* für die Synthese von Di- bis Polysacchariden verwendet werden. Bekannt sind unter anderem die Sucrose-Phosphorylase<sup>113</sup> und die Trehalose-Phosphorylase,<sup>114</sup> die aus Saccharose bzw. Trehalose Glucose-1-phosphat freisetzen und auch in der präparativen organischen Synthese Anwendung finden. Kartoffel-Phosphorylase katalysiert den Abbau von Maltooligosacchariden oder Stärke zu Glucose-1-phosphat, für die synthetische Verwendung wird aber ein Primer von mindestens vier Glucoseeinheiten benötigt, der auch nicht weiter abgebaut werden kann. Abgesehen vom natürlichen Substrat gelingt auch der Einsatz von D-Glucal als Donor zur Darstellung von 2-Desoxymaltooligosacchariden unter Verwendung katalytischer Mengen Phosphat.<sup>115</sup> Die Kettenlänge hängt dabei direkt von der Inkubationszeit ab und findet ein Maximum bei einem mittleren Polymerisationsgrad von 20 (Abb. 9). Sind dagegen stöchiometrische Mengen Phosphat vorhanden, wird nach Glycosylierung des Primers mit einer 2-Desoxyglucoseeinheit diese wieder phosphorolytisch abgespalten und 2-Desoxy- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat kann isoliert werden.<sup>116</sup>



**Abb. 9** Phosphorylase-katalysierte Synthese modifizierter Oligosaccharide<sup>115</sup>

## 2.2. Glycosidasen

### 2.2.1. Klassifizierung

Glycosidasen sind in der Natur ubiquitär und verantwortlich für die Spaltung von glycosidischen Bindungen. Die meisten Glycosidasen treten extrazellulär auf und sind am Katabolismus von Poly- und Oligosacchariden zu den entsprechenden monomeren Bausteinen oder der Abspaltung des Kohlenhydratrestes vom Aglycon eines Glycoconjugats beteiligt. Halbwertszeiten von mehreren Millionen Jahren werden für die unkatalysierte Hydrolyse von Polysacchariden wie Cellulose oder Glycogen bei Raumtemperatur und physiologischem pH-Wert gefunden, wohingegen Glycosidasen die Reaktion um den Faktor  $10^{17}$  beschleunigen und auf diese Weise Polysaccharide für den Stoffwechsel zugänglich machen können.<sup>117</sup> Sie übernehmen aber auch intrazellulär bei der Biosynthese von *N*-Glycoproteinen eine anabole Funktion.<sup>14</sup>

Man unterscheidet zwischen Exoglycosidasen einerseits, die den Kohlenhydratrest vom nicht-reduzierenden Ende des Polysaccharids aus stückweise abbauen, und Endoglycosidasen andererseits, die eine glycosidische Bindung innerhalb der Kohlenhydratkette spalten und so komplexe Strukturen freisetzen können. Bei Exoglycosidasen mit ihrer ausgeprägten Spezifität für das Kettenende eines Polysaccharids befindet sich das aktive Reaktionszentrum in einer Tasche, deren Tiefe und Form verantwortlich ist für die Anzahl der an der Erkennung beteiligten nicht-terminalen Einheiten.<sup>118</sup> Endoglycosidasen dagegen besitzen eine offene Furche, die das katalytische Zentrum enthält und die zufällige Bindung innerhalb der Kohlenhydratkette ermöglicht.<sup>119</sup>

Die Hydrolyse kann entweder unter Retention oder Inversion der anomeren Konfiguration erfolgen, abhängig von der Struktur des aktiven Zentrums und der Entfernung der katalytischen Reste voneinander. Daraus leitet sich eine Unterteilung nach der axialen (ax) oder äquatorialen (eq) Orientierung der Abgangsgruppe und der neuen Hydroxygruppe am anomeren Zentrum in vier Klassen ab: ax→ax, ax→eq, eq→ax, eq→eq.<sup>120</sup> Diese Klassifizierung berücksichtigt allerdings nur ein einziges Stereozentrum des terminalen Monosaccharids und macht keine Aussage über dessen Natur. Am weitesten verbreitet ist die Klassifizierung nach der Substratspezifität mit der Vergabe von EC-Nummern.<sup>121</sup> *O*-Glycosidasen wurde die Bezeichnung EC 3.2.1.x zugeordnet, wobei x für die Substratspezifität steht. Dies ermöglicht die Unterscheidung von z. B. β-Galactosidasen (EC 3.2.1.23) und β-Glucosidasen (EC 3.2.1.21), die β-D-Galactoside respektive β-D-Glucoside erkennen, ohne aber eine Aussage über den stereochemischen Ausgang der Reaktion zu machen. Da das freigesetzte reduzierende Monosaccharid unter physiologischen Bedingungen der Mutarotation unterliegt, ist dies bei der Hydrolyse nicht weiter von Bedeutung, sehr wohl aber bei der Betrachtung von Nebenreaktionen wie der Transglycosylierung. Die Kenntnis der Aminosäuresequenz eines Enzyms erlaubt es mit diesem System aber nicht, Aussagen über Einteilung, Substratspezifität oder Verwandtschaft zu anderen Enzymen zu treffen.

Erhebliches Potential würde eine Klassifizierung nach der räumlichen Struktur der aktiven Zentren besitzen, da diese verantwortlich ist für Substratspezifität und Reaktionsmechanismus und sich aus ihr alle anderen Klassifizierungsmerkmale ableiten lassen würden. 1991 führte Henrissat<sup>122</sup> eine erste Unterteilung für Glycosidasen und Transglycosidasen in damals 35 Familien anhand ihrer Aminosäuresequenzen ein. In den einzelnen Familien sind Struktur und Mechanismus konserviert, so dass Aussagen über die katalytischen Eigenschaften eines neuen Enzyms aufgrund seiner Aminosäuresequenz getroffen und die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse eines Proteins auf die anderen Mitglieder der Familie übertragen werden können.<sup>123,124</sup> Rückschlüsse auf die evolutionäre Divergenz zum Erwerb neuer Spezifitäten ergeben sich durch die Polyspezifität von fast einem Drittel der Familien, deren Mitglieder unterschiedliche Substrate erkennen.<sup>125</sup> Da die dreidimensionale Struktur während der Evolution stärker konserviert wurde als die Sequenz, zeigen einige Familien verwandte Strukturen, die zu Clans zusammengefasst werden,<sup>126</sup> deren größter der Glycosidase-Clan GH-A ist.<sup>127</sup> Innerhalb eines Clans bleibt nicht nur die Struktur erhalten, sondern auch die katalytischen Reste an äquivalenten sekundären

Strukturelementen, der katalytische Mechanismus (Retention oder Inversion) und die Stereochemie der Substrate (axial oder äquatorial).<sup>128</sup> In den letzten Jahren hat die Anzahl der Enzyme mit bekannter Aminosäuresequenz rasant zugenommen und die Entwicklung der relativ neuen Disziplin Bioinformatik wird ihre Zuordnung zu Familien noch beschleunigen. Zur Zeit sind 91 Familien und 14 Clans bekannt, die online zur Verfügung stehen und regelmäßig aktualisiert und erweitert werden.<sup>129</sup> Das Prinzip der sequenz- und strukturbasierenden Klassifizierung ist aber nicht nur auf Glycosidasen beschränkt, sondern wurde auch auf Glycosyltransferasen erweitert,<sup>130,131</sup> von denen es bereits 68 Familien gibt.<sup>129</sup> Besonders die enzymatische Oligosaccharidsynthese wird von dieser Entwicklung profitieren können, da stereo- und regioselektive Reaktionen von Mitgliedern einer Familie vorhergesagt werden können.

### 2.2.2. Mechanismus

Bereits 1894 führte Fischer mit dem Schlüssel-Schloss-Prinzip das erste Modell zur Erklärung von enzymatischen Reaktionen ein.<sup>132</sup> Wenn die Bindungsstellen des Enzyms mit dem Substrat geometrisch übereinstimmen, d.h. die entsprechende Kompatibilität besitzen, kann sich selektiv der Enzym-Substrat-Komplex bilden und die Reaktion erfolgen. Diese statische Sichtweise des Enzyms erklärt aber nicht, wieso Enzyme auch nicht-natürliche Substrate erkennen können, die nicht in die starre Bindungstasche passen sollten. Ogston erkannte, dass zur Unterscheidung von Enantiomeren bei enzymatischen Reaktionen das Substrat an mindestens drei Punkten Bindungen mit dem Enzym eingehen muss.<sup>133</sup> Diese Variante des Schlüssel-Schloss-Prinzips, als Drei-Punkt-Bindungs-Theorie bezeichnet, kann aber nur gültig sein, wenn das Substrat die Bindungstasche nur von einer Seite erreichen kann. Befindet sich das aktive Zentrum aber in einer Furche, kann eine Annäherung von beiden Seiten erfolgen; zur eindeutigen Diskriminierung von Enantiomeren ist hier noch eine vierte Bindungsstelle nötig.<sup>134</sup> Untersuchungen mit Iminozuckern als Glycosidase-Inhibitoren führten zur Entwicklung des kontrovers diskutierten Fleet-Modells, in dem zunächst der Ringsauerstoff protoniert wird und es unter Spaltung der endocyclischen Bindung zwischen diesem Ringsauerstoff und dem anomeren Kohlenstoffatom zur Ausbildung einer offenkettigen Spezies kommt (Abb. 10).<sup>135</sup>

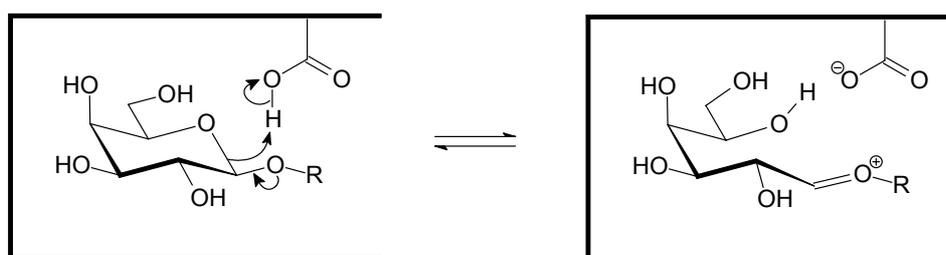
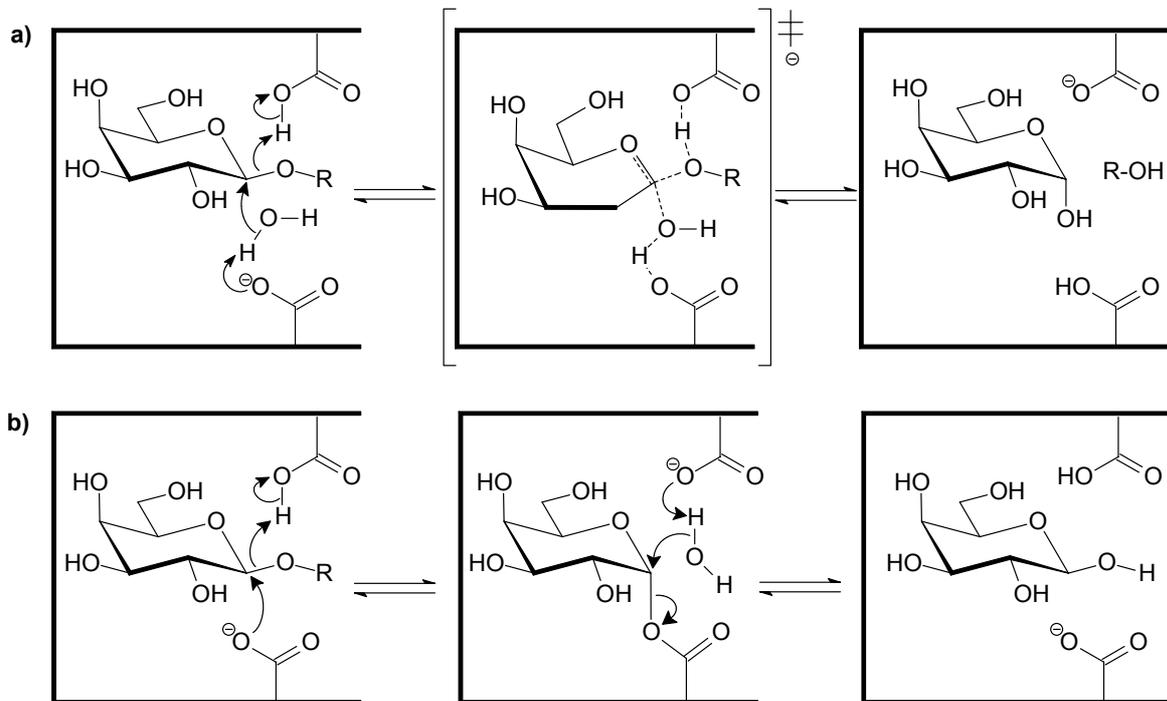


Abb. 10 Mechanismus der enzymatischen Glycosidhydrolyse nach Fleet<sup>135</sup>

Am weitesten akzeptiert dürfte heute die Induced-Fit-Theorie nach Koshland als Weiterentwicklung des Schlüssel-Schloss-Prinzips sein, die dem Enzym eine gewisse Flexibilität zugeht.<sup>136</sup> Unter dem Einfluss des Substrats kann das Enzym seine Konformation nach dem Hand-in-Handschuh-Konzept ändern, so dass die Substrattoleranz von Glycosidasen zu erklären ist. Sowohl invertierende als auch retendierende (konformationserhaltende) Glycosidasen haben als aktive Reste ein Paar aus einer protonierten und einer deprotonierten Carboxygruppe. Die Hydrolyse unter Inversion der anomeren Konfiguration erfolgt durch direkte Substitution der Abgangsgruppe über einen oxocarbeniumartigen Übergangszustand (Abb. 11a). Die beiden Carboxygruppen, von denen eine als Säure und die andere als Base wirken, sind dabei ca. 9.5 Å voneinander entfernt.<sup>137</sup> Aufgrund ihrer anders gelagerten Bedeutung beim zweistufigen Mechanismus retendierender Glycosidasen beträgt die Entfernung hier nur ca. 5.5 Å. Während eine Carboxygruppe den glycosidischen Sauerstoff protoniert und das Aglycon freisetzt, greift die andere das anomere Zentrum nucleophil an und stabilisiert den oxocarbeniumartigen Übergangszustand unter Inversion und Bildung einer echten kovalenten Bindung. Wasser diffundiert herein und greift im nächsten Schritt basenkatalysiert von der Rückseite an; unter erneuter Inversion und Regeneration der ursprünglichen Carboxygruppen wird ein reduzierender Zucker mit derselben anomeren Konfiguration wie das anfängliche Glycosid freigesetzt (Abb. 11b, die oxocarbeniumartigen Übergangszustände wurden nicht wiedergegeben).<sup>138,139</sup> Die erste Carboxygruppe fungiert somit als Säure-/Base-Katalysator, die zweite als Nucleophil/Nucleofug. Withers *et al.* konnten inzwischen zeigen, dass auch der Mechanismus des Hühnerei-Lysozims entgegen des weit akzeptierten Modells nach Philips nicht über ein langlebiges Oxocarbenium-Ion,<sup>140</sup> sondern über ein echtes Glycosyl-Enzym-Intermediat verläuft.<sup>141</sup>

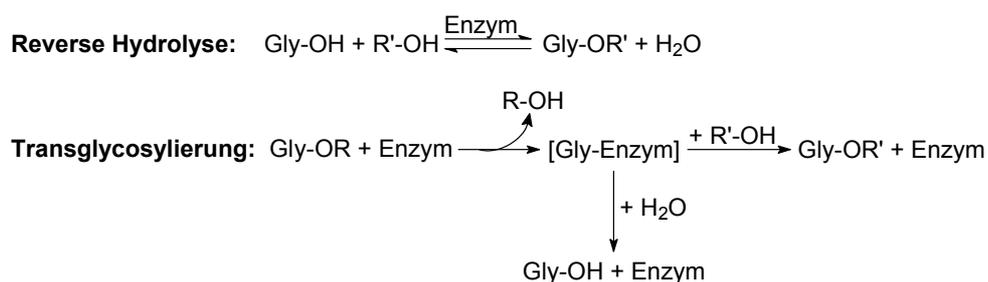


**Abb. 11** Mechanismus von **a)** invertierenden und **b)** retendierenden Glycosidasen<sup>139</sup>

Die umfangreichsten Untersuchungen zu retendierenden Glycosidasen wurden bisher über die  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli* durchgeführt. Es kommt zu direkten Wechselwirkungen zwischen allen Hydroxygruppen der Galactose und dem Enzym, wohingegen das Aglycon nur wenige spezifische Wechselwirkungen eingeht. Nach der ersten Erkennung durch das Enzym bewegt sich das Substrat 1-4 Å tiefer in die aktive Bindungstasche. In einer konzertierten Reaktion erfolgt die Protonierung des anomeren Sauerstoffs durch Glu461 und der nucleophile Angriff am anomeren Kohlenstoff durch Glu537 unter Ausbildung eines kovalenten Glycosyl-Enzym-Intermediats.<sup>142</sup> Die Neutralisierung der Ladung an Glu537 senkt den  $pK_a$ -Wert von Glu461 und ermöglicht ihm als Base bei der zweiten Substitution zu wirken.<sup>143</sup> Das Aglycon diffundiert aus der Bindungstasche heraus und wird durch ein Wassermolekül ersetzt. Über einen oxocarbeniumartigen Übergangszustand substituiert das Wassermolekül, von dem Glu461 ein Proton abstrahieren kann, die Abgangsgruppe Glu537 unter Inversion der Konfiguration des anomeren Zentrums und Wiederherstellung der ursprünglichen aktiven Bindungstasche.<sup>144</sup>

### 2.2.3. Glycosidasen in der organischen Synthese

Bei Untersuchungen in wässrigen Systemen liegt Wasser als Reaktionspartner bei der Hydrolyse in sehr hoher Konzentration vor und verschiebt das chemische Gleichgewicht weit auf die Seite der Hydrolyse. Bei hohen Konzentrationen an reduzierendem Zucker und Aglycon kann unter thermodynamischen Aspekten das Reaktionsgleichgewicht begrenzt in Richtung der Kondensationsprodukte verschoben werden, ein Verfahren, das als reverse Hydrolyse bezeichnet wird.<sup>145</sup> Organische Lösungsmittel können, wenn die Aktivität des Enzyms durch sie nicht negativ beeinflusst wird, diesen Effekt verstärken.<sup>146</sup> Da die Ausbeuten und die Regioselektivität in der Regel niedrig sind, eignet sich die reverse Hydrolyse nur bedingt zur Synthese von Oligosacchariden.



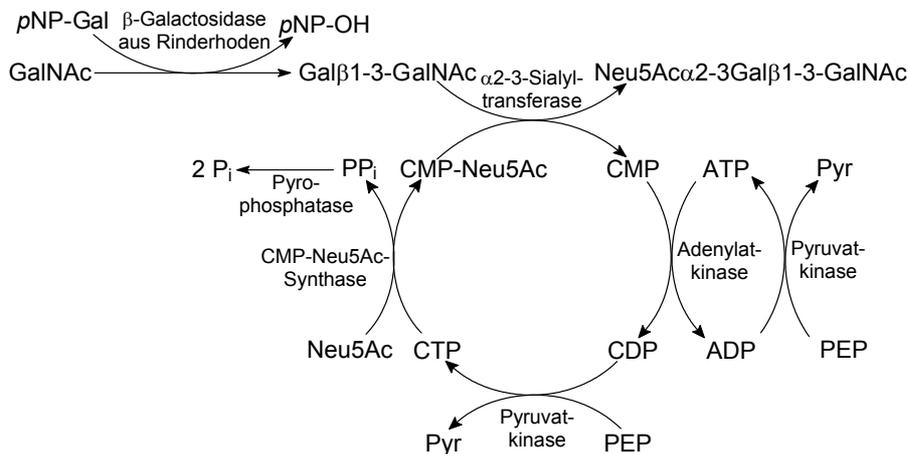
**Abb. 12** Prinzip der Glycosidsynthese mittels Hydrolasen

Bei konfigurationserhaltenden Glycosidasen ist es möglich, dass in einem kinetischen Ansatz ein anderer Akzeptor als Wasser mit dem intermediären Glycosyl-Enzym-Komplex reagiert und es zu einer Transglycosylierung kommt. Kann die Bindungsstelle einen Zuckerrest in einer geeigneten Orientierung als Aglycon binden, wird der Übergangszustand durch die spezifische Wechselwirkung des Akzeptorglycosids mit dem Enzym stabilisiert und die Aktivierungsenergie

gegenüber der Hydrolyse herabgesetzt.<sup>147</sup> Um die Transglycosylierung gegenüber der konkurrierenden Hydrolyse des Glycosyl-Enzym-Komplexes zu fördern, muss die Konzentration des Akzeptor-Zuckers höher sein als die Dissoziationskonstante der Akzeptor-Bindungsstelle. Die Verwendung aktivierter Donoren, die deutlich reaktiver sind als das gebildete Disaccharid, minimieren die Spaltung des Produkts. Häufige Anwendung finden die sehr reaktiven Nitrophenylglycoside<sup>148</sup> und Glycosylfluoride,<sup>149</sup> da ihr jeweiliges freigesetztes Aglycon ein schlechter Akzeptor ist und außerdem leicht bei der Aufarbeitung abgetrennt werden kann. Zwar werden auch preiswerte Disaccharide als Donoren eingesetzt,<sup>150</sup> sie weisen aber einen niedrigeren  $k_{\text{cat}}/K_M$ -Wert auf – sie sind also weniger reaktiv. Ferner kann das freigesetzte Aglycon als konkurrierender Akzeptor dienen und es entstehen schwer zu trennende Gemische aus Donor-Disaccharid, Produkt-Disaccharid und möglichen Regioisomeren dieser beiden, so dass Disaccharide selten die Donoren der Wahl sind.<sup>101</sup> In der Regel sind bei der Transglycosylierung höhere Ausbeuten als bei der reversen Hydrolyse zu erzielen, die Effizienz liegt aber immer noch deutlich unter der von Glycosyltransferasen katalysierten Glycosylierungen. Dem stehen stabilere und leichter zu handhabende Enzyme, geringere Kosten für Enzyme und Donoren, einfachere Reaktionsbedingungen und eine breitere Akzeptorspezifität der Glycosidasen gegenüber.

Da die Produkte der Transglycosylierung wieder gespalten werden können, kann die Glycosidsynthese zwar unter bestimmten Reaktionsbedingungen kinetisch begünstigt sein, die Hydrolyse bleibt aber immer thermodynamisch bevorzugt. Es ist sehr wichtig die Reaktion zu verfolgen und rechtzeitig, d.h. beim Produktmaximum, abubrechen. Optimierte Reaktionsbedingungen erlauben bei Verwendung geeigneter experimenteller „Tricks“, die nicht universell für alle Reaktionen einsetzbar sind, Ausbeuten von 20-50 %.<sup>145</sup> Häufig wird der Akzeptor im deutlichen Überschuss eingesetzt, um eine Selbstglycosylierung des Donors oder eine erneute Glycosylierung des erhaltenen Disaccharids zu verhindern. Zur Reduzierung der Wasseraktivität und damit der Hydrolyse kann der Einsatz mit Wasser mischbarer organischer Cosolventien sinnvoll sein, solange die Enzymaktivität nicht zu sehr beeinträchtigt wird.<sup>146</sup> Anwendung finden Acetonitril, *tert*-Butanol, Isopropylether, DMSO, DMF, Trimethyl- oder Triethylphosphat. Durch Gefriertrocknen einer Mischung aus  $\beta$ -Galactosidase und einem Lipid gelingt die Beschichtung des Peptids mit einer Lipidmonoschicht. In einem Zwei-Phasen-Gemisch aus Wasser, in dem der Kohlenhydrat-Donor und das Produkt gelöst sind, und einem organischen Lösungsmittel, in dem die lipidierte Glycosidase und ein hydrophober Akzeptor vorliegen, ist die Transglycosylierung dieses Akzeptors ohne konkurrierende Hydrolyse möglich.<sup>151</sup> Sehr außergewöhnlich ist die Transglycosylierung in Eis bei  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , die sowohl mit einer  $\beta$ -Galactosidase<sup>152</sup> als auch einer  $\alpha$ -Galactosidase<sup>153</sup> bessere Ausbeuten als unter physiologischen Bedingungen ergibt. Dies liegt an einer deutlich verlangsamten Hydrolyse bei dieser Temperatur, wohingegen die Transglycosylierung in einem geringeren Maße beeinflusst wird. Vermutlich erfolgt die Reaktion in mikroskopisch kleinen Wassertröpfchen im Eis, in denen die Substratkonzentration sehr hoch ist.

Bedingt durch die niedrigeren Ausbeuten bei Verwendung von Glycosidasen ist ein Multienzym-system, wie es für mehrere Glycosyltransferasen beschrieben wird, nicht sinnvoll. Allerdings gelang es, Glycosidasen und Transferasen unter Einbeziehung der Cofaktor-Regenerierung in einer sequentiellen Synthese von Trisacchariden ohne Isolierung und Reinigung von Zwischenprodukten aus den monomeren Bausteinen zu einer Eintopf-Synthese zusammenzufassen.<sup>154</sup> Diese Methode wurde auch für die Synthese des Sialyl-T-Antigens mit Erfolg angewandt (Abb. 13).<sup>155,156</sup> Transglycosylierung von *N*-Acetyl-D-galactosamin mit dem Donor *p*NP-Gal in Gegenwart der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden ergibt die T-Antigen-Determinante als Disaccharid-Intermediat, welches spezifisch von der  $\alpha$ 2-3-Sialyltransferase aus Schweineleber erkannt und zum Sialyl-T-Antigen umgesetzt wird. Das Trisaccharid ist im Gegensatz zum T-Antigen kein Substrat der  $\beta$ -Galactosidase und wird nicht von ihr hydrolysiert. Damit die Sialyltransferase nicht durch freigesetztes CMP inhibiert wird und um die Kosten für CMP-Neu5Ac zu senken, wird dieses *in situ* regeneriert.



**Abb. 13** Multienzymsystem zur Eintopf-Synthese des Sialyl-T-Antigens<sup>155</sup>

Die Substitution der nucleophilen Carboxygruppen im aktiven Zentrum einer retendierenden Glycosidase durch einen nicht-nucleophilen Rest (z. B. Alanin) erzeugt eine neue Gruppe von Kohlenhydrat-synthetisierenden Enzymen ohne hydrolytische Eigenschaften, die Glycosynthasen.<sup>157,158</sup> In diesen Mutanten bleibt die räumliche Struktur der Bindungstasche erhalten, das reaktive Glycosyl-Enzym-Intermediat kann aber nicht gebildet werden und das Produkt wird nicht abgebaut. Der aktivierte Donor mit kleiner Abgangsgruppe – meist Fluorid – und entgegengesetzter anomerer Konfiguration des Substrats vom Wildtyp-Enzym wird von der Glycosynthase als Analogon des Glycosyl-Enzym-Intermediats erkannt und entsprechend der zweiten Hälfte einer Transglycosylierung auf eine geeignete Akzeptor-Struktur übertragen. Das gebildete Produkt kann von der Glycosynthase, die das notwendige Nucleophil fehlt, nicht wieder gespalten werden und wird in exzellenten Ausbeuten isoliert.<sup>159,160</sup>

Die größte Herausforderung bei der chemoenzymatischen Glycosylierung ist die Steuerung der Regioselektivität, die am ehesten durch den systematischen Einsatz passender Glycosidasen aus unterschiedlichen Quellen erreicht werden kann.<sup>161-164</sup> Glycosidasen erkennen und hydrolysieren je nach Organismus und ihrer biologischen Bedeutung in ihm unterschiedliche Glycostrukturen, die nach dem Prinzip der mikroskopischen Reversibilität *in vitro* auch von ihnen synthetisierbar sind, aber nicht unbedingt die Hauptprodukte sein müssen.<sup>165</sup> *N*-Acetyl-D-galactosamin wird von den  $\beta$ -Galactosidasen aus *Escherichia coli*,<sup>166</sup> *Kluyveromyces lactis*,<sup>164</sup> *Penicillium multicolor* und *Aspergillus oryzae*<sup>165</sup> hauptsächlich an der primären Alkoholgruppe galactosyliert. Die Position 4 wird vorwiegend von  $\beta$ -Galactosidasen aus *Bacillus circulans*<sup>167</sup> und *Bifidobacterium bifidum*<sup>165</sup> erkannt, wohingegen Glycosylierungen in der 3-Position mit  $\beta$ -Galactosidasen aus *Streptococcus 6646K*,<sup>165</sup> Rinder-<sup>168</sup> oder Schweinehoden<sup>169</sup> möglich sind.

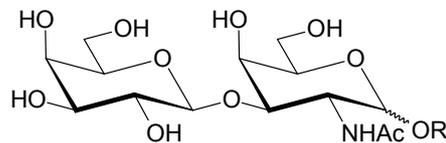
Ausschlaggebend für die Gesamtzusammensetzung bei einer Transglycosylierung sind die Verhältnisse von Synthese- zu Hydrolysegeschwindigkeit der einzelnen Regioisomeren. Aus diesem Grund sind Ausbeute und Regioselektivität einer enzymatischen Glycosylierung abhängig von Enzymkonzentration und Reaktionsdauer, aber auch der Zusatz organischer Lösungsmittel oder die Akzeptor-Struktur kann diese Verhältnisse vereinzelt beeinflussen. Usui *et al.* gelang die regioselektive Galactosylierung von *p*-Nitrophenyl-2-acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid mit  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* an Position 4 in Gegenwart einer hohen Konzentration an Acetonitril und in Position 6 bei einer niedrigen Konzentration.<sup>170</sup> Nilsson hat in Einzelfällen einen Einfluss der anomeren Struktur und Konfiguration des Akzeptors auf die Regioselektivität beobachtet. Die  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli* überträgt einen Galactoserest auf den Akzeptor Methyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid fast ausschließlich auf die primäre Alkoholgruppe, bei Verwendung des  $\beta$ -Anomeren dagegen überwiegend auf Position 3.<sup>171</sup> Der Akzeptor Trimethylsilylethyl-2-acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid wird von  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden vornehmlich in der 3-Position galactosyliert, das entsprechende Methylglycosid jedoch zu gleichen Teilen in Position 3 und 4.<sup>172</sup>

In Fällen, in denen die Transglycosylierung nicht regiospezifisch erfolgt und ein Gemisch aus mehreren Produkten entsteht, kann die sequentielle Verwendung verschiedener Hydrolasen mit z. T. überlappenden Spezifitäten die Aufarbeitung erleichtern.<sup>173</sup> Das erste Enzym synthetisiert das gewünschte Produkt, wohingegen das zweite Enzym unerwünschte Nebenprodukte hydrolysiert. Larsson *et al.* verwendeten diese Strategie zur Synthese der T-Antigen-Determinante Gal $\beta$ 1-3GalNAc mittels  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden.<sup>168</sup> Das ebenfalls gebildete 1-6-Regioisomer wird im Anschluss von  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli* hydrolysiert, ohne das gewünschte Produkt nennenswert zu zersetzen. Um die Hydrolyse zu fördern, wird die Reaktionslösung der vorhergehenden Transglycosylierung stark verdünnt und das hydrolysierende Enzym in sehr hoher Konzentration verwendet. Die Verwendung weiterer Enzympaare mit komplementären Spezifitäten erlaubt eine Ausweitung dieser Strategie auf andere Syntheseprobleme.

### 3. Zielsetzung

Die einleitenden Ausführungen haben die Bedeutung und weitreichende Verbreitung der Thomsen-Friedenreich-Antigen-Determinante Gal $\beta$ 1-3GalNAc aufgezeigt. Sie ist der zentrale Bestandteil der Core A Struktur von O-Glycoproteinen und im Organismus ubiquitär vertreten. Sie kommt aber nicht nur als Vorstufe komplexer Oligosaccharide vor, sondern auch unmaskiert an der Oberfläche von Tumorzellen, auf denen sie ein spezifisches Epitop bildet. Aus diesem Grunde besitzt sie in der medizinischen Krebsforschung Potential als Basis für einen Impfstoff oder als anti-metastatisches Krebsmedikament.

Ferner ist die T-Antigen-Determinante Bestandteil von Ganglio-Glycosphingolipiden und dient als Vorstufe des Trisaccharids Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc. Dieses kann am nichtreduzierenden Ende der Ganglioside G<sub>D1a</sub>, G<sub>T1b</sub>, G<sub>D1 $\alpha$</sub> , G<sub>T1 $\alpha\alpha$</sub>  und G<sub>Q1b $\alpha$</sub>  wiedergefunden werden, die spezifisch an Myelin assoziiertes Glycoprotein (MAG) binden. Inhibitoren für MAG verhindern dessen Wechselwirkung mit seinen natürlichen Bindungspartnern und sollten theoretisch die Inhibition des Nervenwachstums verhindern und in Zusammenarbeit mit entsprechenden Wachstumsfaktoren die Reparatur von verletztem Nervengewebe im ZNS ermöglichen. Bei der Bindung durch MAG werden Modifikationen an der N-Acetylneuraminsäure nicht toleriert. Ergebnisse über die Bedeutung der Funktionalitäten der D-Galactose- oder N-Acetyl-D-galactosamin-Einheit sind nicht bekannt und bedürfen der Untersuchung.



T-Antigen-Determinante

Ziel dieser Arbeit soll die chemoenzymatische Synthese von Glycosiden der T-Antigen-Determinante und verschiedener Derivate durch Glycosidasen sein, die in einer Kooperation als modifizierte Akzeptoren für die Darstellung von Derivaten des oben genannten Trisaccharids mit der Transsialidase aus *Trypanosoma cruzi* Anwendung finden werden. Hierzu werden im ersten Teil der Arbeit Derivate der N-Acetyl-D-galactosamin-Einheit hergestellt, die Modifikationen am anomeren Zentrum und in Position 2, 4 und 6 enthalten. Ein Schwerpunkt wird auf die Einführung von Desoxy-Gruppierungen gesetzt, um festzustellen, welche Hydroxygruppen für die Bindung durch die verwendeten Glycosidasen und später die Transsialidase und MAG notwendig sind.

Klassische Synthesen der T-Antigen-Determinante sind häufig als aufwendige, mehrstufige Reaktionen beschrieben worden; im Gegensatz dazu erfolgt die enzymatische Synthese in nur einer Stufe. Die Core-1- $\beta$ 1-3-Galactosyltransferase, verantwortlich für die Synthese *in vivo*, steht aber in präparativen Mengen nicht zur Verfügung und beim Einsatz von Galactosidasen waren die Ausbeuten bisher unbefriedigend. Unter Verwendung unterschiedlicher Glycosidasen soll die Reaktion optimiert werden und die Toleranz dieser Enzyme für modifizierte Akzeptoren und Donoren zur Synthese nicht-physiologischer Derivate untersucht werden. Mit dem Wissen über relevante Funktionalitäten in den Akzeptor- und den Donorstrukturen für die Erkennung durch die einzelnen Galactosidasen lässt sich für die enzymatische Glycosylierung ein breiteres Arbeitsfeld erschließen. In dieser Arbeit werden die  $\beta$ -Galactosidasen aus Rinderhoden, *Xanthomonas manihotis* und eine rekombinante  $\beta$ 1-3-Galactosidase aus *Bacillus circulans* Anwendung finden. Ferner steht eine Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* für die Untersuchungen zur Verfügung.

Unter dem Gesichtspunkt der Reaktionsoptimierung soll der Einfluss der Abgangsgruppe des Glycosyl-Donors – aliphatisch, aromatisch oder ein Kohlenhydrat – auf die Transglycosylierung untersucht werden. Sehr gut wasserlösliche Glycosyldonoren (z. B. Disaccharide) können in höheren Konzentrationen eingesetzt werden und damit die Bildung des Glycosyl-Enzym-Komplexes beschleunigen und seine Konzentration erhöhen. Alternativ würden aktivierte Glycosyldonoren mit neuen aromatischen Abgangsgruppen eine höhere Reaktivität aufweisen und versprechen die Hydrolyse des bereits gebildeten Produkts zu verringern.

Inositole, die weder Ringsauerstoff noch anomeres Zentrum besitzen, sind als nicht-physiologische Akzeptoren sehr interessant, da es keine Reaktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Hydroxygruppen gibt und die Regioselektivität der Glycosylierung allein von der relativen Anordnung der Hydroxygruppen zueinander abhängt. Bisher ist erst ein Beispiel einer enzymatischen Glycosylierung von Inositolen bekannt. Mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* konnten 1D-*chiro*-Inositol und sein 3-O-Methylether regiospezifisch galactosyliert werden.<sup>174</sup> Dies ist umso bedeutender, da nur eine sehr begrenzte Anzahl an Schutzgruppenstrategien für die Differenzierung und damit spezifische klassische Glycosylierung der einzelnen Hydroxygruppen zur Verfügung stehen. Den so erhältlichen Pseudo-Disacchariden werden unterschiedlichste physiologische Funktionen zugeschrieben, z. B. während Trocknung und Lagerung von Hülsenfrüchten oder der Typ 2 Diabetes im Menschen.

## 4. Synthese modifizierter GalNAc-Akzeptoren

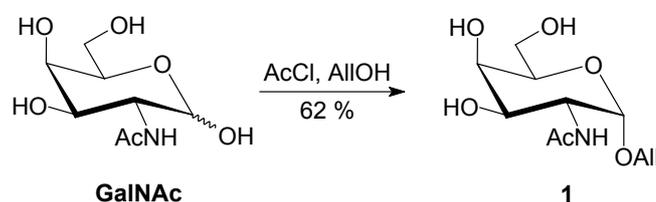
Spezifische Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und Proteinen werden häufig durch die Bildung mehrerer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxy- und Acetamidogruppen der Kohlenhydrate und den komplementären Funktionen in den Proteinen vermittelt.<sup>175</sup> Aus diesem Grund sind Desoxyzuckerderivate sehr wertvoll, um die Bedeutung spezifischer Hydroxygruppen bei diesen Wechselwirkungen zu ermitteln.<sup>176</sup> Die Knüpfung der glycosidischen Bindung der T-Antigen-Determinante soll durch unterschiedliche  $\beta$ -Galactosidasen erfolgen. Modifikationen an der *N*-Acetyl-D-galactosamin-Einheit werden deshalb vor der enzymatischen Glycosylierung eingeführt, so dass außerdem ihr Einfluss auf die Erkennung durch die Glycosidasen untersucht werden kann. Unterscheiden sich zwei Akzeptoren in mehreren Funktionalitäten, inklusive der Natur oder Orientierung des Aglycons, können sich die Effekte bei der Erkennung durch das Enzym teilweise kompensieren oder akkumulieren, so dass die Ergebnisse möglicherweise verfälscht werden. Um dies zu vermeiden und eine systematische Untersuchung zu gewährleisten, wurde Allyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**1**) als Referenz-Akzeptor gewählt und an diesem die Modifikationen einzeln durchgeführt. Mit dem Wissen über die Auswirkung der Änderung einer einzelnen Funktionalität können später auch Akzeptoren mit mehreren Modifikationen eingesetzt werden, ohne dass falsche Rückschlüsse gezogen werden.

Enzym-Präparationen der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden sind in der Regel mit einer  $\beta$ -Hexosaminidase verunreinigt, die  $\beta$ -glycosidische Bindungen von *N*-Acetyl-D-galactosamin (GalNAc) und *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) spaltet.<sup>177</sup> In dem hier verwendeten Rohextrakt konnte diese Aktivität ebenfalls nachgewiesen werden, so dass für die Untersuchung der Enzymspezifität Akzeptoren mit  $\alpha$ -Konfiguration Anwendung fanden. Als Aglycon sollte eine Gruppe verwendet werden, die bei Bedarf eine selektive und schonende Entschützung der anomeren Position zum reduzierenden Zucker ermöglicht. Als besonders geeignet haben sich bisher die Allyl-, Benzyl- und 2-(Trimethylsilyl)-ethylgruppen erwiesen.<sup>178,179</sup> Die Allylgruppe hebt sich von den anderen durch ihre geringe Größe zur Minimierung sterischer Hinderungen und der Möglichkeit zur direkten Derivatisierung ab. Ozonolyse und reduktive Aminierung ermöglichen die Kopplung mit spezifischen Markern<sup>180</sup> und die Kreuz-Metathese mit L-Allylglycin die Darstellung von neuen Glycosyl-Aminosäure-Bausteinen.<sup>181</sup> Ferner können Allylglycoside an multifunktionale Moleküle, z.B. Rinderserumalbumin (BSA)<sup>48</sup> oder synthetische Dendrimere<sup>182</sup> unter Bildung multivalenter Liganden gekoppelt werden.

## 4.1. GalNAc-Akzeptoren mit unterschiedlichen Aglycon-Strukturen

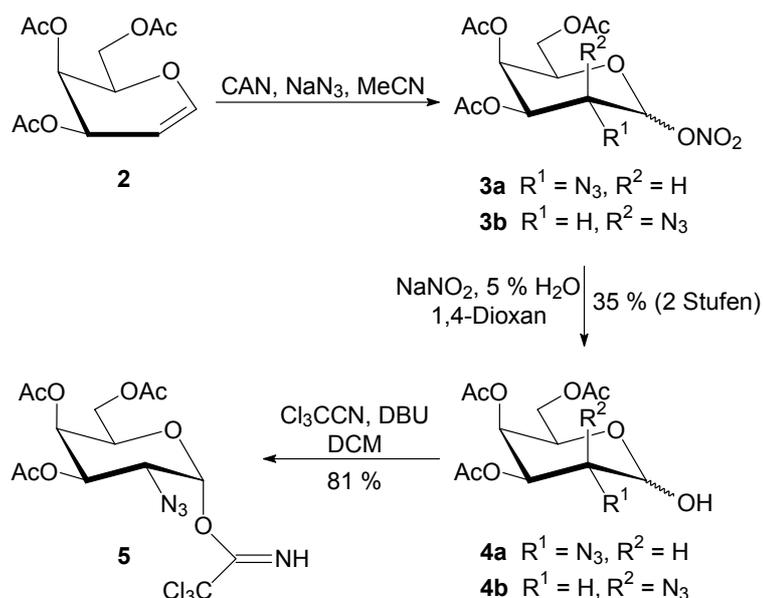
### 4.1.1. Einfache O-Glycoside

Für die Darstellung des Referenz-Akzeptors  $\alpha$ -Allyl-GalNAc **1** bietet sich die Fischer-Glycosylierung von *N*-Acetyl-D-galactosamin mit Allylalkohol an, die aufgrund des anomeren Effekts die Bildung des  $\alpha$ -Glycosids zur Folge hat. Lee *et al.* konnten in der Gegenwart von Bortrifluorid-Etherat nur 25 % an **1** isolieren,<sup>183</sup> durch Optimierung der Reaktionsbedingungen und Verwendung von Acetylchlorid als Katalysator gelang es die Ausbeute auf 62 % mehr als zu verdoppeln (Abb. 14). Bedingt durch den hohen Preis von GalNAc (25 g GalNAc kosten € 4110,- im Gegensatz zu € 51,60 für GlcNAc, Sigma, 2003) ist diese Methode für den präparativen Maßstab jedoch nicht sinnvoll, so dass nach einem günstigeren Ansatz gesucht werden sollte.



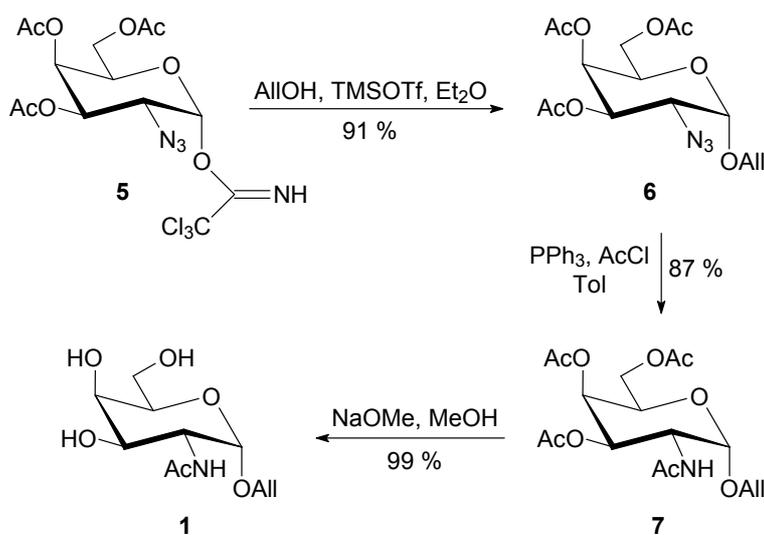
**Abb. 14** Fischer-Glycosylierung von GalNAc mit Allylalkohol

Die Azido-Funktion übt weder Nachbargruppeneffekt noch eine sterische Hinderung aus und findet seit ihrer Einführung in die Kohlenhydratchemie durch Paulsen als latente Amino-Schutzgruppe breite Anwendung bei der 1,2-*cis*-Verknüpfung einfacher und komplexer 2-Amino-2-desoxyglycoside.<sup>184</sup> Die gängigste Methode zur Darstellung von 2-Azido-2-desoxy-Derivaten wurde von Lemieux mit der Azidonitratisierung von Glycalen durch Addition von Cerammoniumnitrat (CAN) und Natriumazid eingeführt.<sup>185,186</sup> Während die Reaktion bei allen Glycalen regioselektiv verläuft, hängt die Stereochemie von den verwendeten Schutzgruppen und dem Glycal-Grundgerüst ab. Im Fall von Tri-*O*-acetyl-D-galactal (**2**), schnell und in guten Ausbeuten aus D-Galactose durch Acetylierung, Bromierung und reduktive Eliminierung zu erhalten,<sup>187</sup> entstand überwiegend das äquatoriale 2-Azido-Produkt **3a** (Abb. 15). Nach Synproportionierung des Glycosylnitrat-Gemisches **3a/3b** mit Natriumnitrit in wässrigem Dioxan<sup>188</sup> gelang die Trennung der beiden am anomeren Zentrum ungeschützten Epimere mit *galacto*- (**4a**) und *talo*-Konfiguration (**4b**). Als Donor für die eigentliche Glycosylierung sollte ein Trichloracetimidat verwendet werden, welches durch basenkatalysierte Addition an Trichloracetonitril erhalten werden kann. Bei Verwendung der schwachen Base Kaliumcarbonat erhielten Schmidt *et al.* kinetisch kontrolliert ein Produktgemisch der beiden anomeren Trichloracetimide ( $\alpha:\beta = 1:4$ ),<sup>188</sup> wohingegen es hier gelang mit der stärkeren Base DBU nur das thermodynamisch bevorzugte  $\alpha$ -Imidat **5** in guten Ausbeuten zu isolieren.



**Abb. 15** Darstellung des Trichloroacetimidat-Donors **5**

Die von Schmidt in ihrer heutigen Form eingeführte Trichloroacetimidat-Methode hat aufgrund der hohen Reaktivität der Glycosyldonoren und ihrer nahezu universellen Anwendbarkeit große Bedeutung erlangt.<sup>189</sup> In unpolaren Lösungsmitteln und bei niedrigen Temperaturen wird ein  $\text{S}_{\text{N}}2$ -ähnlichen Mechanismus postuliert, so dass Produkte mit umgekehrter anomerer Konfiguration des Imidats erhalten werden. Allerdings verlief die Glycosylierung von **5** in Diethylether bei sehr tiefen Temperaturen ( $-50\text{ }^\circ\text{C}$ ) unter Retention der Konfiguration, indem vermutlich unter Beteiligung des Lösungsmittels eine zweifache Substitution mit doppelter Inversion stattfand. Dies konnte durch die Kopplungskonstante  $J_{1,2} = 3.6\text{ Hz}$  für das Glycosylierungsprodukt **6** eindeutig belegt werden.

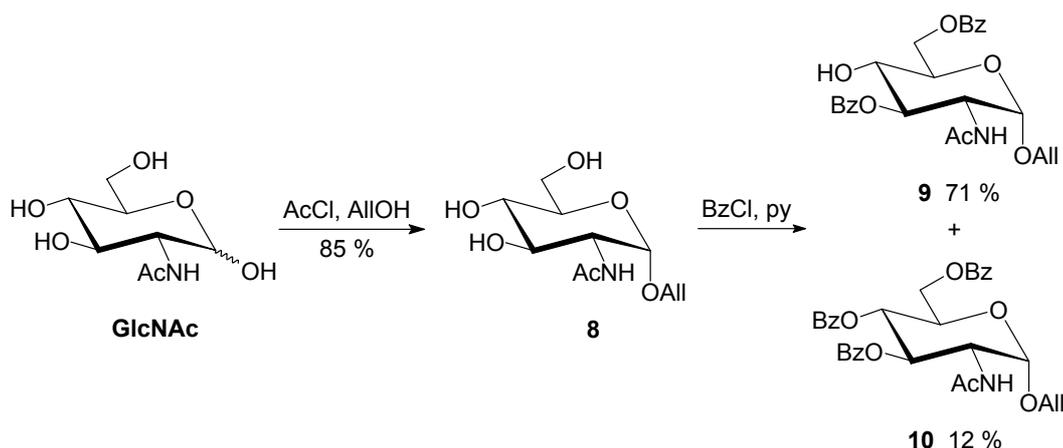


**Abb. 16** Verwendung des 2-Azido-2-desoxyglycosyl-Donors **5** zur Darstellung von  $\alpha$ -Allyl-GalNAc (**1**)

Das so in sehr guten Ausbeuten erhaltene Allyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosylderivat (**6**) wurde in Gegenwart von Triphenylphosphin in einer Staudinger-Reaktion<sup>190</sup> zum Iminophosphoran umgesetzt und *in situ* weiter mit Acetylchlorid zum Acetamidoderivat **7** acetyliert. Zemplén-Deacetylierung lieferte den Referenz-Akzeptor **1** (Abb. 16). Auf diesem Wege konnte **1** aus der günstigen D-Galactose gewonnen werden. Die einzelnen Stufen lieferten das jeweilige Produkt in guten bis sehr guten Ausbeuten. Einzig die Azidonitratisierung gab in Übereinstimmung mit der Literatur über zwei Stufen nur 35 % Ausbeute und die Durchführung erwies sich als ausgesprochen mühselig. Somit ergibt sich ausgehend von D-Galactose eine Gesamtausbeute von nur 15 %, man hält mit **5** aber einen zentralen Glycosyldonor zur Synthese von Glycosiden weiterer Alkohole in Händen.

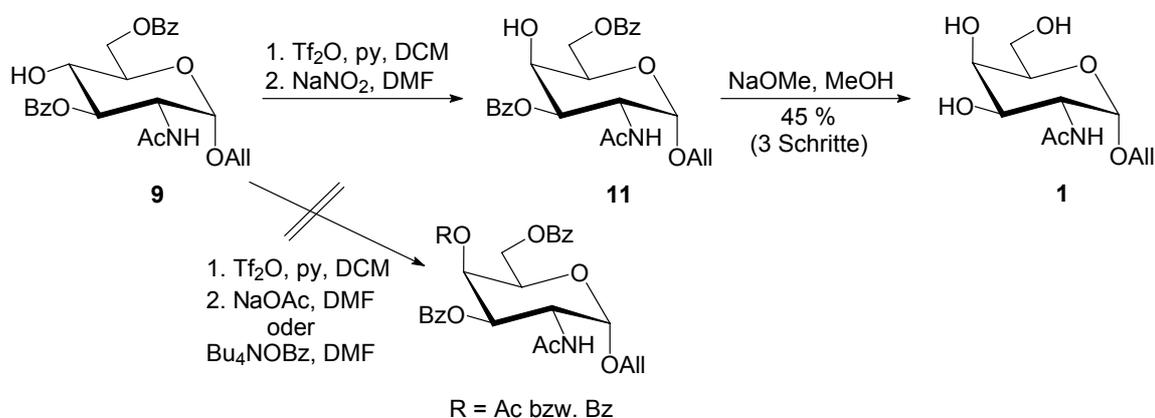
Einen kürzeren Reaktionsweg und bessere Ausbeuten verspricht eine Strategie, die vom Epimeren *N*-Acetyl-D-glucosamin ausgeht und die Inversion der Konfiguration an C-4 beinhaltet. Erste Arbeiten hierzu verwendeten die Methansulfonylgruppe (Mesityl) als Abgangsgruppe in den Positionen 4 und 6 von 3-*O*-acylierten GlcNAc-Derivaten,<sup>191</sup> die Ausbeuten der *galacto*-konfigurierten Substitutionsprodukte lagen aber gewöhnlich unter 50 %. Neuere Methoden nutzen eine regioselektive Acylierung bei tiefen Temperaturen, die hauptsächlich an den Positionen 3 und 6 blockierte, an Position 4 jedoch unsubstituierte Produkte liefert,<sup>192,193</sup> so dass die Substitution nur an diesem Zentrum erfolgen muss. Als Austrittsgruppe kommen neben der Mesityl- noch die 4-Brombenzolsulfonyl- (Brosyl)<sup>194</sup> und die sehr reaktive Trifluormethansulfonylgruppe (Triflyl)<sup>195</sup> zum Einsatz. Die Inversion erfolgt durch einen nucleophilen Rückseitenangriff mit Natrium- bzw. Cäsiumbenzoat<sup>196</sup> sowie Tetrabutylammoniumacetat bzw. -benzoat<sup>197</sup> zum entsprechenden Acylderivat oder mit Natriumnitrit<sup>198</sup> zur OH-freien Verbindung mit *galacto*-Konfiguration. Bei letzterer Umsetzung bildet sich wahrscheinlich ein intermediärer Nitritester, der bei der anschließenden wässrigen Aufarbeitung hydrolysiert wird.

In einer Fischer-Glycosylierung wurde analog zu **1** Allyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosid (**8**) dargestellt. Auch in diesem Fall konnten die Literatúrausbeuten von 31-65 %<sup>182,199,200</sup> in Gegenwart von Bortrifluorid-Etherat durch Optimierung der Reaktionsbedingungen und Verwendung von Acetylchlorid als Katalysator auf sehr gute 85 % gesteigert werden. Die Umsetzung mit Benzoylchlorid bei -35 °C gab überwiegend das 3,6-Dibenzoat **9** neben 12 % des entsprechenden Tribenzoats **10** (Abb. 17). Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum wird das Signal des nicht-acylierten H-4 bei 3.83 ppm gefunden. Die Lokalisierung der Benzoatgruppen in Position 3 und 6 kann mittels eines HMBC-NMR-Spektrums durch Kreuzkopplung der Carbonyl-Kohlenstoffe mit den entsprechenden tieffeldverschobenen Ringprotonen H-3 (5.36 ppm) und H-6 (4.77 und 4.52 ppm) eindeutig bestimmt werden.



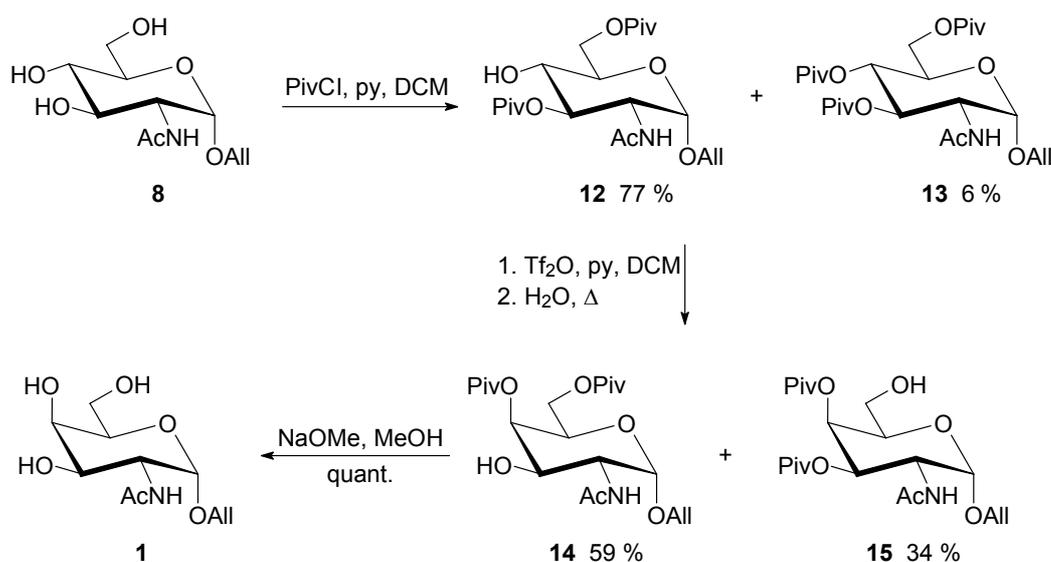
**Abb. 17** Regioselektive Benzoylierung von  $\alpha$ -Allyl-GlcNAc

Nashed *et al.* verwendeten für **9** als Abgangsgruppe Brosylat, substituierten es mit Cäsiumbenzoat unter Inversion und erhielten das entsprechende perbenzoylierte GalNAc-Derivat in einer Ausbeute von 70 % über zwei Stufen.<sup>201</sup> In dieser Arbeit sollte die reaktivere Triflylgruppe Anwendung finden. Ihre Einführung in Position 4 gelang in der Kälte annähernd quantitativ, bei der direkten Umsetzung des Rohprodukts mit Natriumacetat oder Tetrabutylammoniumbenzoat in *N,N*-Dimethylformamid konnte aber keine Produktbildung beobachtet werden. Die Reaktion mit Natriumnitrit zum OH-freien **11** gelang zwar, es kam aber zu einer teilweisen Zersetzung und Wanderung der Benzoyl-Schutzgruppen und somit zu einem heterogenen Gemisch. Zur Erleichterung der Aufarbeitung wurde dieses Gemisch direkt zu **1** entschützt (Abb. 18). Der Erfolg der Epimerisierung kann an der für die *galacto*-Konfiguration typischen sehr kleinen Kopplungskonstante  $J_{4,5}$  erkannt werden, die zur Folge hat, dass das NMR-Signal für H-4 als breites Dublett (*bd*) erscheint. Die Gesamtausbeute kann im Gegensatz zur Azidonitratierung auf 27 % beinahe verdoppelt werden. Diese elegante Synthesestrategie sollte aber noch weiteres Potential besitzen, da den limitierenden Faktor in diesem Fall die Benzoyl-Schutzgruppen darstellen.



**Abb. 18** Epimerisierung von  $\alpha$ -Allyl-GlcNAc

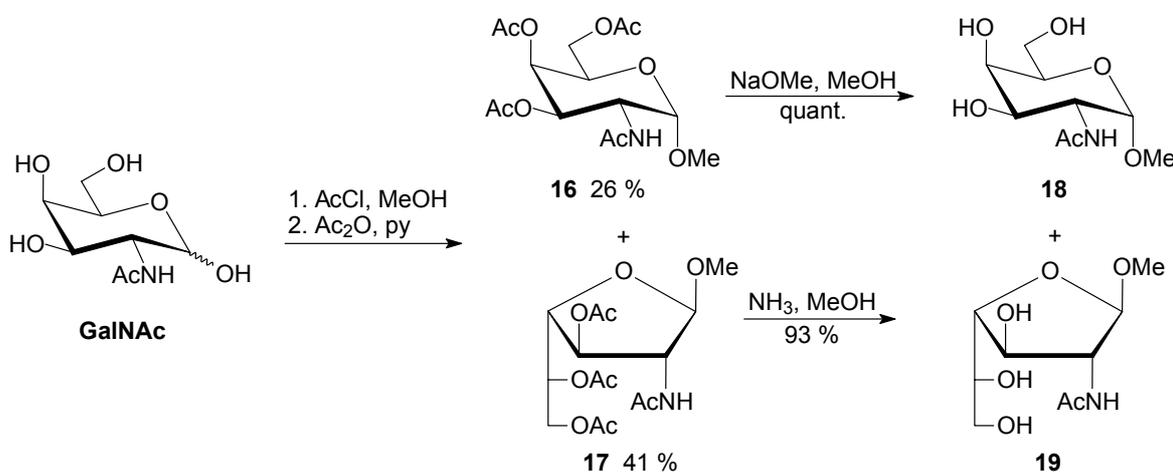
Russo *et al.* verwendeten in einem analogen Ansatz zur Darstellung des entsprechenden  $\beta$ -Allylglycosids mit Erfolg Pivaloyl-Schutzgruppen und Triflat als Abgangsgruppe.<sup>202</sup> Zusatz von etwas Wasser zu dem *in situ* gebildeten Triflat hat die Wanderung der Pivaloatgruppe von Position 3 auf Position 4 unter Inversion der Konfiguration zur Folge. Bei Anwendung dieser Reaktionsfolge konnte hier aus **8** das entsprechende 3,6-Dipivaloat **12** neben Tripivaloat **13** gewonnen werden. Die Regioselektivität der Reaktion kann mittels NMR-Spektroskopie bestätigt werden. Verbindung **12** wurde in das entsprechende Triflat mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid in Dichlormethan / Pyridin (20:1) überführt. Zugabe von Wasser und Erhitzen unter Rückfluss bewirkten die Inversion unter Wanderung der Schutzgruppen. Nach Aufarbeitung der Reaktion konnte nicht nur das erwartete 4,6-Dipivaloat **14** in 59 % Ausbeute isoliert werden, sondern auch 34 % seines 3,4-Regioisomeren **15** neben 2.5 % Tripivaloat und 1.5 % nicht-umgesetzten Triflats (Abb. 19). Während in **14** das Proton an der nicht-substituierten Position 3 eine Verschiebung im <sup>1</sup>H-NMR von 3.93 ppm besitzt, beträgt sie für die Protonen an Position 6 von **15** 3.60 und 3.41 ppm. Die Carbonyl-Kohlenstoffe der Pivaloylgruppen zeigen auch hier im HMBC eine Kreuzkopplung mit den entsprechenden tieffeldverschobenen Ringprotonen (**14**: H-4 5.29, H-6 4.06 ppm; **15**: H-3 5.25, H-4 5.29 ppm). Man erhält auf diese Weise zwei sehr interessante GalNAc-Derivate, die sich sonst nur umständlich herstellen lassen würden und als Edukte für weitergehende Modifikationen oder Glycosylierungen an Position 3 respektive 6 dienen können. Die Depivaloylierung erfolgt quantitativ und ermöglicht die Synthese von  $\alpha$ -Allyl-GalNAc in 61 % Gesamtausbeute ausgehend von GlcNAc. Die hier verwendete intramolekulare Substitution einer Triflat-Abgangsgruppe unter Inversion der Konfiguration eröffnet somit den schnellen und günstigen Zugang zu Glycosiden von *N*-Acetyl-D-galactosamin und den spezifisch geschützten Intermediaten **14** und **15**.



**Abb. 19** Darstellung von  $\alpha$ -Allyl-GalNAc (**1**) durch Epimerisierung

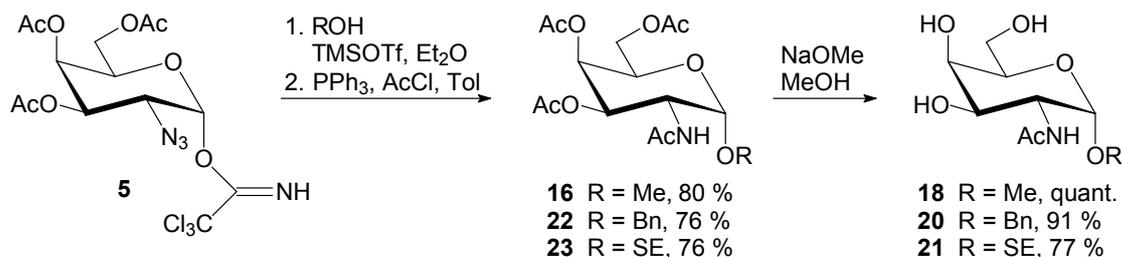
Um den Einfluss der Aglycon-Struktur auf die Erkennung durch die zu verwendenden Glycosidasen beurteilen zu können, sollen weitere Glycoside synthetisiert werden. Die größte Verbreitung für derartige Untersuchungen besitzen die sehr stabilen Methylglycoside, durch die sich mögliche sterische Hinderungen minimieren lassen. Dies kann in Einzelfällen aber auch zu einem Verlust der Regioselektivität führen.<sup>172</sup> Wie bereits erwähnt, haben sich die 2-(Trimethylsilyl)-ethyl- (SE) und die Benzylgruppe als gut geeignete temporäre Schutzgruppen für die anomere Position bewährt, so dass auch ihre Synthese angestrebt wird.

Die Fischer-Glycosylierung von *N*-Acetyl-D-galactosamin in Methanol lieferte ein Gemisch aus zwei Hauptprodukten, die an Kieselgel nicht sauber getrennt werden konnten. Zur Reinigung wurde der Rückstand acetyliert und lieferte so nach säulenchromatographischer Trennung neben dem gewünschten Methyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid **16** auch das entsprechende  $\beta$ -Furanosid **17** (Abb. 20).<sup>203</sup> D-Galactopyranoside besitzen in der <sup>4</sup>C<sub>1</sub>-Konformation eine axiale Gruppe an C-4, bei den Furanosiden dagegen stehen die Substituenten in Position 2, 3 und 4 jeweils *trans* zueinander, so dass mehr furanoide Produkte zu erwarten sind als bei den D-Glucosiden. C-1 bis C-4 von **17** zeigen im <sup>13</sup>C-NMR eine sehr deutliche Tieffeldverschiebung, wie sie typisch ist für  $\beta$ -Galactofuranoside.<sup>204,205</sup> Hervorzuheben sind dabei C-1 und C-2 mit 108.32 respektive 60.76 ppm, ein eindeutiger Hinweis auf eine  $\beta$ -Verknüpfung sowie C-4 mit 80.21 ppm, typisch für Furanoside. Deacetylierung unter Standardbedingungen ergab die entsprechenden ungeschützten Derivate **18** und **19**.



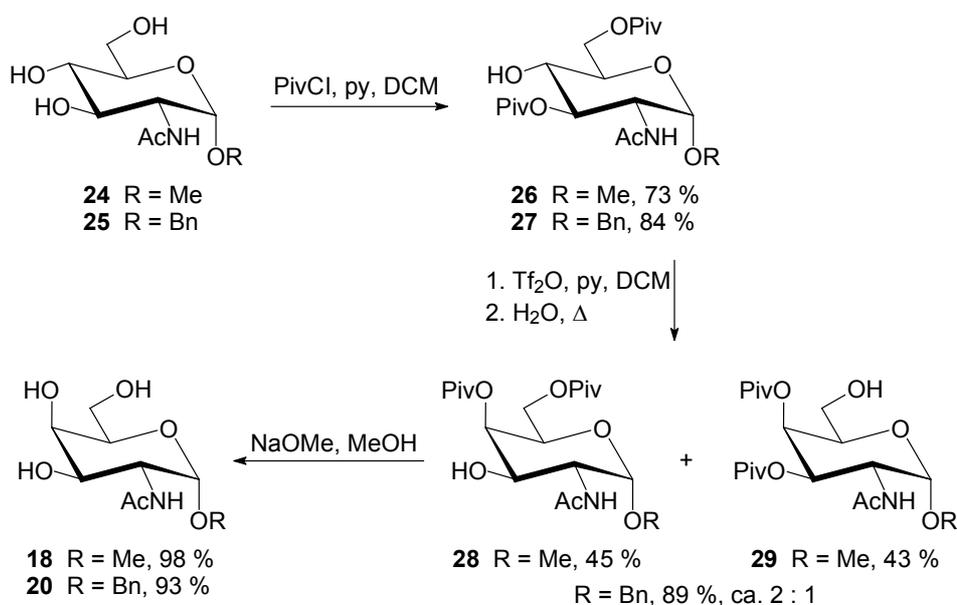
**Abb. 20** Fischer-Glycosylierung von GalNAc in Methanol

Die analoge Umsetzung nach Fischer in Benzylalkohol oder 2-Trimethylsilylethanol lieferte direkt Benzyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid<sup>206</sup> (**20**) und 2-(Trimethylsilyl)-ethyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**21**) in befriedigenden Ausbeuten von 39 bzw. 51 %. Die Fischer-Glycosylierung ist somit für die Darstellung dieser Verbindungen für analytische Zwecke geeignet, für einen präparativen Ansatz ist das verwendete *N*-Acetyl-D-galactosamin aber zu teuer.



**Abb. 21** Verwendung des Glycosyldonors **5** zur Darstellung weiterer  $\alpha$ -Glycoside

Der Trichloracetimidat-Donor **5** konnte gemäß der Darstellung von  $\alpha$ -Allyl-GalNAc auch zur Glycosylierung von Methanol, Benzylalkohol und 2-Trimethylsilylethanol herangezogen werden. Die Glycosylierung unter den bereits beschriebenen Reaktionsbedingungen lieferte die drei entsprechenden  $\alpha$ -Glycoside. Dem folgte ein Reduktion der Azido-Funktion und *in situ* *N*-Acetylierung. Die abschließende *O*-Deacetylierung lieferte die ungeschützten Produkte **18**, **20** und **21** in erfreulichen Gesamtausbeuten (Abb. 21).



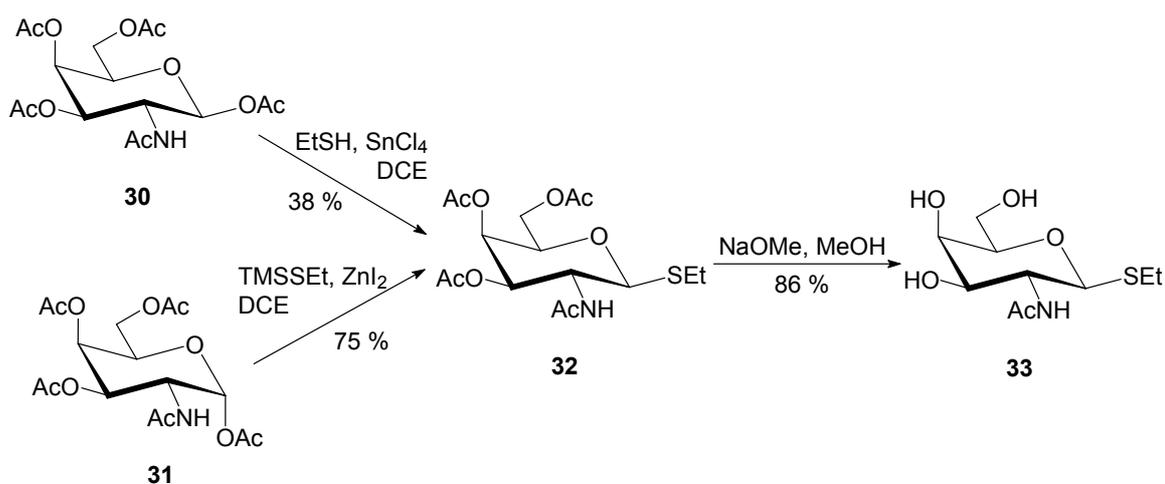
**Abb. 22** Darstellung von  $\alpha$ -Methyl-GalNAc (**18**) und  $\alpha$ -Benzyl-GalNAc (**20**) durch Epimerisierung

Wie schon bei der Darstellung von **1** gilt auch hier, dass die Synthese schnell und in guten Ausbeuten erfolgt, wenn man den Trichloracetimidat-Donor **5** in Händen hat. Bedingt durch die hohen Kosten des Alkohols, ist die Azidonitratisierung besonders für die Glycosylierung von 2-Trimethylsilylethanol geeignet, seine Verwendung als Lösungsmittel für die Fischer-Glycosylierung ist dagegen wenig sinnvoll. Aus diesem Grund wurde der Weg über die Epimerisierung der entsprechend pivaloylierten GlcNAc-Derivate nur für die Methyl- und Benzylglycoside untersucht. Fischer-Glycosylierung von *N*-Acetyl-D-glucosamin in Gegenwart von saurem Ionentauscher Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ ) oder Acetylchlorid lieferte  $\alpha$ -Methyl-GlcNAc<sup>207</sup> (**24**) bzw.  $\alpha$ -Benzyl-GlcNAc<sup>208</sup> (**25**), die regioselektiv an Position 3 und 6 mit Pivaloylgruppen

geschützt wurden. Die Einführung der Triflylgruppe erfolgte wieder quantitativ, so dass in einer Eintopfreaktion Wasser zugesetzt werden konnte und Triflat unter Inversion der Konfiguration an C-4 intramolekular substituiert wurde. Im Fall des Methylglycosids wurden die gut zu trennenden 4,6- und 3,4-Dipivaloate **28** und **29** in ungefähr gleichen Mengen gebildet. Die entsprechenden 4,6- und 3,4-acylierten Benzyl-2-acetamido-2-desoxy-di-*O*-pivaloyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside entstanden im Verhältnis 2:1. Sie ließen sich säulenchromatographisch aber nicht trennen, so dass das Gemisch dieser beiden Produkte entschützt wurde (Abb. 22).<sup>209</sup> Wie schon bei der Synthese von  $\alpha$ -Allyl-GalNAc ist auch die präparative Darstellung der Verbindungen **18** und **20** aus den analogen *N*-Acetyl-D-glucosamin-Derivaten die Methode der Wahl, indem die Position 4 nach regioselektiver Einführung von Pivaloyl-Schutzgruppen epimerisiert wird.

#### 4.1.2. Thioglycoside

Larsson gelang die chemoenzymatische Galactosylierung von Ethyl-2-acetamido-2-desoxy-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranosid mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Er beobachtete keine Hydrolyse der  $\beta$ -glycosidischen Bindung des Akzeptors, die Ausbeute betrug jedoch nur 10%.<sup>173</sup> Thioglycoside können einerseits leicht in gängige Glycosyldonoren (z.B. Trichloracetimidate oder Fluoride) überführt werden, sie sind andererseits nach Aktivierung durch elektrophile Reagenzien aber auch direkt als Donoren für Glycosylierungen einsetzbar.<sup>210,211</sup> Zu dieser Flexibilität kommt hinzu, dass sie sehr hydrolysestabil sind und sich bei den meisten Schutzgruppenmanipulationen inert verhalten. Somit würde der Akzeptor Ethyl-2-acetamido-2-desoxy-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid (**33**) nach erfolgter Galactosylierung einen sehr interessanten Disaccharid-Baustein für Oligosaccharidsynthesen bilden.



**Abb. 23** Synthese des  $\beta$ -Thioglycosids **33**

Zur Darstellung dieses Akzeptors wurde das  $\beta$ -Peracetat **30** von GalNAc verwendet. Die Glycosylierung in Gegenwart von Zinntetrachlorid<sup>212</sup> lieferte das gewünschte  $\beta$ -Thioglycosid **32**

aber nur in unbefriedigenden Ausbeuten, da es zur Bildung des entsprechenden 2-Oxazolins als Nebenprodukt kam. Bei der durch Zinkiodid katalysierten Reaktion von 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranose (**31**) mit Ethylthiotrimethylsilan (TMSSEt) konnte die Oxazolin-Bildung nicht beobachtet werden, so dass **32** als einziges Produkt in guten Ausbeuten erhalten wurde (Abb. 23).<sup>213</sup> Die anschließende Deacetylierung unter Standardbedingungen eröffnete den Zugang zum Produkt **33**.

#### 4.1.3. C-Glycoside

Da die glycosidische Bindung gegenüber chemischer und enzymatischer Hydrolyse anfällig ist, hat die Synthese von Glycomimetika, die der natürlichen Struktur entsprechen aber eine höhere metabolische Stabilität aufweisen, ein großes Maß an Aufmerksamkeit gewonnen.<sup>214</sup> Ein interessanter Ansatz ist die Synthese von *C*-Glycosiden, bei der das glycosidische Acetal in eine stabile Etherfunktion überführt wird. Diese *C*-Glycoside werden nicht mehr durch Glycosidasen gespalten und können, wenn ihre Struktur der des natürlichen Enzymsubstrats hinreichend ähnlich ist, als kompetitive Inhibitoren fungieren.<sup>215</sup> Ein hydrolysestabiles  $\alpha$ -*C*-Glycosyl-Analogon von GalNAc, über eine nicht-natürliche Oxim-Bindung an ein Peptidfragment konjugiert, wird *in vitro* vom entsprechenden T-Zell-Rezeptor erkannt und kann so eine Immunantwort auslösen.<sup>216</sup> Es wurden inzwischen eine große Anzahl unterschiedlicher Synthesestrategien für *C*-Glycoside entwickelt, von denen ein Großteil auf Lewis-Säure katalysierter nucleophiler Addition an die aktivierte anomere Position beruhen.<sup>217</sup> Während so die Darstellung vieler *C*-Glycoside von 2-Alkoxy-, 2-Fluoro- und 2-Desoxysacchariden gelang, steht die Entwicklung einer universellen Methode für 2-Amino- und 2-Acetamido-Zucker noch aus. Lewis-Säure-katalysierte *C*-Glycosylierungen scheitern bei entsprechend aktivierten 2-Aminosacchariden, da der Stickstoff an den sauren Katalysator bindet.<sup>218</sup>

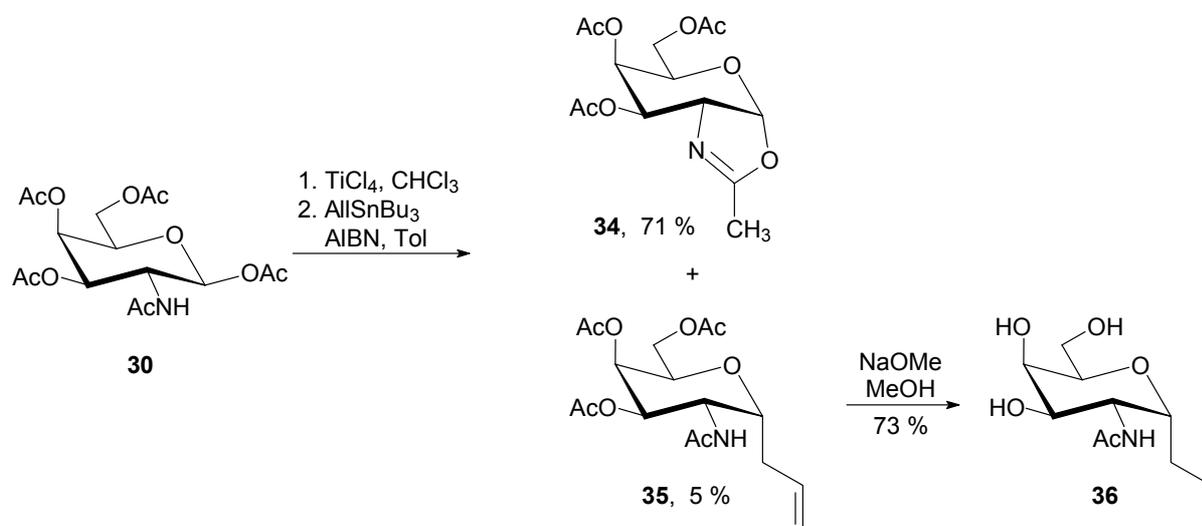
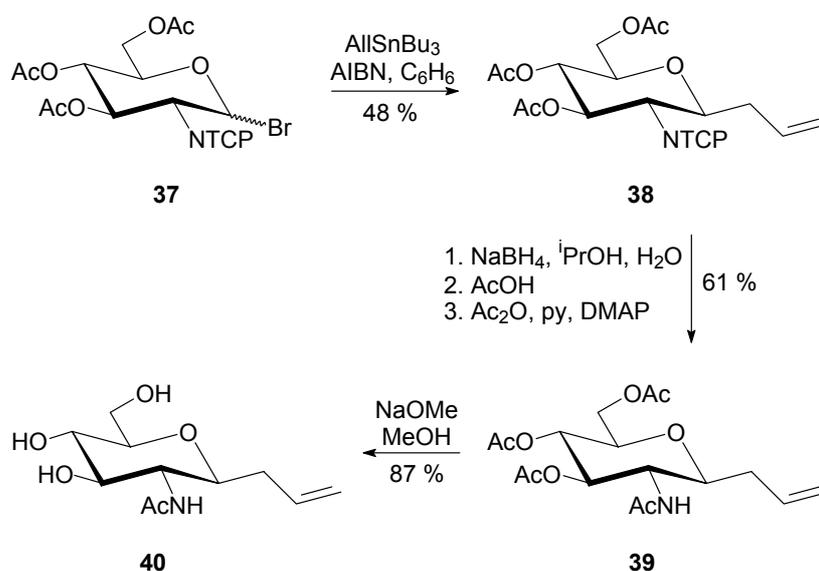


Abb. 24 Keck-Allylierung zur Darstellung von  $\alpha$ -*C*-Allyl-GalNAc **36**

Nicotra *et al.* gelang die Darstellung des T<sub>N</sub>-Antigen-Analogons  $\alpha$ -C-Allyl-GalNAc (**36**) über 14 Stufen ausgehend von D-Glucose, aus der zunächst das  $\alpha$ -C-Glucosid mit einer 2-Hydroxygruppe gewonnen wird. Dieses wird in das entsprechende 2-Acetimidat überführt,<sup>219</sup> gefolgt von Epimerisierung an Position 4.<sup>220</sup> Mit Hilfe der radikalischen Keck-Allylierung ist die Bildung der C-Allyl-Bindung bei 2-Acetamididosacchariden wesentlich einfacher möglich.<sup>221</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde einer von Horton *et al.* entwickelten Darstellung von **36** gefolgt.<sup>222</sup> Die Umsetzung von **30** in ethanolfreiem Chloroform mit Titan-tetrachlorid gab das saubere  $\alpha$ -Chlorid,<sup>223</sup> welches direkt für die Allylierung mit Allyltributylzinn und AIBN eingesetzt wurde (Abb. 24). In Glycosyl-Radikalen befindet sich das ungepaarte Elektron in einem Orbital mit vorwiegend *p*-Charakter. In der <sup>4</sup>C<sub>1</sub>-Sesselkonformation kommt es zu einer Wechselwirkung dieses Orbitals mit einem freien Elektronenpaar des Ringsauerstoffs, so dass ein Angriff überwiegend von der  $\alpha$ -Seite erfolgt. Bei der Umsetzung ist es wichtig das Lösungsmittel und die Reagenzien gut zu trocknen, unter Schutzgas zu arbeiten und die Reaktionslösung vor dem Erhitzen gründlich zu entgasen. Trotz dieser Vorsichtsmaßnahmen handelte es sich bei dem Hauptprodukt der Reaktion nicht um das acetylierte  $\alpha$ -C-Allylglycosid **35**, sondern um das bekannte Oxazolin **34**, welches auch von Schmidt *et al.* bei dieser Reaktion beobachtet wurde.<sup>224</sup> Nach Entschützung von **35** konnte  $\alpha$ -C-Allyl-GalNAc **36** für die enzymatische Galactosylierung erhalten werden.



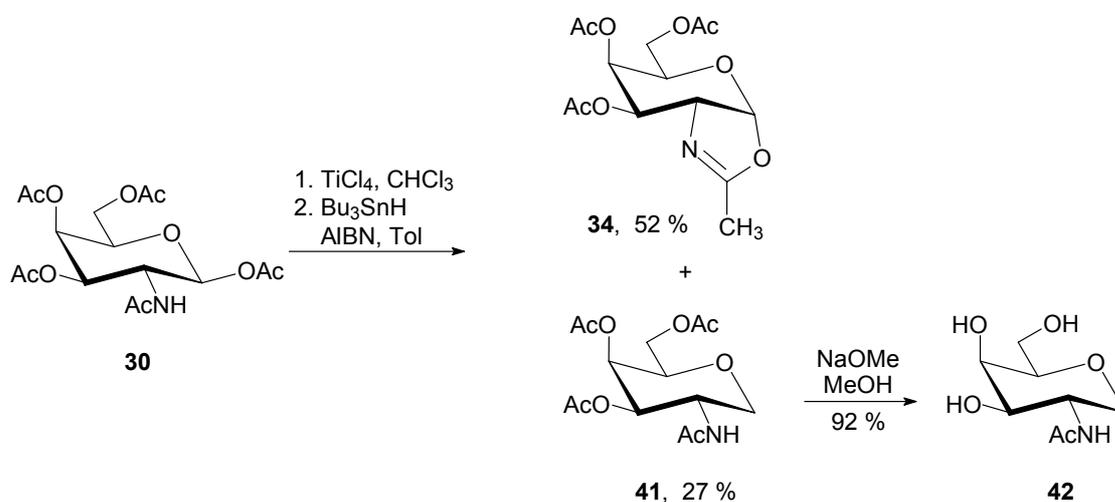
**Abb. 25** Synthese von  $\beta$ -C-Allyl-GlcNAc **40**

Bertozzi *et al.* konnten die Keck-Allylierung durch Verwendung einer sterisch sehr anspruchsvollen Phthalimido- oder Tetrachlorophthalimido-Schutzgruppe für die Darstellung der entsprechenden  $\beta$ -Glycoside nutzen, mussten aber zehn Äquivalente Allylierungsreagenz einsetzen, um der stark verminderten Reaktionsgeschwindigkeit Rechnung zu tragen.<sup>225</sup> Dieser Synthese folgend ließ sich Bromid **37** mit Allyltributylzinn zum  $\beta$ -C-Allylglucosid **38** ohne eine Verunreinigung durch das entsprechende  $\alpha$ -Produkt umsetzen (Abb. 25). Die anomere Konfiguration kann durch die Kopplungskonstante  $J_{4,5} = 10.2$  Hz bestätigt werden, das Signal von H-4 liegt als

ddd vor. Die Abspaltung der TCP-Gruppe erfolgte durch Reduktion mit Natriumborhydrid und saurer Hydrolyse, gefolgt von einer *N*-Acetylierung zu **39** als Eintopfreaktion. Abschließende Deacetylierung lieferte das Zielprodukt **40**.

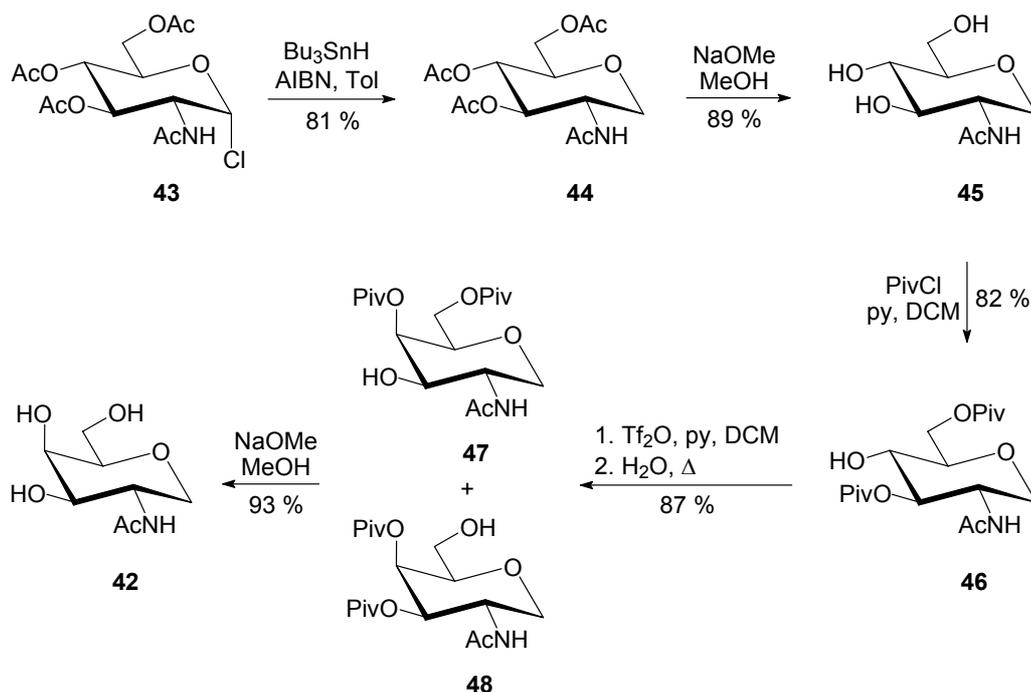
#### 4.1.4. 1,5-Anhydroglycitole

In Anlehnung an die oben diskutierten *C*-Glycoside stellen auch 1,5-Anhydroglycitole hydrolyse-stabile Glycomimetika dar, die außerdem keine Aglycon-Struktur enthalten, welche auf die enzymatische Erkennung Einfluss nehmen kann.<sup>226</sup> Für die Darstellung von 2-Acetamido-1,5-anhydro-2-desoxy-D-galactitol **42** soll die radikalische Dehalogenierung eines anomeren Chlorids durch Trialkylzinnhydride untersucht werden. Diese Methode wurde bereits in einer sehr effizienten Synthese des Epimeren mit *gluco*-Konfiguration verwendet.<sup>227</sup> In Anlehnung an diese Arbeit wurde aus **30** durch Reaktion mit Titan-tetrachlorid das entsprechende  $\alpha$ -Chlorid dargestellt und sofort weiter mit Tributylzinnhydrid in Gegenwart von AIBN umgesetzt. Obwohl konsequent unter Ausschluss von Wasser und Sauerstoff gearbeitet wurde, konnte **41** aber nur in unbefriedigenden Ausbeuten isoliert werden, denn es entstand wie bereits bei der Darstellung des *C*-Allylglycosids **35** auch hier das Oxazolin **34** als Hauptprodukt. Zemplén-Deacetylierung von **41** gab das entschützte Galactitol **42** in nur drei Stufen aus GalNAc (Abb. 26).



**Abb. 26** Darstellung des 2-Acetamido-galactitols **42** aus GalNAc

Die oben erwähnte Synthese des entsprechenden Glucitols **45** erfolgt in sehr guten Ausbeuten, so dass die bereits gut erprobte Epimerisierung an Position 4 auch zur Darstellung von **42** untersucht werden sollte. Die Umsetzung von 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosylchlorid<sup>228</sup> **43** unter den Bedingungen der radikalischen Dehalogenierung nach der Methode von Bamford *et al.* mit anschließender Entfernung der *O*-Acetyl-Schutzgruppen eröffnete den schnellen Zugang zum 2-Acetamidoglucitol **45** (Abb. 27).<sup>227</sup>



**Abb. 27** Darstellung des 2-Acetamido-galactitols **42** aus GlcNAc durch Epimerisierung

Die regioselektive Acylierung in Position 3 und 6 lieferte das Dipivaloat **46**, bestätigt durch die Verschiebung der entsprechenden Ringprotonen im NMR zu tiefem Feld und die erwarteten Kreuzkopplungen im HMBC-Spektrum. Die Synthese des Triflats gelang quantitativ, so dass die Inversion durch intramolekularen Angriff der Pivaloylgruppe *in situ* erfolgen kann. Es entstanden die 4,6- und 3,4-Dipivaloate mit *galacto*-Konfiguration im Verhältnis 9:1, eine chromatographische Trennung an Kieselgel war aber nicht möglich. Die NMR-spektroskopische Untersuchung des Gemisches aus **47** und **48** ermöglicht eine eindeutige Identifizierung der beiden Substanzen und ihrer Substitutionsmuster. Für die abschließende Deblockierung wurde dieses Gemisch direkt eingesetzt, so dass das Galactitol **42** in 48 % Gesamtausbeute über sechs Stufen aus dem Chlorid **43** gewonnen werden konnte (Abb. 27), was eine deutliche Verbesserung gegenüber der von GalNAc ausgehenden Synthese darstellt.

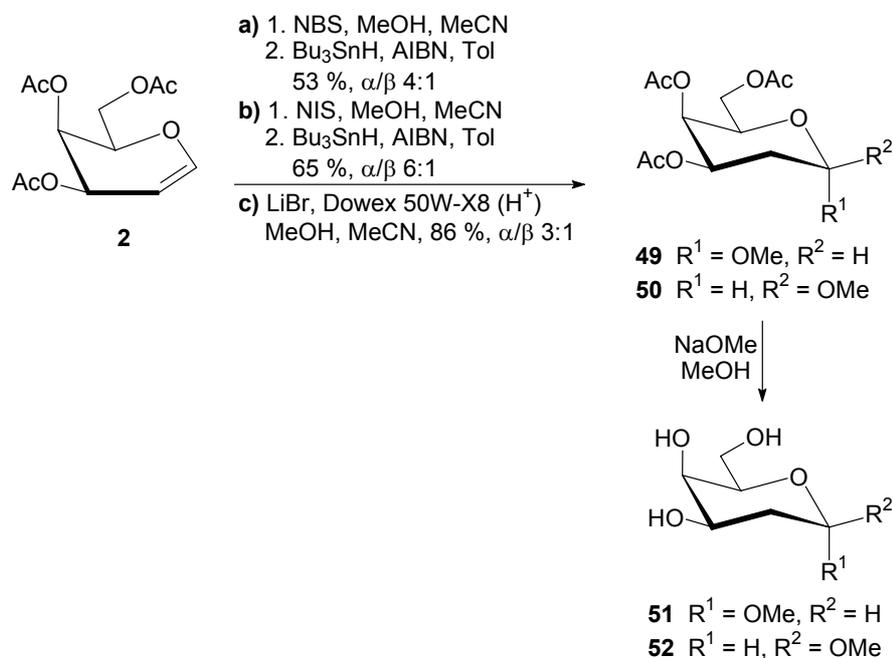
## 4.2. Akzeptoren ohne Acetamido-Funktion

### 4.2.1. 2-Desoxyglycoside

2-Desoxyglycoside sind Bestandteil von zahlreichen biologisch aktiven Naturprodukten, wie Antibiotika – Makrolide oder Anthrazykline – und Herzglycosiden.<sup>229</sup> Im Vergleich zur Synthese „normaler“ Glycoside, ist die Darstellung von 2-Desoxyzuckern eine besonders interessante Herausforderung. Dies ist einerseits bedingt durch die Abwesenheit einer Nachbargruppe zum anomeren Zentrum, die den sterischen Ausgang der Glycosylierung beeinflusst, zum anderen

sind 2-Desoxyglycoside wesentlich hydrolyseempfindlicher, da durch das Fehlen der elektronegativen 2-Hydroxygruppe das intermediäre Oxocarbenium-Ion stabilisiert wird.<sup>230</sup> Die Darstellung der  $\beta$ -konfigurierten Produkte erfolgt durch Donoren mit äquatorialen, einen Nachbargruppeneffekt ausübenden, Substituenten an Position 2 und anschließender reduktiver Entfernung dieses Substituenten. Die durch ein Elektrophil vermittelte Addition eines Akzeptor-Alkohols an die Doppelbindung von Glycalen, gefolgt von der reduktiven Entfernung des Substituenten an Position 2, ermöglicht die stereoselektive Synthese der 2-Desoxy- $\alpha$ -glycoside.<sup>231</sup> In Gegenwart von Lewis-Säuren kann es als Nebenreaktion durch allylische Umlagerung nach Ferrier zur Bildung von 2,3-ungesättigten Glycosiden kommen.<sup>232</sup> Die am weitesten verbreitete Ausführung dieser Methoden dürfte die Haloalkoxylierung mit *N*-Brom- (NBS)<sup>233</sup> bzw. *N*-Iodsuccinimid (NIS)<sup>234</sup> und anschließender Dehalogenierung sein. Halogene addieren sich vorzugsweise an die Oberseite der Doppelbindung von Glycalen. Das Zwischenprodukt mit verbrücktem Halonium-Ion wird von einem Alkohol-Nucleophil ausschließlich am anomeren Zentrum angegriffen und gibt das entsprechende *trans*-ständige 2-Haloglycosid. Die reduktive Dehalogenierung erfolgt radikalisch mit Tributylzinnhydrid oder nach der Nickelborid-Methode.<sup>235</sup>

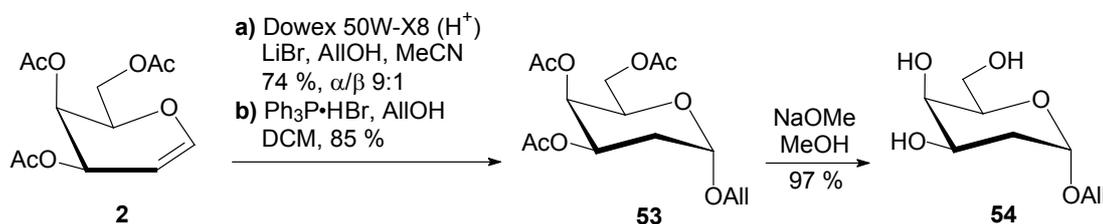
Die Umsetzung von Galactal **2** mit NBS bzw. NIS in der Gegenwart von Methanol lieferte ein Gemisch der  $\alpha$ -*talo*- und  $\beta$ -*galacto*-konfigurierten 2-Haloglycoside. Das Rohprodukt wurde radikalisch zu den geschützten 2-Desoxyglycosiden **49** und **50** umgesetzt, die sich säulenchromatographisch trennen ließen (Abb. 28a und b).



**Abb. 28** Synthese der Methyl-2-desoxy- $\alpha$ - und - $\beta$ -galactopyranoside **51** und **52** nach **a)** der NBS-Methode, **b)** der NIS-Methode und **c)** mit saurem Ionenaustauscher und Lithiumbromid

Die Zuordnung der Anomere erfolgt durch die Kopplungskonstanten  $J_{1,2ax} = 3.6$  und  $J_{1,2eq} = 1.0$  Hz für **49** sowie  $J_{1,2ax} = 9.2$  und  $J_{1,2eq} = 3.1$  Hz für **50**. Die höhere Ausbeute mit NIS kann durch die bessere Ladungsverteilung im Iodonium-Ion und damit einer Stabilisierung des anomeren Oxocarbenium-Ions erklärt werden. Da dieses Verfahren nicht mit olefinischen Alkoholen kompatibel ist, wurden andere Methoden entwickelt, von denen die Säure-katalysierte Addition von Alkoholen an acetylierte Glycale die direkteste ist. Sabesan berichtet, dass sich wasserfreier Sulfonsäure-Ionenaustauscher in der Gegenwart von löslichem Lithiumbromid zur Bildung von 2-Desoxy- $\alpha$ -glycosiden aus Glycalen in guten Ausbeuten eignen, ohne dass die Ferrier-Umlagerung als störende Nebenreaktion auftritt.<sup>236</sup> Die Stereoselektivität dieser Reaktion ist bei weniger reaktiven Alkoholen besser, so dass die Glycosylierung von D-Galactal mit Methanol zwar sehr gute Ausbeuten lieferte, aber auch erhebliche Mengen des  $\beta$ -Glycosids erhalten wurden (Abb. 28c). Zemplén-Deacetylierung gab die beiden gewünschten ungeschützten Produkte, wobei auch **52** auf seine Eignung als Akzeptor für die enzymatische Galactosylierung untersucht werden soll.

Die Verwendung von Allylalkohol als Nucleophil bei der Umsetzung mit saurem Ionenaustauscher und Lithiumbromid lieferte das benötigte Allyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid **53** neben geringen Mengen des  $\beta$ -Glycosids (Abb. 29a).

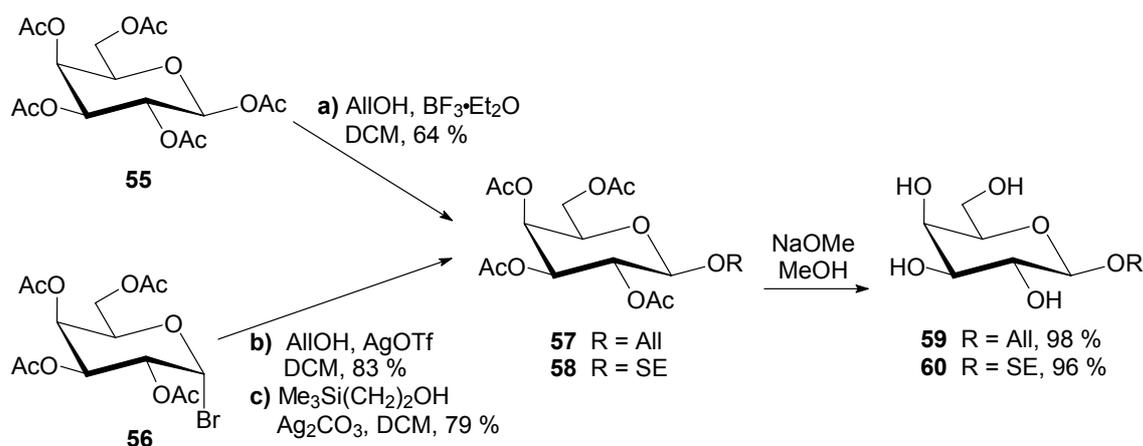


**Abb. 29** Darstellung des 2-Desoxyglycosids **54** nach **a)** Sabesan und **b)** Falck-Mioskowski

Hervorragende  $\alpha$ -Selektivitäten für die direkte Umsetzung von Glycalen mit Alkoholen sind jedoch mit der Falck-Mioskowski-Methode möglich, die Triphenylphosphinhydrobromid als Katalysator verwendet.<sup>237</sup> Untersuchungen mit deuteriertem Katalysator zeigen, dass es sich bei der Reaktion um eine *cis*-Addition an die Doppelbindung handelt.<sup>238</sup> Diese Methode ließ sich gut auf Galactal **2** übertragen und die Umsetzung mit Allylalkohol lieferte ausschließlich das  $\alpha$ -konfigurierte Produkt in sehr guten Ausbeuten (Abb. 29b). Die Entschützung lieferte den Akzeptor **54** für die späteren enzymatischen Umsetzungen.

### 4.2.2. Galactoside

Als Donoren für die chemoenzymatische Synthese mit Glycosidasen werden häufig aktivierte Nitrophenylglycoside eingesetzt, die wesentlich schneller hydrolysiert werden als einfache Alkylderivate. Demzufolge sollte die Umsetzung von *para*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (*p*NP-Gal) mit einem im deutlichen Überschuss vorliegendem Alkyl- $\beta$ -D-galactopyranosid in Gegenwart einer  $\beta$ -Galactosidase möglich sein, wenn das  $\beta$ -Alkylgalactosid als geeigneter Akzeptor erkannt wird. Als Konkurrenzreaktion tritt hierbei die Hydrolyse des Akzeptors auf, die dessen Verfügbarkeit für die Galactosylierung vermindert. Nilsson verwendete zur Darstellung von  $\beta$ -Alkylgalactosiden  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli*, die einen Galactoserest von Lactose auf den jeweiligen Akzeptor-Alkohol überträgt. Die Allyl- und 2-(Trimethylsilyl)-ethylglycoside konnten in 25 bzw. 9 % Ausbeute isoliert werden, außerdem wurde durch eine weitere Galactosylierung der Produkte die Bildung der entsprechenden Disaccharid-Glycoside mit interner  $\beta$ 1-3- oder  $\beta$ 1-6-Verknüpfung in geringen Mengen beobachtet.<sup>150</sup> Durch die direkte Verwendung der  $\beta$ -Alkylgalactoside als Akzeptoren und des aktivierten Donors *p*NP-Gal, der einen höheren  $k_{\text{cat}}/K_M$ -Wert aufweist als Lactose, sollten die Disaccharidausbeuten verbessert werden. Für diese Arbeit erfolgt die Darstellung der zwei  $\beta$ -Galactoside, die als Aglycon eine Allyl- bzw. 2-(Trimethylsilyl)-ethylgruppe tragen, auf klassischem Weg. Die Glycosylierung erfolgte mit Allylalkohol und  $\beta$ -D-Galactosepentaacetat **55** nach Helferich, die Umsetzung mit Acetobromgalactose **56** nach Koenigs-Knorr lieferte das 1,2-*trans*-Produkt **57** jedoch in besseren Ausbeuten (Abb. 30a und b). Entsprechend ließ sich auch 2-(Trimethylsilyl)-ethanol in Gegenwart des Promotors Silbercarbonat glatt galactosylieren (Abb. 30c). Bedingt durch die nachbargruppenaktive Acetyl-Funktion an Position 2 wird in allen Fällen ausschließlich die Bildung des  $\beta$ -Galactosids beobachtet. Deacetylierung unter Standardbedingungen lieferte die beiden Akzeptoren **59** und **60**.

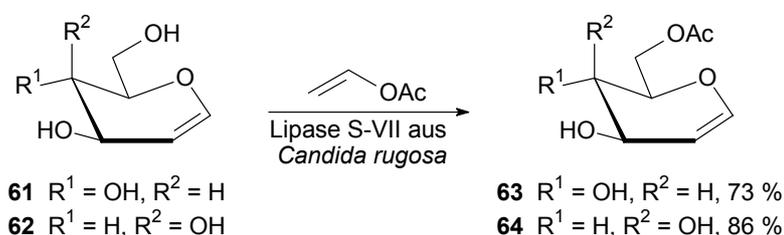


**Abb. 30** a) Lewis-Säure- und b) Silbersalz-katalysierte Galactosylierung von Allylalkohol und c) 2-(Trimethylsilyl)-ethanol

### 4.2.3. Modifikationen an Position 1 und 2

Nach den Beobachtungen von Distler und Jourdian ist D-Galactal ein Inhibitor der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden.<sup>177</sup> Die  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli* wird gleichfalls von D-Galactal inhibiert, erkennt allerdings das an Position 6 acetylierte Derivat ebenso wie D-Glucal und sein 6-Acetylderivat als Akzeptor.<sup>239,240</sup> Diese Untersuchungen sollen auf die zur Verfügung stehenden  $\beta$ -Galactosidasen ausgedehnt werden, da die so erhaltenen Glycal-Disaccharide attraktive Zwischenprodukte für die Synthese von komplexen natürlichen und unnatürlichen Oligosacchariden mit einer Desoxy-, Hydroxy- oder Aminofunktion in Position 2 sein können.<sup>241</sup>

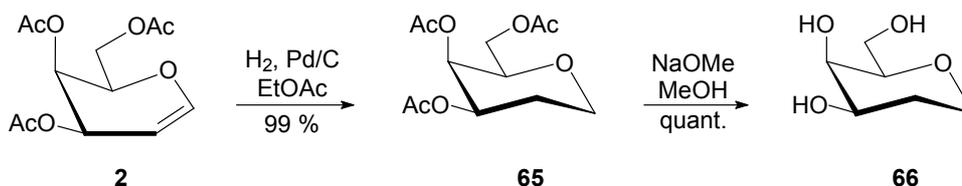
Während die spezifische Schützung und Entschützung von Kohlenhydraten häufig eine mehrstufige Synthesesequenz benötigt, bilden enzymatische Methoden zur regioselektiven Acylierung und Deacylierung mit Lipasen eine interessante Alternative. In wässriger Lösung liegt das Gleichgewicht auf Seiten der Hydrolyse, aber durch Verwendung wasserfreier organischer Lösungsmittel und eines Überschusses des Acyldonors sind deutliche Verbesserungen der Ausbeute möglich. Während die Veresterung durch den Einsatz der freien Säure in der Regel aber nur unbefriedigend verläuft, kann die Verschiebung des Gleichgewichts hin zu den Produkten durch die Umesterung von einem aktivierten, evtl. sogar irreversiblen Acyldonor erreicht werden, wie dies z.B. Enolester sind.<sup>242,243</sup> Als besonders geeignet für die regioselektive Acetylierung von D-Glucal **61** und D-Galactal **62** mit Vinylacetat haben sich Subtilisin BPN<sup>244</sup> in *N,N*-Dimethylformamid und die Lipase S-VII aus *Candida rugosa* (EC 3.1.1.3., Familie CE10)<sup>245</sup> erwiesen. Das letztgenannte Enzym fand im Rahmen dieser Arbeit Anwendung (Abb. 31). In beiden Fällen wurde ausschließlich die primäre Alkoholgruppe acetyliert, die Bildung eines anderen monosubstituierten oder eines bisubstituierten Produkts konnte nicht nachgewiesen werden. Die Reaktion an C-6 geht einher mit einer Verschiebung der Resonanz dieser Protonen im <sup>1</sup>H-NMR um 0.6 ppm zu tieferem Feld und dem Auftreten eines Acetylsignals im Spektrum. Die Kreuzkopplung zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff und den Protonen an Position 6 im HMBC-Spektrum bestätigt diese Zuordnung.



**Abb. 31** Enzymatische Acylierung zur Darstellung von 6-O-Acetyl-D-glucal **63** und -D-galactal **64**

D-Galactal öffnet den effizienten Zugang zu einem weiteren potentiellen Akzeptor, der sowohl am anomeren Zentrum als auch an der Position 2 desoxygeniert ist und der interessante Vergleiche mit **42** und **51** bzw. **54** hinsichtlich der Erkennung durch  $\beta$ -Galactosidasen ermöglichen

sollte. In sehr guten Ausbeuten konnte **2** in Gegenwart von Palladium auf Aktivkohle hydriert und anschließend zu **66** entschützt werden (Abb. 32). Bei beiden Schritten war es ausreichend, Katalysator und Lösungsmittel zu entfernen, weitere Reinigungsoperationen waren nicht nötig. Die Darstellung dieses hochfunktionalisierten chiralen Tetrahydropyrans in wenigen Schritten und sehr guten Ausbeuten verdeutlicht das Potential, welches Kohlenhydraten als Bausteinen des „chiral Pool“ zukommt.



**Abb. 32** Effiziente Darstellung eines 1,2-Dideoxyderivats

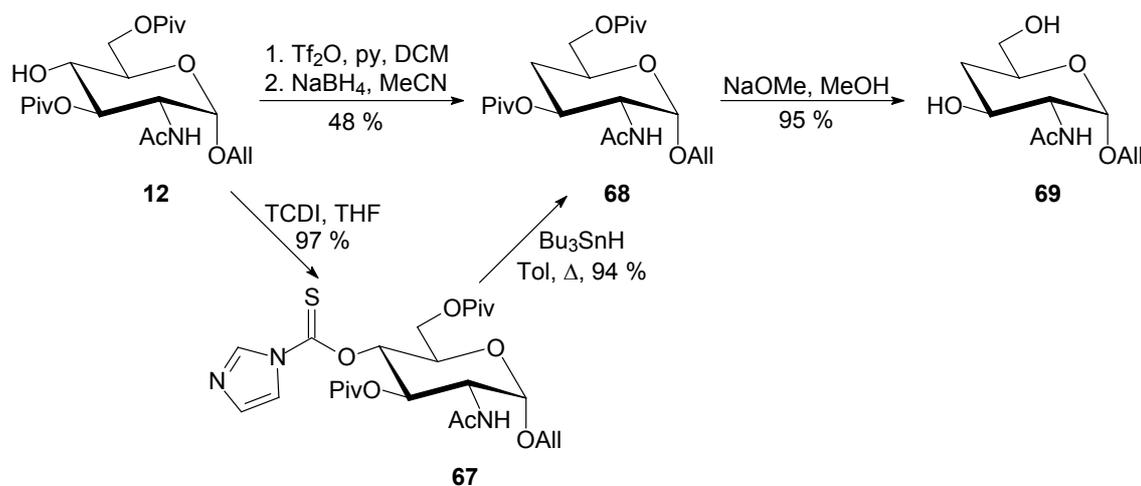
### 4.3. Modifikationen an Position 4 des GalNAc-Referenz-Akzeptors

Eine mögliche „Modifikation“ des GalNAc-Referenz-Akzeptors kann die Inversion der Hydroxygruppe an Position 4 sein. Mit den entsprechenden Derivaten des *N*-Acetyl-D-glucosamins kann es bei der Bindung in der Enzymtasche zu neuen Wechselwirkungen kommen, welche die Erkennung verstärken oder abschwächen. Zusätzlich kann diese Hydroxygruppe in einer neuen Orientierung ebenfalls glycosyliert werden und einen Zugang zu den wichtigen *N*-Acetyl-D-lactosaminen öffnen. Die Darstellung der potentiellen Akzeptoren **8**, **24**, **25**, **40**, **45**, **61** und **63** wurde bereits in Kapitel 4.1. und 4.2. diskutiert, das 4-Desoxyderivat von  $\alpha$ -Allyl-GalNAc, Allyl-2-acetamido-2,4-dideoxy- $\alpha$ -D-xylo-hexopyranosid **69**, ist bisher noch nicht bekannt. Durch seine Verwendung bei enzymatischen Umsetzungen lässt sich die Bedeutung der fehlenden Hydroxygruppe ermitteln, da an dieser Position nun keine Wasserstoffbrückenbindungen mehr möglich sind.

Bei der Wahl einer geeigneten Methode zur Desoxygenierung aus den zur Verfügung stehenden Verfahren muss besonderes Augenmerk auf die Kompatibilität mit der anomeren Allylgruppe und der Acetamido-Funktion gelegt werden. Die Öffnung eines Epoxids mit Raney-Nickel verbietet sich somit, mit Lithium-Aluminium-Hydrid ( $\text{LiAlH}_4$ ) erfolgt die Öffnung aber *trans*-di axial, und aus 3,4-Anhydrogalactose würde überwiegend das 3-Desoxyderivat entstehen. Schon lange bekannt ist die Reduktion von *C*-Halogenderivaten, die mit Raney-Nickel,  $\text{LiAlH}_4$  oder radikalisch mit Tributylzinnhydrid ( $\text{Bu}_3\text{SnH}$ ) erfolgen kann. Arita *et al.* konnten das  $\alpha$ -Benzylderivat von **69** auf diese Weise durch Chlorierung mit Sulfurylchlorid und anschließender radikalischer Dehalogenierung erhalten.<sup>246</sup> Sulfonate werden vorwiegend zur Desoxygenierung primärer Reaktionszentren eingesetzt, besonders die Substitution der *p*-Toluol-

sulfonylgruppe (Tosyl) durch  $\text{LiAlH}_4$  oder Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) ist weit verbreitet. Bei sekundären Tosylaten oder Mesylaten dagegen erfolgt häufig die Spaltung der Schwefel-Sauerstoff-Bindung und der ursprüngliche Alkohol wird zurückgewonnen.<sup>247</sup> Die Substitution einer Triflylgruppe durch  $\text{NaBH}_4$  erlaubt jedoch die Desoxygenierung in primären und sekundären Positionen.<sup>248</sup>

Entsprechend dieser Überlegungen gelang es eine Triflylgruppe an der freien Hydroxy-Funktion in **12** quantitativ einzuführen. Das Rohprodukt wurde direkt für die folgende Desoxygenierung mit  $\text{NaBH}_4$  eingesetzt und ließ sich in befriedigenden Ausbeuten in **68** umwandeln (Abb. 33).



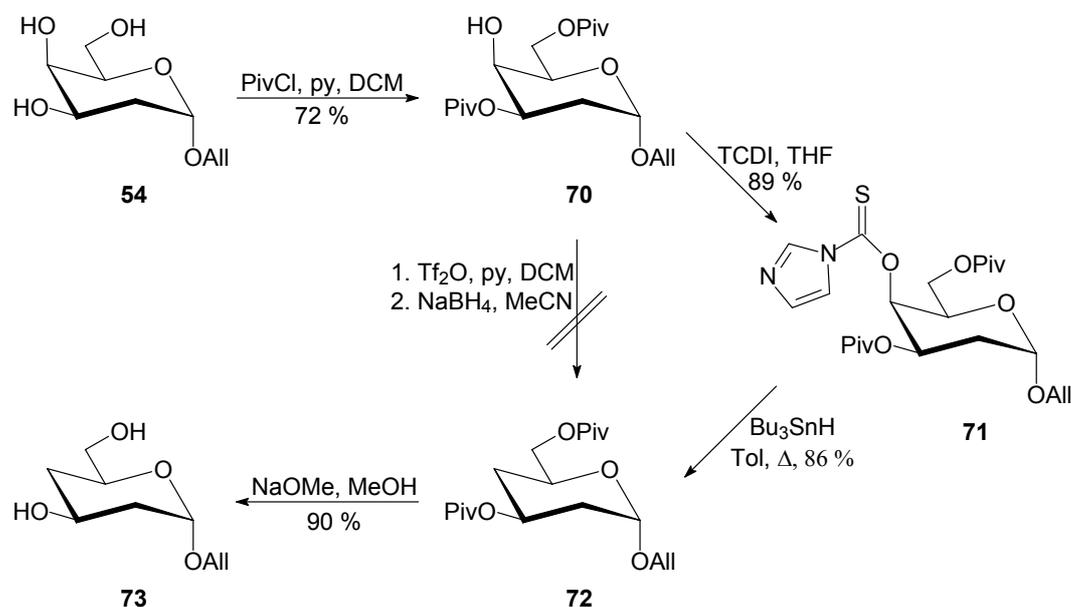
**Abb. 33** Desoxygenierung an Position 4

Barton und McCombie zeigten, dass Thiocarbonylverbindungen mit  $\text{Bu}_3\text{SnH}$  radikalisch desoxygeniert werden können.<sup>249</sup> Eliminierungen werden im Gegensatz zu den Halogen- und Sulfonatderivaten nicht beobachtet. Da im Verlauf der Reaktion ein Radikal am entsprechenden Kohlenstoffatom des Zuckerrings entsteht, eignet sich diese Methode vorwiegend zur Desoxygenierung sekundärer Alkohole, bei primären ist das intermediäre Radikal weniger begünstigt und der ursprüngliche Alkohol wird z.T. wieder zurückgebildet. Als Substituent bewährt haben sich bisher die Xanthogenyl-,<sup>250</sup> Phenoxythiocarbonyl-<sup>251</sup> und Thiocarbonylimidazolgruppen.<sup>252</sup> Paulsen *et al.* verwendeten Phenoxythiocarbonylchlorid zur Darstellung des 4-desoxygenierten  $\alpha$ -Benzylderivats von GalNAc in sehr guten Ausbeuten, während der Einsatz der Thiocarbonylimidazolgruppe in ihren Händen wesentlich schlechtere Ergebnisse zur Folge hatte.<sup>253</sup> Genau andersherum verhielt es sich bei der Synthese des analogen  $\beta$ -Anomers von **69**, bei der die Thiocarbonylimidazol- eindeutig der Phenoxythiocarbonylgruppe vorzuziehen ist.<sup>254</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anwendbarkeit der Thiocarbonylimidazol-Funktion für die Darstellung von **69** untersucht (Abb. 33). Bei der Umsetzung von **12** mit 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol (TCDI) in 1,2-Dichlorethan konnte keine Reaktion beobachtet werden, bei der Verwendung von Tetrahydrofuran (THF) als Lösungsmittel dagegen konnte **67** ohne säulen-

romatographische Reinigung in 97 % Ausbeute erhalten werden. Die radikalische Reduktion mit Tributylzinnhydrid ohne Verwendung eines Radikalstarters lieferte die 4-Desoxyverbindung **68** glatt und in hoher Ausbeute, die Allylgruppe wurde dabei nicht beeinflusst. Die abschließende Abspaltung der Pivaloylgruppen mit Methanolat verlief sehr langsam und benötigte den Katalysator in ungewohnt großen Mengen (Abb. 33).

Für die Darstellung eines 2,4-Didesoxyderivats bietet sich ein analoger Zugang von **54** ausgehend an. Um die selektive Reaktion an Position 4 zu ermöglichen, wurden die anderen beiden, reaktiveren Hydroxygruppen regioselektiv mit den bereits bewährten Pivaloylgruppen geschützt. Dies war mit drei Äquivalente Pivaloylchlorid (PivCl) gut möglich und die Reaktion wurde bei ersten Anzeichen eines trisubstituierten Produkts sofort abgebrochen. Die regioselektive Acylierung der *N*-Acetyl-D-glucosamin-Derivate konnte somit auch auf 2-Desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranoside übertragen werden. Während die Einführung einer Triflylgruppe in **70** quantitativ erfolgte, kam es bei der Umsetzung mit NaBH<sub>4</sub> in Acetonitril zu einer vollständigen Zersetzung des Rohprodukts. Das Fehlen einer Hydroxy- oder Acetamido-Funktion in Nachbarschaft zum anomeren Zentrum hat eine deutliche Steigerung der Hydrolyseempfindlichkeit zur Folge.



**Abb. 34** Synthese von Allyl-2,4-dideoxy- $\alpha$ -D-GalNAc (**73**)

Die Umsetzung von **70** mit TCDI in THF führte aber glatt zum Thiocarbonylimidazoliumderivat **71**. Für die radikalische Desoxygenierung wurde in diesem Fall ein deutlicher Überschuss Bu<sub>3</sub>SnH verwendet und die Reaktionszeit auf zwei Tage ausgedehnt. In **72** ist das Auftreten einer Fern-Kopplung über ca. 4.3 Å (Sybyl 6.8,<sup>255</sup> Tripos-Kraftfeld) zwischen den beiden äquatorialen Protonen in Position 2 und 4 zu beobachten ( $^4J_{2eq,4eq} = 1.5$  Hz), die in einer W-Anordnung vorliegen. Die Entschützung nach Zemplén zum Allyl-2,4-dideoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid **73**

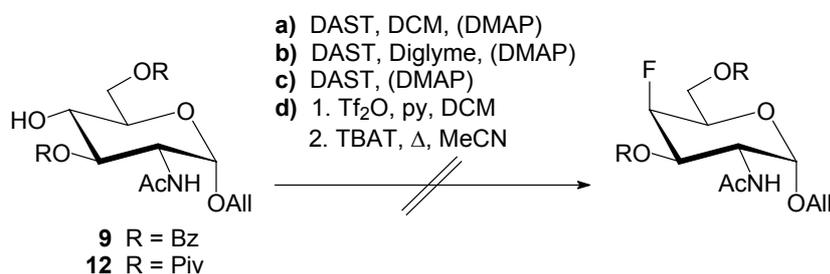
verlief sehr langsam und benötigte trotz Verwendung von 0.5 Äquivalenten Natriummethanolat (NaOMe) bei erhöhten Temperaturen zwölf Tage (Abb. 34).

Die Synthese von Desoxyfluoroverbindungen, in denen eine Hydroxygruppe des Zuckerrings durch Fluorid substituiert wurde, ist für die Untersuchung von Bindungsprozessen von Interesse. Die Kohlenstoff-Fluor-Bindung entspricht in Polarität und Bindungslänge der einer Kohlenstoff-Sauerstoff Bindung in Alkohol-Funktionen, die Reaktivität ist aber unterschiedlich.<sup>256</sup> Es kommt zu keinen sterischen Beeinträchtigungen, da das Fluorid kleiner ist als die ursprüngliche Hydroxygruppe. Ferner kann das Fluorid nicht als Donor, sehr wohl aber als Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung wirken. Besonders im Vergleich zu den Bindungseigenschaften der entsprechenden Desoxyverbindung, die nicht in der Lage ist Wasserstoffbrückenbindungen an dieser Position auszubilden, können sich wertvolle Informationen über die Wechselwirkung einer spezifischen Hydroxygruppe mit einem Rezeptorprotein ergeben. Derartige Desoxyfluoroverbindungen zeigen z. T. aber auch inhibitorische Eigenschaften.<sup>257</sup>

Die Substitution durch Fluoride an sekundären Positionen ist bedingt durch den schwachen nucleophilen Charakter dieser Ionen nur schwer zu erreichen. Traditionell werden Alkalimetallfluoride – z.B. Cäsiumfluorid oder Kaliumfluorid – für diese Reaktion verwendet, aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln erfolgt die Umsetzung aber bei erhöhten Temperaturen und über einen recht langen Zeitraum.<sup>258</sup> Als Fluorid-Quelle findet inzwischen das nucleophilere und in polaren organischen Lösungsmitteln lösliche Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) verstärkter Anwendung,<sup>259</sup> allerdings ist die komplette Entfernung von Wasser aus TBAF so gut wie unmöglich, so dass in der Gegenwart von Fluorid auch Hydroxid-Ionen entstehen, die als Nucleophile fungieren und die Bildung von Hydroxygruppen zur Folge haben. Dies lässt sich durch Tetrabutylammonium(triphenylsilyl)difluorosilicat (TBAT) vermeiden, welches ebenfalls in organischen Lösungsmitteln gut löslich ist, wasserfrei vorliegt und nicht hygroskopisch ist.<sup>260</sup> Als Abgangsgruppe der nucleophilen Substitution wird in der Regel die stark elektronenziehende Triflatgruppe eingesetzt, durch den basischen Charakter des Fluorid-Anions kann es aber leicht zu unerwünschten Eliminierungsreaktionen kommen. Im Gegensatz dazu ermöglicht Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) die direkte Substitution einer Hydroxygruppe nach einem Aktivierungs-Substitutions-Mechanismus.<sup>261</sup> Die Reaktion verläuft meist unter Inversion der Konfiguration, Eliminierungen treten nur im geringeren Ausmaße auf.

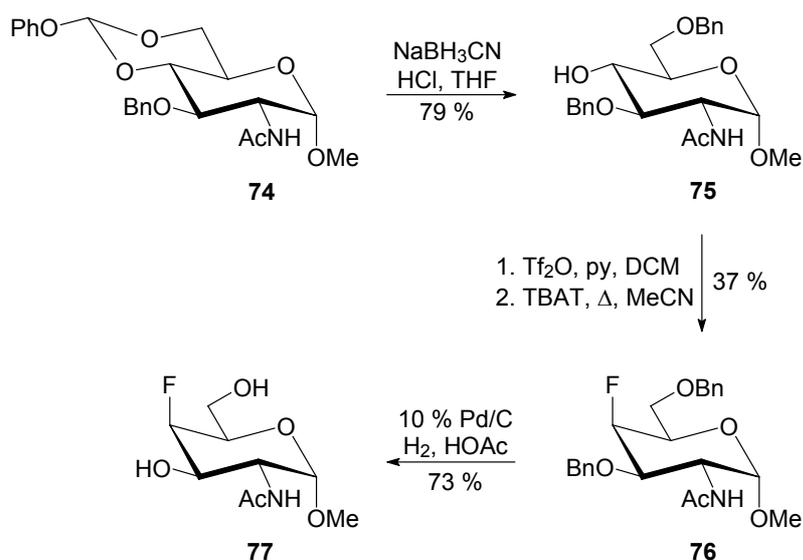
Als geeignete Ausgangsverbindungen zur Darstellung der 4-Fluoroverbindung mit *galacto*-Konfiguration bieten sich die 3,6-diacylierten Verbindungen **9** und **12** an. Bei ihrer Umsetzung mit DAST in Dichlormethan, Diethylglycoldimethylether (Diglyme) oder reinem Reagenz konnte aber keine befriedigende Produktbildung nachgewiesen werden. Es entstand ein komplexes Gemisch, welches sich nicht trennen ließ. Die Zugabe von 4-Dimethylaminopyridin (DMAP)<sup>183</sup> zu den einzelnen Reaktionen blieb ohne Auswirkung. Als Alternative wurde das jeweilige 4-Triflat

dargestellt und direkt mit TBAT umgesetzt, aber auch diese Methode lieferte nicht das gewünschte Produkt (Abb. 35).



**Abb. 35** Versuche zur Darstellung von Allyl-4-desoxy-4-fluoro- $\alpha$ -D-GalNAc

Szarek und Kisilevsky berichteten im Verlauf der hier vorliegenden Arbeit von der Synthese mehrerer 4-Desoxy-4-fluoro-GlcNAc-Derivate aus den entsprechenden 3,6-dibenzoylierten Verbindungen mit *galacto*-Konfiguration durch Inversion mit TBAF.<sup>262</sup> Die entsprechende Substitution an den 3,6-dibenzoylierten Verbindungen mit *gluco*-Konfiguration zur Darstellung der auch in dieser Arbeit angestrebten 4-Desoxy-4-fluoro-GalNAc-Derivate gelang ihnen jedoch nicht. Sharma *et al.* bemerkten einen sterischen Einfluss eines großen Substituenten an Position 6, der scheinbar einen axialen nucleophilen Angriff des Fluorids auf die *gluco*-konfigurierten Edukte verhindern kann, und umgingen ihn durch Verwendung von Benzyl-3,6-dibenzyl- $\alpha$ -D-GlcNAc als Ausgangsverbindung.<sup>263</sup> Auf diese Weise gelang ihnen die Einführung eines Fluorids unter Inversion der Konfiguration in überzeugenden Ausbeuten. Da die Verwendung von Benzyl-Schutzgruppen aber nicht mit der anomeren Allylgruppe des Referenz-Akzeptors kompatibel ist, wird im Folgenden das  $\alpha$ -Methylglycosid verwendet.



**Abb. 36** Synthese eines 4-Fluoroderivats von GalNAc

Methyl- $\alpha$ -D-GlcNAc **24** wurde nach Standardmethoden an Position 4 und 6 zuerst durch Verwendung von Benzaldehyddimethylacetal mit einer Benzyliden-Schutzgruppe versehen und anschließend an der verbleibenden Hydroxygruppe mit Benzylchlorid und Natriumhydrid benzyliert.<sup>264</sup> Das so schnell zugängliche Edukt **74** wurde selektiv nach Garegg<sup>265</sup> in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid (NaBH<sub>3</sub>CN) zum 4-OH-freien Produkt **75** geöffnet. Zur Erleichterung der Durchführung wurde anstelle einer gesättigten Lösung von HCl in Diethylether das Gas direkt in die Reaktionslösung eingeleitet und der pH-Wert konnte durch Zusatz einiger Tropfen Methylorange zum Reaktionsansatz kontrolliert werden.<sup>266</sup> Eine geeignete Abgangsgruppe wurde durch Zugabe von Trifluormethansulfonsäureanhydrid eingeführt und im Anschluss ohne Isolierung des Zwischenprodukts mit TBAT durch Fluorid substituiert (Abb. 36). Die Schwierigkeit der Fluorid-Substitution am Kohlenstoff-4 ist aus der unbefriedigenden Ausbeute von 37 % ersichtlich. Die axiale Orientierung des Fluorids wird im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum deutlich: das H-4-Signal zeigt eine Kopplung von 2.4 Hz zum H-3 und 50.7 Hz zum Fluorid. Zusätzlich zu den normalen Kopplungen mit den benachbarten Protonen bei der *galacto*-Konfiguration weist das H-3 eine spezifische Kopplung mit F-4 in Höhe von 28.0 Hz auf, bei einer äquatorialen Anordnung wäre diese nur ca. halb so hoch.<sup>267</sup> Die Abspaltung der Benzylgruppen erfolgte durch katalytische Hydrierung in Gegenwart von 10%igem Palladium auf Aktivkohle und ergab das 4-Fluorid **77**.

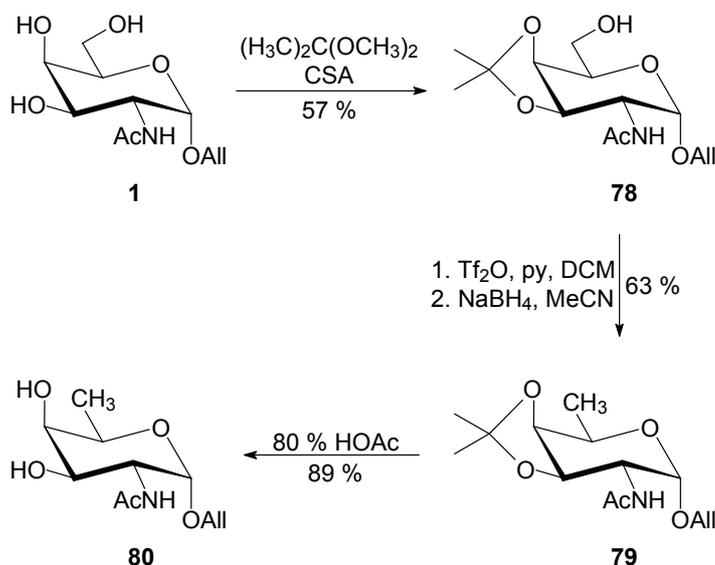
#### 4.4. Darstellung von FucNAc-Derivaten als Akzeptoren

Um die Bedeutung der primären Alkoholgruppe des Referenz-Akzeptors  $\alpha$ -Allyl-GalNAc **1** beurteilen zu können, bedarf es auch der Synthese des an Position 6 desoxygenierten Derivats Allyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-fucopyranosid (**80**). Während Substitutionsreaktionen am primären C-6 von Hexosen in der Regel ohne große Probleme durchgeführt werden können, kam es zu unerwarteten Schwierigkeiten bei Substitutionen von 6-Sulfonsäureestern der Galactopyranoside, die bei den entsprechenden *gluco*-konfigurierten Derivaten nicht auftraten.<sup>268,269</sup> Dies lässt sich durch ein polares Feld erklären, ausgehend von freien Elektronenpaaren am axialen O-4 und dem Ringsauerstoff, zwischen denen das C-6 mit seinem Substituenten liegt.<sup>270</sup> Verstärkt wird dies durch polare Abstoßungskräfte im Übergangszustand, in dem sich die polaren Bindungen zur Abgangsgruppe und dem angreifenden Nucleophil durch Rotation in einem 90 ° Winkel zu dem permanenten Dipol des Ringsauerstoffs ausrichten, damit dem axialen O-4 sehr nahe kommen und sich antiparallel zu dem Dipol zwischen C-4 und O-4 ausrichten.<sup>271</sup> Durch Verwendung neutraler Nucleophile lässt sich dieser Effekt minimieren.

Das 3,4-Dipivaloat **15**, eine Vorstufe von **1** (Abb. 19), ist bereits selektiv geschützt, so dass einer Modifikation der primären Alkoholgruppe nichts mehr im Wege stehen sollte. Die Bildung eines Sulfonsäureesters gefolgt von einer Reduktion würde die Darstellung des entsprechenden

FucNAc-Derivats **80** ermöglichen. Bei der Umsetzung mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid konnte allerdings keine Reaktion beobachtet werden, die Pivaloylgruppe am axialen C-4 scheint sterisch zu anspruchsvoll zu sein. Im Gegensatz dazu war zwar die Darstellung des 6-Triflats quantitativ möglich, die versuchte Reduktion mit Natriumborhydrid in Acetonitril führte aber nur zur Spaltung der Sauerstoff-Schwefel-Bindung durch einen Angriff des Hydrids am leichter zugänglichen Schwefelatom. Somit eignet sich das aus der Epimerisierung gewonnene 3,4-Dipivaloat nicht für die Desoxygenierung an Position 6.

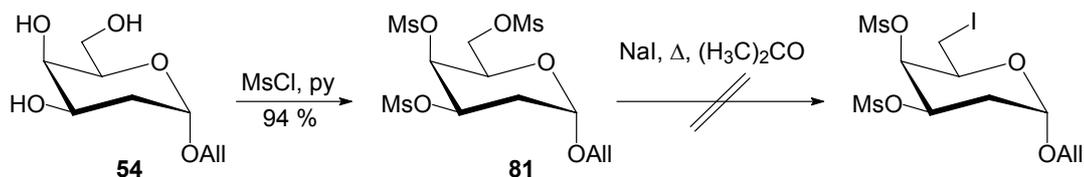
Paulsen *et al.* gelang nach Einführung einer Isopropylidengruppe in Position 3 und 4 und anschließender Umsetzung mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid die Reduktion der Triflylgruppe mit Natriumborhydrid.<sup>253</sup> Allerdings war in dieser Arbeit die Isopropylidenierung unter den beschriebenen Bedingungen – 1.5 Äquivalente 2,2-Dimethoxypropan in DMF bei 60 °C – nicht möglich, es konnte keine Umsetzung beobachtet werden. Hasegawa und Fletcher erhielten bei der Umsetzung von *N*-Acetyl-D-galactosamin unter diesen Bedingungen bei Raumtemperatur ausschließlich das 4,6-*O*-Isopropylidenderivat,<sup>272</sup> bei 80 °C entstand dagegen ein Gemisch aus eben diesem und dem 5,6-*O*-Isopropyliden-Furanosid.<sup>273</sup> Die Reaktion von  $\alpha$ -Allyl-GalNAc in reinem 2,2-Dimethoxypropan dagegen lieferte bei Raumtemperatur die thermodynamisch bevorzugte 3,4-Isopropylidenverbindung **78** neben 18 % des 4,6-geschützten Produkts (Abb. 37). Die Triflylgruppe wurde an der primären Alkoholgruppe eingeführt und anschließend direkt mit Natriumborhydrid reduziert. In 80%iger Essigsäure erfolgte die Abspaltung der Isopropylidengruppe und das Produkt  $\alpha$ -Allyl-FucNAc (**80**) konnte isoliert werden.



**Abb. 37** Darstellung von  $\alpha$ -Allyl-FucNAc (**80**)

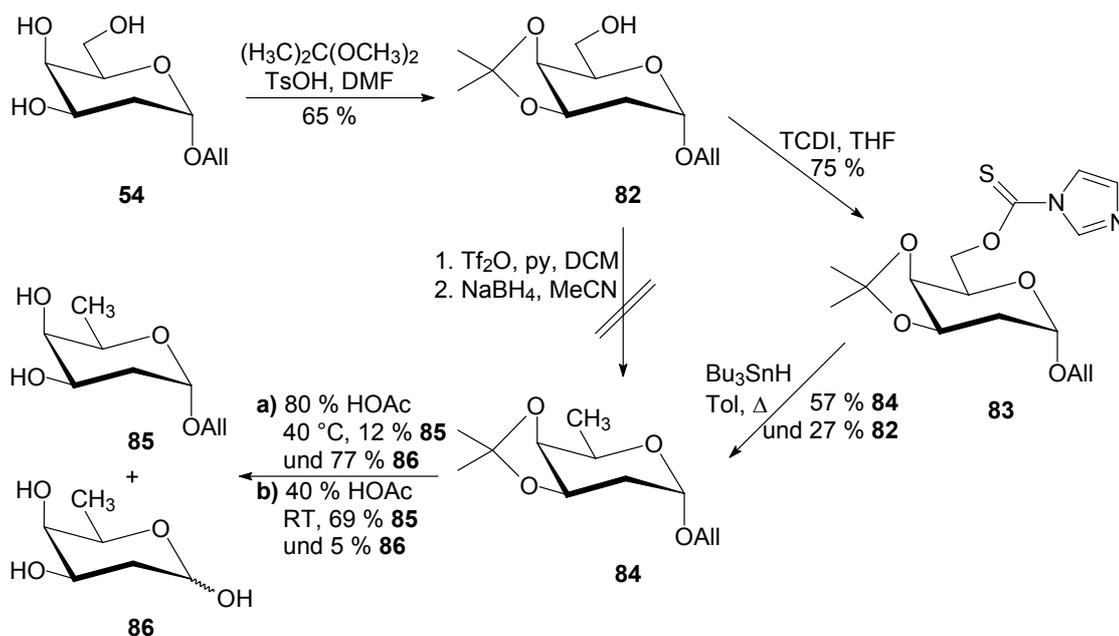
Die Darstellung des 2,6-Dideoxyderivats geht zweckmäßigerweise vom 2-Desoxyglycosid **54** aus, dessen geringere Stabilität im Vergleich zu der entsprechenden Hydroxy- oder Acetamidoverbindung bereits im Vorgehenden beschrieben wurde. Es ist bekannt, dass der

Reaktivitätsunterschied zwischen primären und sekundären Sulfonaten für selektive Substitutionen an Position 6 eines vollständig mit Mesylgruppen geschützten Zuckers ausgenutzt werden kann, z.B. für die Einführung eines Acetats oder Iodids, welches sich reaktiv desoxygenieren lässt.<sup>274</sup> Die Umsetzung von **54** mit Methansulfonsäurechlorid (MsCl) in Pyridin lieferte die vollständig geschützte Verbindung **81**, die weitere Reaktion mit Natriumiodid in Aceton<sup>275</sup> in der Siedehitze hatte jedoch nur umfangreiche Zersetzungsreaktionen zur Folge (Abb. 38).



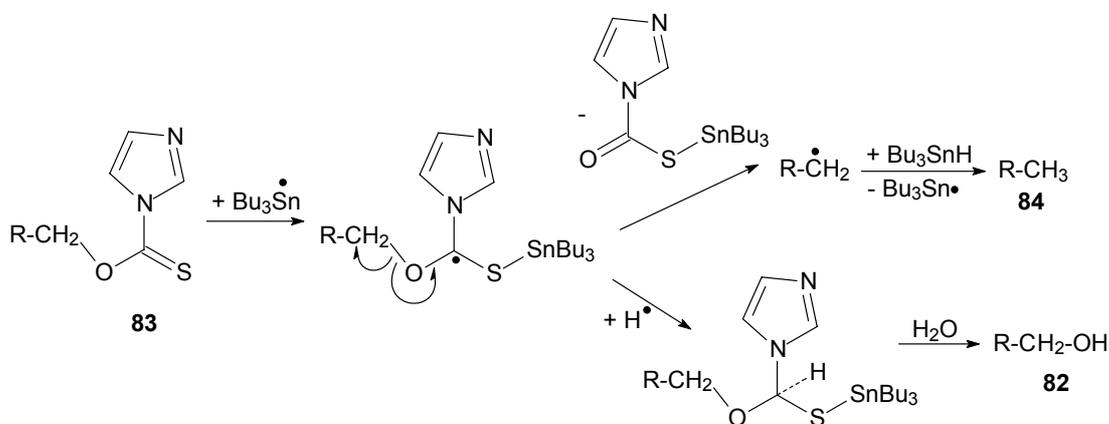
**Abb. 38** Versuch der selektiven Substitution mit Iodid

Die bei der Darstellung von  $\alpha$ -Allyl-FucNAc bereits erfolgreich angewandte Reaktionssequenz nach Paulsen<sup>253</sup> sollte deshalb auch für dieses Problem Anwendung finden. In diesem Fall konnte die Isopropylidengruppe in guter Ausbeute in Position 3 und 4 eingeführt werden, die regioisomere 4,6-*O*-Isopropylidenverbindung wurde nur in geringen Mengen gebildet. Die Konvertierung von **82** in das analoge Triflat erfolgte vollständig, bei der Umsetzung des Rohproduktes mit Natriumborhydrid wurde neben dem gewünschten Produkt bereits eine teilweise Zersetzung beobachtet. Bei der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes wurde das Lösungsmittel Acetonitril sehr vorsichtig im Eisbad abdestilliert, es verblieb aber nur ein schwarzer, teerartiger, in organischen Lösungsmitteln unlöslicher Rückstand (Abb. 39).



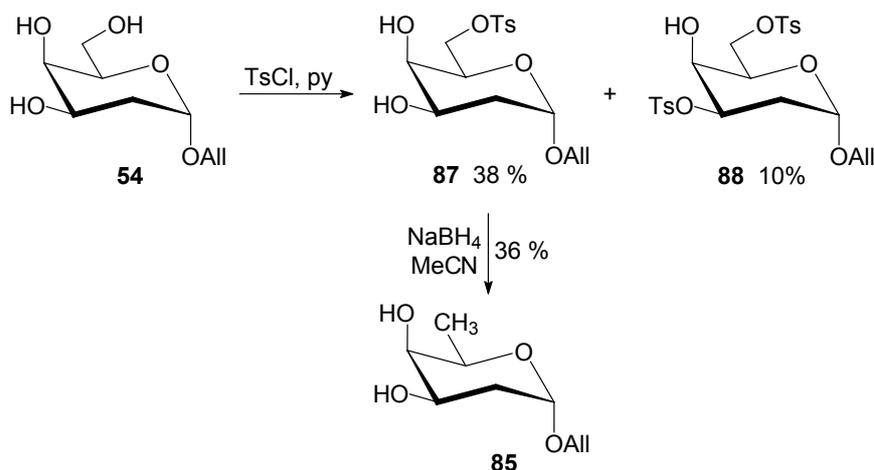
**Abb. 39** Darstellung von Allyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-fucopyranosid (**85**) über die 4,6-*O*-Isopropylidenverbindung **82**

Da die radikalische Reduktion einer Thiocarbonylimidazolgruppe mit Tributylzinnhydrid bereits bei der Darstellung des 2,4-Didesoxyderivats **73** sehr erfolgreich angewendet werden konnte und unter diesen Bedingungen weder Hydrolyse noch Eliminierung besonders begünstigt werden, sollte auch die Synthese der entsprechenden 2,6-Didesoxyverbindung ohne nennenswerte Zersetzung möglich sein. Radikalische Reaktionen verlaufen allerdings an sekundären Positionen wesentlich günstiger als an primären, so dass hier die Ausbeuten entsprechend niedriger ausfallen sollten. Das Thiocarbonylimidazolderivat **83** wurde in guten Ausbeuten isoliert. Unter den bekannten radikalischen Reduktionsbedingungen erwiesen sich die 2-Desoxyverbindungen als ausgesprochen stabil, so dass **84** in 57 % Ausbeute isoliert werden konnte. In einem erstem Schritt greift das Tributylzinn-Radikal am Schwefel von **83** an und es entsteht ein Zwischenprodukt mit einem radikalischen Kohlenstoff der ehemaligen Thiocarbonylgruppe (Abb. 40). Erfolgt eine homolytische Spaltung der C-6-O-Bindung, wird das desoxygenierte Produkt **84** gebildet. Als Konkurrenz kann stattdessen ein Wasserstoff-Radikal eingefangen werden und durch Hydrolyse bei der Aufarbeitung entsteht der ursprüngliche Alkohol **82**. Um die Fragmentierung zu bevorzugen wird das Edukt **83** in sehr hoher Verdünnung langsam zu einer Lösung aus Tributylzinnhydrid in Toluol zugetropft. Durch die geringe Stabilität des primären Radikals im Vergleich zu sekundären kommt es in diesem Fall nicht zur vollständigen Fragmentierung, so dass **82** wieder in 27 % Ausbeute isoliert wurde (Abb. 39). Bei Entfernung der Isopropylidengruppe aus **84** in 80%iger Essigsäure bei 40 °C konnte das gewünschte Produkt **85** aber nur in 12 % Ausbeute erhalten werden. Stattdessen kam es in einem erheblichen Ausmaß zu einer Spaltung der glycosidischen Bindung und 2-Desoxy-D-fucose **86** wurde als anomeres Gemisch in 77 % Ausbeute isoliert. Dies zeigt die große Hydrolyseempfindlichkeit der 2-Desoxyverbindungen im Gegensatz zu den analogen 2-Hydroxyderivaten ein weiteres Mal auf. Durch Optimierungsversuche konnte unter schonenderen Bedingungen, 40%iger Essigsäure bei Raumtemperatur, die Ausbeute an **85** auf 69 % gesteigert werden. Hierbei entstand **86** nur in 5 %.



**Abb. 40** Mechanismus der Barton-McCombie-Desoxygenierung. Die Reaktion beruht auf der Affinität des Zinnradikals für Schwefel, der Triebkraft durch Umwandlung einer Thiocarbonyl- in eine Carbonyl-Funktion und der schwachen Zinn-Wasserstoff-Bindung.

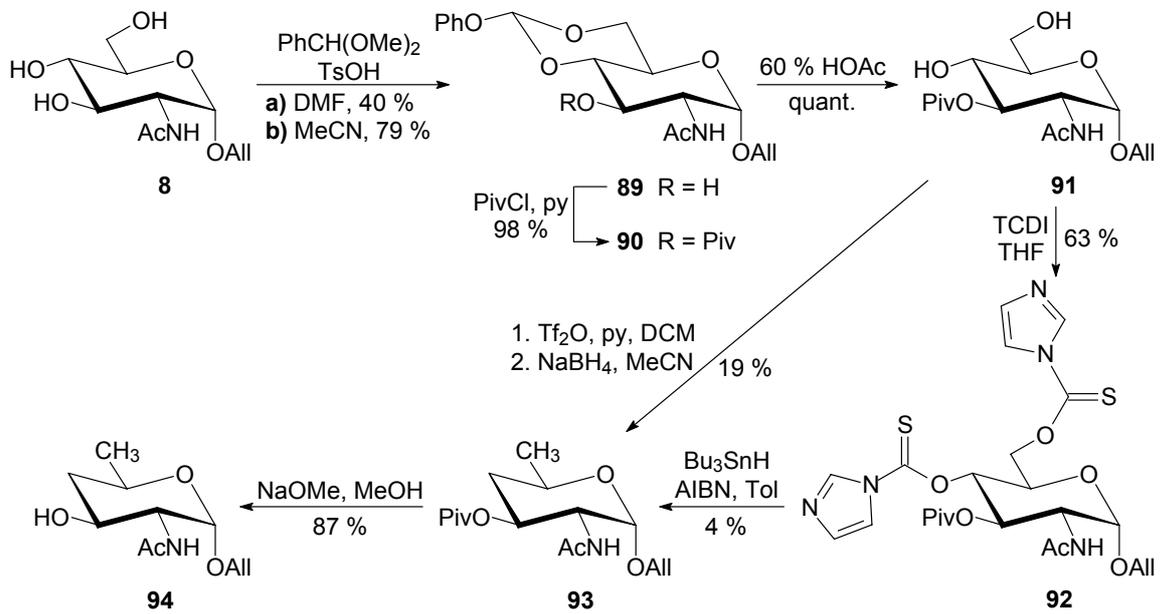
Bei der Behandlung von **54** mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid konnte das Mono-Tosylat **87** in einer Ausbeute von 38 % erhalten werden, neben bereits 10 % des 3,6-disubstituierten Produkts **88** (Abb. 41). Die Reduktion von **87** mit Natriumborhydrid eröffnete den schnellen Zugang zu **85**, die Ausbeute war auch bei diesem Schritt nur befriedigend, da im erheblichen Maße Zersetzungsreaktionen auftraten. Bei einem Versuch der Reduktion mit  $\text{LiAlH}_4$  in THF konnte kein an Position 6 reduziertes Produkt isoliert werden. Der Syntheseweg über das Tosylat **87** bietet eine schnelle Möglichkeit Verbindung **85** in befriedigenden Ausbeuten zu synthetisieren.



**Abb. 41** Alternativer Weg zur Darstellung von **85**

Als Ausgangsverbindung für die Darstellung des 4,6-Didesoxyderivats, die durch parallele Desoxygenierung zweier Hydroxygruppen und nicht in mehreren Schritten erfolgen soll, bedarf es einer nur an Position 3 geschützten Verbindung. Um dort eine Schutzgruppe selektiv einfügen zu können, bietet es sich an, die restlichen Hydroxygruppen vorher mit einer Benzyliden-Schutzgruppe zu blockieren. Die Umsetzung von  $\alpha$ -Allyl-GlcNAc mit Benzaldehyddimethylacetal in *N,N*-Dimethylformamid lieferte in Übereinstimmung mit Warren und Jeanloz **89** in nur 40 % Ausbeute.<sup>200</sup> Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen und unter Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel ließ sich die Reaktionsausbeute jedoch verdoppeln. Anschließende Acylierung mit Pivalinsäurechlorid und säurekatalysierte Abspaltung der Benzylidengruppe eröffnete den Zugang zum an Position 4 und 6 ungeschützten Produkt **91** (Abb. 42). Da die Desoxygenierung in Position 4 und auch 6 durch radikalische Reduktion der jeweiligen Thio-carbonylimidazolyle derivate möglich war, wurde durch Reaktion mit TCDI die disubstituierte Verbindung **92** dargestellt, die als sehr instabil erwies. Die anschließende Reduktion mit Tributylzinnhydrid und dem Radikalstarter 2,2'-Azobisobutyronitril (AIBN) erfolgte direkt im Anschluss, bedingt durch umfangreiche Zersetzungsreaktionen konnte das gewünschte Produkt aber nur in Spuren isoliert werden. Eine unbefriedigende, wenn auch deutlich bessere Ausbeute ermöglichte die Reduktion des Ditriflats mit Natriumborhydrid. Schon die Umsetzung von **91** mit  $\text{Tf}_2\text{O}$  lieferte ein Produktgemisch, welches sich auf Kieselgel komplett zersetzte, so dass es ohne Aufreinigung für die Reduktion eingesetzt werden musste. Die Entfernung der

Pivaloylgruppe gab den 4,6-Dideoxy-Akzeptor **94**, der für die späteren enzymatischen Untersuchungen eingesetzt werden soll.



**Abb. 42** Synthese von  $\alpha$ -Allyl-4,6-dideoxy-GalNAc (**94**) durch parallele Desoxygenierung

## 5. Chemoenzymatische Galactosylierungen

Die im vorhergehenden Kapitel beschriebenen modifizierten Derivate von *N*-Acetyl-D-galactosamin sollen chemoenzymatisch an Position 3 galactosyliert werden, um dem T-Antigen Gal $\beta$ 1-3GalNAc ähnliche Verbindungen zu erhalten. Hierzu stehen die  $\beta$ -Galactosidasen aus Rinderhoden, *Xanthomonas manihotis* und eine rekombinante  $\beta$ 1-3-Galactosidase aus *Bacillus circulans* (bgaC-Gen) sowie eine Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* zur Verfügung. Diese Umsetzungen bieten wichtige Einblicke in die Substratspezifität der genannten Enzyme.

Die Hydrolyse der  $\beta$ 1-3- und  $\beta$ 1-4-Regioisomere des Disaccharids Gal-GlcNAc erfolgt durch  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden (EC 3.2.1.23., 68 kDa) im Verhältnis 5:4, die der  $\beta$ 1-3- und  $\beta$ 1-6-Regioisomere von Gal-GalNAc im Verhältnis 16:1. György *et al.* führten erste synthetische Untersuchungen mit einem zellfreien Extrakt aus Rinderhoden durch und erhielten durch Inkubation mit Lactose als Donor die 3- und 4-galactosylierten Produkte von *N*-Acetyl-D-glucosamin im Verhältnis 10:1 in einer Ausbeute von nur 2,3 %.<sup>276</sup>  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden ist kommerziell erhältlich, aber aufgrund der hohen Kosten nicht für die präparative Chemie geeignet. Distler und Jourdian entwickelten 1973 ein Isolierungs- und Reinigungsverfahren, mit dem alle anderen Hydrolasen und sämtliche Proteasen, die als Verunreinigung vorhanden sind, abgetrennt werden können.<sup>177,277</sup> Ein vereinfachtes Protokoll dieser Methode ohne Affinitätschromatographien wurde später eingeführt, welches zu einem Rohextrakt mit hinreichender Reinheit für präparative Ansätze führt.<sup>168</sup> Es gelingt auf diese Art und Weise allerdings nicht eine  $\beta$ -Hexosaminidase zu entfernen, die die  $\beta$ -glycosidische Bindung von *N*-Acetyl-D-glucosamin oder -galactosamin hydrolysiert. Diese Derivate eignen sich also nicht als Akzeptoren für die Transglycosylierung.

Die  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden wurde als Rohextrakt oder als reines Enzym bereits mehrfach für synthetische Zwecke verwendet. Eine systematische Untersuchung ihrer Spezifität erfolgte bisher jedoch nicht, so dass die einzelnen Ergebnisse nicht unbedingt miteinander vergleichbar sein müssen. Besonders das Donor-Akzeptor-Verhältnis unterscheidet sich häufig zwischen verschiedenen Untersuchungen, ein Vergleich unterschiedlicher Akzeptoren kann aus diesem Grund sehr leicht mit einem erheblichen Fehler behaftet sein. Bis auf sehr wenige Ausnahmen<sup>168</sup> erfolgt die Galactosylierung von GalNAc-Akzeptoren regioselektiv an Position 3,<sup>278-281</sup> im Falle von GlcNAc gibt es jedoch sowohl Berichte über eine ausschließliche Reaktion an dieser Position<sup>280</sup> als auch über die Bildung von Gemischen aus  $\beta$ 1-3- und  $\beta$ 1-4-verknüpften Produkten.<sup>172,282</sup>

Mehrere Isolierungen aus schlachtfrischen Rinderhoden ergaben z.T. deutlich unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich spezifischer Aktivität und dem Gehalt an  $\beta$ -Hexosaminidase (Tab. 1). Eine Untersuchung über den Zusammenhang Rasse, Alter, Ernährung, Verabreichung von

Medikamenten, evtl. Jahreszeit und der resultierenden spezifischen Aktivität wäre von Interesse. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Galactosylierungen wird ausschließlich das Enzym aus Eintrag 4 verwendet, um eventuelle Verfälschungen von vornherein auszuschließen. Der deutlich herausfallende Wert des Eintrages 1 muss nicht am Alter des Bullen liegen, besondere Ernährungszusätze, Krankheit aber auch ein Fehler während der Extraktion können nicht ausgeschlossen werden, da es sich um einen Einzelfall handelt. Während sich dieser Rohextrakt aus Isolierung 1 nicht für  $\beta$ -Galactosylierungen eignet, sollte das Potential der  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität für präparative Umsetzungen untersucht werden. Hierbei wurden Methylglycoside von *N*-Acetyl-D-glucosamin und -galactosamin, D-Glucose, D-Galactose, D-Mannose, Lactose, Maltose und niedere Chitooligomere als Akzeptoren eingesetzt. Allerdings konnte unter Verwendung des Donors *p*-Nitrophenyl-2-acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid trotz dessen Hydrolyse kein Glycosyltransfer auf einen Mono- oder Disaccharid-Akzeptor beobachtet werden.

	<b>Gewicht</b> <b>Rinderhoden</b> <b>[g]</b>	<b>Alter des</b> <b>Bullen</b> <b>[Monate]</b>	<b>Aktivität</b> <b><math>\beta</math>-Galactosidase</b> <b>[U/g Lyophilisat]</b>	<b>spezifische Aktivität</b> <b><math>\beta</math>-Galactosidase</b> <b>[U/g Protein]</b>	<b>spezifische Aktivität</b> <b><math>\beta</math>-Hexosaminidase</b> <b>[U/g Protein]</b>
1	523	15	0.13	0.53	31.8
2	486	18	47.7	98.7	39.3
3	270	23	39.0	113.5	28.2
4	300	23	50.1	144.1	25.9

**Tab. 1** Spezifische Aktivitäten bei mehreren Extraktionen aus Rinderhoden

Als Donor für die enzymatische Galactosylierung fand *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (*p*NP-Gal) Anwendung, das bei der Transglycosylierung und der Hydrolyse intensiv gelb gefärbtes *p*-Nitrophenol (*p*NP-OH) freisetzt. Durch dessen photometrische Bestimmung lässt sich sehr exakt die Menge an bereits umgesetztem *p*NP-Gal quantifizieren. Die Hydrolysegeschwindigkeit von *p*NP-Gal durch die  $\beta$ -Galactosidase konnte auf diese Art und Weise unter verschiedenen Reaktionsbedingungen verglichen werden und erlaubte so eine einfache Reaktionsoptimierung. Modifiziert wurden dazu pH-Wert, Temperatur, Menge und Art etwaiger Cosolventien und antimikrobielle Zusätze. Eine Variation des pH-Wertes in Schritten von 0.5 Einheiten in Phosphat-Puffer zeigte ein starkes Abfallen der Hydrolysegeschwindigkeit für einen pH-Wert von unter 3.5 und über 5.5, im Bereich um einen pH-Wert von 4.0-4.5 befindet sich ein Maximum. Abgesehen von der physiologischen Temperatur (37 °C) wurde die Hydrolyse auch bei 30 und bei 45 °C untersucht. Während bei 30 °C bereits eine Verlangsamung der Reaktion zu beobachten war, wurde die Anfangsgeschwindigkeit bei 45 °C erhöht, nach fünf Stunden Reaktionsdauer war aber nur noch eine geringe Enzymaktivität feststellbar. Die Zugabe von 10 % (v/v) organischer Cosolventien wie Dimethylsulfoxid (DMSO), *N,N*-Dimethylformamid (DMF), Acetonitril oder Aceton führte zu drastischen Einbrüchen in der Reaktionsgeschwindigkeit, 10 % (v/v) *tert*-Butanol hatten dagegen nur leichte Einbußen zur Folge. Der Zusatz von Natriumazid (0.02 % w/v) hatte keinen Einfluss auf die Reaktion. Hieraus

resultierten die optimalen Reaktionsbedingungen für die Hydrolyse von *p*NP-Gal bei 37 °C in McIlvaine-Puffer (50 mM, pH 4.3, 0.02 % NaN<sub>3</sub>) ohne Zusatz von Cosolventien.

Das Gram-negative pathogene Bakterium *Xanthomonas manihotis* enthält acht Exoglycosidasen, unter ihnen eine  $\beta$ -Galactosidase (EC 3.2.1.23, Familie GH35, 66 kDa), die bevorzugt  $\beta$ 1-3-Verknüpfungen hydrolysiert.<sup>283</sup> Es gelang die Gene für dieses Enzym zu klonieren und in *Escherichia coli* zu exprimieren;<sup>284</sup> mittlerweile ist die rekombinante  $\beta$ -Galactosidase kommerziell erhältlich (New England Biolabs). Die Glycosidase-Familie GH35 ist recht divers aufgebaut, besteht vorwiegend jedoch aus retendierenden  $\beta$ -Galactosidasen eukaryotischen Ursprungs. Eine große Ähnlichkeit der Gensequenz konnte mit lysosomalen  $\beta$ -Galactosidasen vom Menschen und der Maus festgestellt werden. Mechanistische und strukturelle Untersuchungen mit dem Enzym aus *Xanthomonas manihotis* sollten somit einen Beitrag für das Verständnis der menschlichen  $\beta$ -Galactosidase und ihrer Störungen ermöglichen. Durch Inkubation mit einem 2-Desoxy-2-fluoro-D-galactopyranosid gelang es bereits, Glu260 als katalytisches Nucleophil zu identifizieren.<sup>285</sup> Untersuchungen über das Synthesepotential der  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* wurden bisher aber nicht durchgeführt, nur von vereinzelten Anwendungen wurde berichtet: Während der Akzeptor GlcNAc ausschließlich in Position 3 in 22%iger Ausbeute galactosyliert wird, entstehen bei Verwendung von GalNAc die  $\beta$ 1-3- und  $\beta$ 1-6-verknüpften Regioisomere im Verhältnis 7:3 mit einer ähnlichen Gesamtausbeute von 25 %.<sup>286,287</sup>

Bei Variation des pH-Wertes zeigte das Enzym ein recht breites Aktivitätsmaximum zwischen 5.0 und 6.5, bei dem vom Hersteller empfohlenen pH von 4.5 war die Hydrolysegeschwindigkeit etwas niedriger. Der Zusatz von DMSO, DMF oder Aceton wurde nicht toleriert, ein Gehalt von 10 % (v/v) Acetonitril oder 20 % (v/v) *tert*-Butanol hatte aber keinen nennenswerten Einfluss auf die Aktivität. Als optimale Temperatur hatte sich auch hier 37 °C ergeben, bei 45 °C erfolgte z.T. bereits die Denaturierung des Enzyms. Ein recht deutlicher positiver Effekt wurde bei der Zugabe von etwas BSA (Rinderserumalbumin, 0.05 % w/v) beobachtet. Anwendung für die späteren Umsetzungen findet daher ein Natriumacetat-Puffer (100 mM, pH 5.5, 0.05 % BSA) mit 10 % (v/v) Acetonitril bei 37 °C.

Ito und Sasaki beobachteten 1997 in *Bacillus circulans* (Mutante ATCC 31382) drei  $\beta$ -Galactosidasen, die beiden im kommerziell erhältlichen Biolacta<sup>TM</sup> enthaltenen  $\beta$ -Galactosidasen I und II, sowie ein bisher nicht bekanntes neues Enzym. Es gelang ihnen das für diese neue  $\beta$ -Galactosidase relevante *bgaC*-Gen zu klonieren und in *Escherichia coli* zu exprimieren.<sup>288</sup> Während die Gensequenz der neuen  $\beta$ -Galactosidase (EC 3.2.1.23, Familie GH35, 67 kDa) kaum Ähnlichkeiten mit ihren beiden Isozymen aufweist, scheint eine sehr enge Verwandtschaft zu den  $\beta$ -Galactosidasen aus *Xanthomonas manihotis* (57 %), dem Menschen (42 %) und anderen tierischen Quellen zu bestehen. Sehr auffallend ist ihre ausgesprochene Bevorzugung der Hydrolyse von  $\beta$ 1-3-verknüpfter Galactose und die Möglichkeit diese Bindung auch

regioselektiv durch Transglycosylierung herzustellen.<sup>289-291</sup> Die kommerzielle  $\beta$ -Galactosidase Biolacta™ hydrolysiert selektiv die  $\beta$ 1-4-Bindung und gibt auch entsprechend diese  $\beta$ 1-4-Produkte bei der chemoenzymatischen Glycosylierung.<sup>161</sup>

Die  $\beta$ 1-3-Galactosidase aus *Bacillus circulans* (bgaC-Gen) wurde von K. Ajisaka zur Verfügung gestellt. Das Enzym erwies sich als stabil in Natriumacetat-Puffer in einem pH-Bereich von 4.5-6.0 und in Kaliumphosphat-Puffer von 6.0-8.5, wobei das Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von 5.5 bis 6.0 liegt. Der Zusatz von 20 % (v/v) DMF, Acetonitril oder *tert*-Butanol beeinträchtigte die Hydrolyse nicht, die Anwesenheit von DMSO oder Aceton erwies sich jedoch als störend. Die größte Reaktionsgeschwindigkeit konnte bei 60-65 °C beobachtet werden, bei diesen Temperaturen verliert das Enzym aber sehr schnell seine Aktivität, wohingegen bei 50 °C kein nennenswerter Aktivitätsverlust nach fünf Stunden erfolgte. Als optimale Reaktionsbedingungen sind deshalb 20 % (v/v) DMF in Kaliumphosphat-Puffer (100 mM, pH 6.0) bei 50 °C zu bezeichnen. Spätere Umsetzungen bei dieser Temperatur führten mit den relativ empfindlichen GalNAc-Derivaten schnell zu Zersetzungsprodukten, so dass die chemoenzymatische Galactosylierung ebenfalls bei 37 °C durchgeführt wird, ohne die Reaktion übermäßig zu verlangsamen.

*Bifidobacterium bifidum* tritt im menschlichen Darmtrakt auf und enthält mehrere Enzyme, die Mucin abbauen können. Aus der Mutante *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 konnte die non-Leloir Glycosyltransferase  $\beta$ 1-3-Galactosyl-*N*-acetylhexosamin-Phosphorylase isoliert werden, die spezifisch an Position 3 galactosyliertes GlcNAc und GalNAc in Galactose-1-phosphat und das entsprechende *N*-Acetylhexosamin spaltet.<sup>292</sup> Bei ihr handelt es sich bisher um die einzige Phosphorylase, die einen terminalen Galactoserest erkennt.<sup>293</sup> In der umgekehrten Reaktion konnten *N*-Acetyl-D-galactosamin und -glucosamin, sowie mehrere  $\alpha$ -Glycoside von GlcNAc regioselektiv mit Galactose-1-phosphat an Position 3 galactosyliert werden.<sup>294</sup> Bei dem verwendeten Enzym handelt es sich um ein zellfreies Rohextrakt, welches als Verunreinigung eine  $\beta$ -Hexosaminidase enthält. Da von dem Rohextrakt, von S. Bouquelet dankenswerterweise zur Verfügung gestellt, nur eine begrenzte Menge vorhanden war, wurde auf eine Optimierung der Reaktionsbedingungen verzichtet und stattdessen die bereits erfolgreich verwendete Umsetzung mit 1.2 Äquivalenten Akzeptor in Imidazol-Puffer (25 mM, pH 6.8, 37 °C, 20 h) durchgeführt. Ferner konnte dieses Enzym nicht für die Galactosylierung aller zur Verfügung stehender Akzeptoren angewendet werden. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, dass die Vergrößerung der Phosphorylaseansätze über 1 mL mit einer erheblichen Verringerung der Ausbeute einhergeht. Aus diesem Grunde wurde die Reaktion in mehreren kleinen Gefäßen parallel durchgeführt, die zur Aufarbeitung vereinigt wurden.

Der Verlauf der Transglycosylierungen ließ sich dünnschichtchromatographisch verfolgen, etwaige Produkte konnten nach Filtration durch einen Membranfilter und „mixed-bed“ Ionenaustauscher per Maldi-Tof massenspektrometrisch erfasst oder per HPLC analysiert werden.

### 5.1. Chemoenzymatische Galactosylierung von GalNAc-Akzeptoren mit unterschiedlichen Aglycon-Strukturen

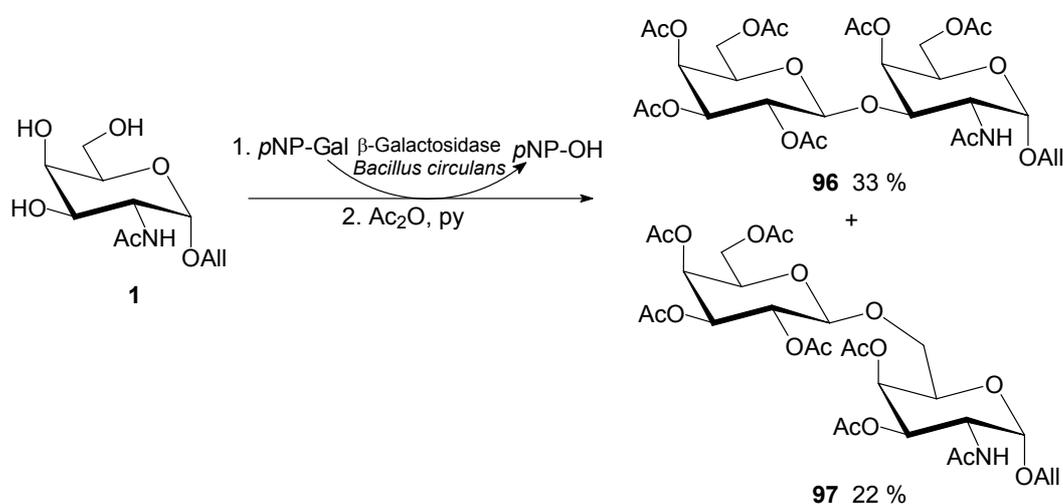
Anhand des Referenz-Akzeptors  $\alpha$ -Allyl-GalNAc **1** wurden die bei der Hydrolyse ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen auf die Transglycosylierung mit *p*NP-Gal übertragen. Hierbei galt es ein ideales Donor-Akzeptor-Verhältnis und den Zeitpunkt der Reaktionsführung, bei dem ein Produktmaximum vorliegt, zu ermitteln. Es wurden jeweils die Umsetzungen mit einem Verhältnis Donor zu Akzeptor 1.5:1, 1:1.5, 1:3 und 1:10 in regelmäßigen Abständen untersucht. Der Fortschritt der Reaktion ließ sich durch HPLC mit UV-Detektion quantitativ erfolgen, aber auch die Entstehung der Hydrolyse- und etwaiger Nebenprodukte konnte so verfolgt werden. Um eine solide Quantifizierung der Transglycosylierung zu ermöglichen und somit die optimalen Reaktionsbedingungen zu ermitteln, wurde mit mehreren bekannten Konzentrationen des Produkts Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -OAll (**95**) kalibriert. Die Ausbeuten der weiter unten behandelten präparativen Umsetzungen beziehen sich allerdings ausnahmslos auf isoliertes Produkt. Bei den präparativen Galactosylierungen gelang es in der Regel einen Großteil des nicht-umgesetzten Akzeptors, der im Überschuss verwendet wird, zurückzugewinnen.

Ein Donorüberschuss von 1.5:1 führte bei allen verwendeten Hydrolasen zur teilweisen Glycosylierung des Donors *p*NP-Gal oder seines Hydrolyseprodukts D-Galactose. Durch einen Überschuss an Akzeptor konnten diese Nebenreaktionen fast vollständig zurückgedrängt werden. Die Steigerung des Akzeptorüberschusses auf 10:1 hatte bei der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden eine deutliche Steigerung der Ausbeute (bezogen auf *p*NP-Gal) zur Folge, bei den beiden anderen Galactosidasen konnte keine nennenswerte Veränderung der Reaktion zu dem Verhältnis 3:1 beobachtet werden. Bei Umsetzungen mit den  $\beta$ -Galactosidasen aus Rinderhoden und *Xanthomonas manihotis* war ein breites Maximum der Produktbildung bei 48-55 Stunden Reaktionsdauer zu beobachten, so dass die Reaktion bei den folgenden synthetischen Umsetzungen bei beiden nach 50 Stunden abgebrochen wurde. Im Vergleich zu literaturbekannten Umsetzungen<sup>286,287</sup> mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* wurde eine größere Menge an Enzym und eine zehnmal längere Reaktionsdauer benötigt. Das Produktmaximum bei der  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* war bereits nach 4½ Stunden erreicht, danach überwog die Hydrolyse des Produkts. Bei Einsatz von *tert*-Butanol als Cosolvens konnte in allen Fällen eine geringe Bildung eines weiteren Produkts beobachtet werden, vermutlich durch die enzymatische Galactosylierung von *tert*-Butanol.

Bei der Transglycosylierung mit den  $\beta$ -Galactosidasen aus *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans* trat ein weiteres Disaccharid mit Acetamidogruppe auf, bei dem es sich wahrscheinlich um ein Regioisomer von **95** handelte. Im ersten Fall entstand es nur in kleinen Mengen (ca. 10 % von **95**), im zweiten Fall war die Bildung aber erheblich. In Analogie zur von Larsson *et al.* entwickelten *in situ*-Hydrolyse des unerwünschten Regioisomeren wurde der Reaktionsansatz nach der entsprechenden Reaktionszeit um den Faktor zehn mit Natriumacetat-Puffer (50 mM,

pH 7.0) verdünnt.<sup>168,173</sup> Nach Zugabe der  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli*, mit einer ausgeprägten Spezifität für die Hydrolyse einer  $\beta$ 1-6-Verknüpfung, wurde die Reaktionslösung bei 37 °C inkubiert, bis das störende Nebenprodukt laut HPLC vollständig hydrolysiert war. Um eine Zersetzung des relativ empfindlichen  $\beta$ 1-3-verknüpften Produkts zu vermeiden, muss der Reaktionsansatz vor Denaturierung des Enzyms bei 90 °C wieder leicht angesäuert (pH 4.3) werden.

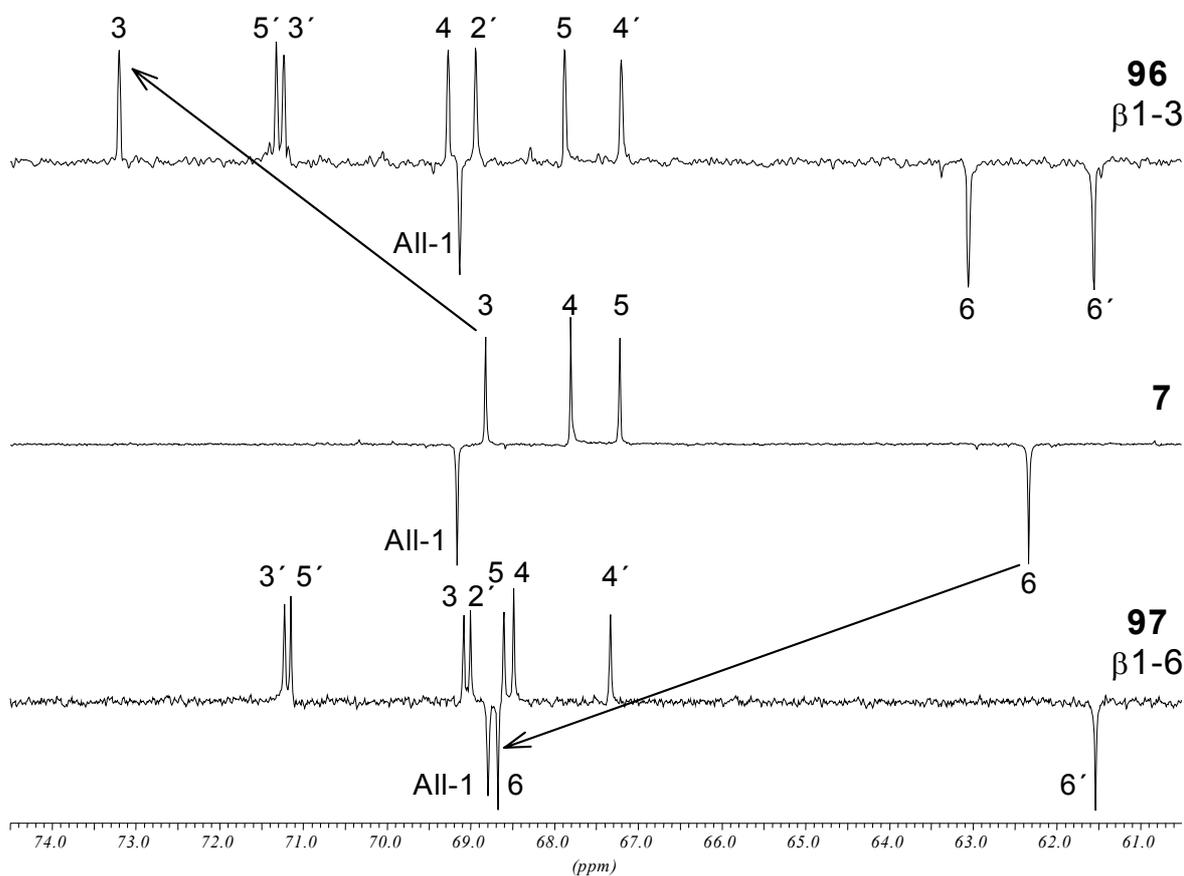
Um das gebildete Nebenprodukt, welches bei der Umsetzung mit  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* oder aus *Bacillus circulans* entsteht, zu identifizieren, wurde ein Inkubationsansatz aus *p*NP-Gal und  $\alpha$ -Allyl-GalNAc (**1**) mit dem Enzym aus *Bacillus circulans* behandelt, ohne dass eine anschließende Hydrolyse durchgeführt wurde. Zur Trennung der beiden entstandenen Regioisomeren wurde das freigewordene *p*-Nitrophenol extrahiert und der gefriergetrocknete Rückstand über eine Biogel P-2 Säule gereinigt. Die Disaccharid enthaltenden Fraktionen wurden unter Standardbedingungen acetyliert. Nach Reinigung konnten das  $\beta$ 1-3- und das  $\beta$ 1-6-verknüpfte Produkt in Ausbeuten von 33 bzw. 22 % isoliert werden (Abb. 43). Diese niedrige Regioselektivität steht im deutlichen Gegensatz zu den bisher bekannten Ergebnissen analoger Verbindungen, bei denen in ähnlich hoher Ausbeute nur die Position 3 galactosyliert wurde.<sup>289,290</sup>



**Abb. 43** Umsetzung mit  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* ohne anschließende Hydrolyse

Eine Glycosylierung bewirkt im allgemeinen eine Verschiebung des  $^{13}\text{C}$ -Signals der Akzeptor-Position um 4-10 ppm zu tieferem Feld, was als erster Hinweis auf den Ort der neu gebildeten Verknüpfung angesehen werden kann. Im direkten Vergleich (Abb. 44) ist sehr schön zu sehen, wie das C-3 der  $\beta$ 1-3-verknüpften Verbindung im Vergleich zum entsprechenden Signal von Allyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**7**) zu tieferem Feld verschoben wird. Entsprechendes kann für die Resonanz des C-6 von **97** gesehen werden. Eine sichere Aussage über die Position der neu gebildeten Verknüpfung kann durch HMBC-NMR-

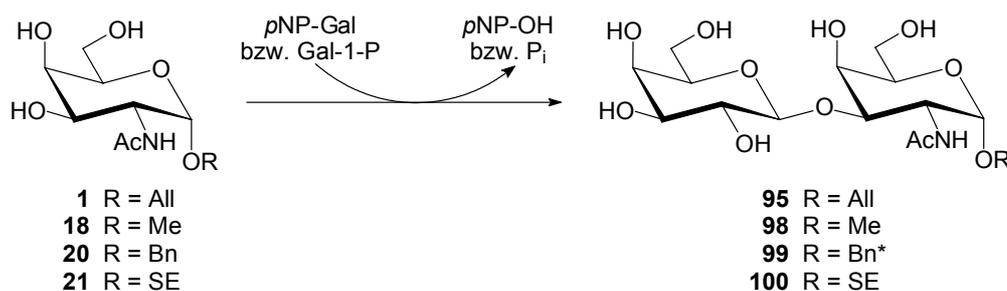
Experimente getroffen werden, die „Long-Range-Kopplungen“ zwischen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kerne über zwei oder drei Bindungen aufzeigen. Dementsprechend ist in den HMBC-NMR-Spektren eine Kreuzkopplung über drei Bindungen zwischen C-1' und H-3 (**96**) bzw. den beiden H-6 (**97**) zu beobachten. Auf diese Weise lassen sich alle folgenden Transglycosylierungsprodukte eindeutig charakterisieren.



**Abb. 44** Gegenüberstellung der chemischen Verschiebungen im  $^{13}\text{C}$ -Pendant-NMR-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$  der  $\beta$ 1-3- (**96**, oben) und  $\beta$ 1-6-verknüpften (**97**, unten) Disaccharide im Vergleich zu Allyl-2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**7**) (Mitte)

Die chemoenzymatische Galactosylierung der Allyl-, Methyl-, Benzyl- und 2-(Trimethylsilyl)ethyl- $\alpha$ -glycoside von GalNAc (**1**, **18**, **20** und **21**) in Gegenwart der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden erfolgte in allen Fällen regioselektiv ausschließlich an der jeweiligen Position 3 des Akzeptors (Abb. 45). Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 90 °C beendet, das freigesetzte *p*-Nitrophenol nach Abkühlen mit Ethylacetat extrahiert und die wässrige Phase gefriergetrocknet. Bei der folgenden Gelpermeationschromatographie an Biogel P-2 ermöglichte die Verwendung von Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (0.25 M) eine wesentlich bessere Trennung der Produkte von den Edukten. Die letzten Spuren an Edukt ließen sich anschließend mit einer zweiten Biogel-Säule mit Wasser als Eluent abtrennen. Da auf dieser Stufe immer noch Phosphat aus dem Reaktionspuffer IR-spektroskopisch ( $1072\text{ cm}^{-1}$ ) nachgewiesen werden konnte, wurde das gefriergetrocknete Produkt in etwas Wasser aufgenommen und zur vollständigen Entsalzung durch eine Ionenaustauschersäule („mixed-bed“) filtriert.

Die Ausbeute der Galactosylierung von  $\alpha$ -Allyl-GalNAc **1** mit  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden konnte durch Optimierung der Reaktionsbedingungen von 22 %<sup>280</sup> auf sehr gute 67 % gesteigert werden. Diese chemoenzymatische Darstellung des Disaccharids **95** ist allen bisher publizierten klassischen Methoden<sup>48,182,295</sup> an Einfachheit, Effizienz und Gesamtausbeute deutlich überlegen. Die regioselektive Galactosylierung von  $\alpha$ -Methyl-GalNAc (**18**) verlief ähnlich erfolgreich, die entsprechenden Benzyl- und 2-(Trimethylsilyl)-ethylglycoside **20** respektive **21** wurden dagegen nur in etwas geringeren Ausbeuten umgesetzt (Abb. 45). Als Grund kann sehr wahrscheinlich nicht die Erkennung durch das Enzym, sondern die deutlich schlechtere Wasserlöslichkeit durch die unpolaren Aglycon-Strukturen angesehen werden. Die Reaktion musste deshalb in Suspension durchgeführt werden; eine Verdünnung des Ansatzes bis zur homogenen, klaren Lösung erniedrigte die Ausbeuten an Galactosylierungsprodukt dagegen erheblich. Das Reaktionsgemisch zur Darstellung von **99** war derart schlecht wasserlöslich, dass eine wässrige Gel-permeationschromatographie nicht möglich war. Nach Extraktion des freigesetzten *p*-Nitrophenols wurde der Rückstand deshalb direkt acetyliert und gereinigt, so dass **101** in einer Ausbeute von 41 % erhalten wurde.

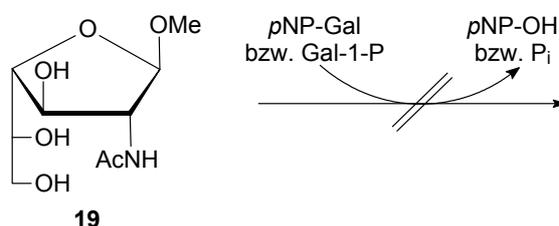


Enzymquelle	Donor	Akzeptor	Produkt	Ausbeute [%]
Rinderhoden	<i>p</i> NP-Gal	<b>1</b>	<b>95</b>	67
		<b>18</b>	<b>98</b>	66
		<b>20</b>	<b>99</b>	41*
		<b>21</b>	<b>100</b>	47
<i>Xanthomonas manihotis</i>	<i>p</i> NP-Gal	<b>1</b>	<b>95</b>	21
		<b>18</b>	<b>98</b>	24
		<b>20</b>	<b>99</b>	16*
		<b>21</b>	<b>100</b>	19
<i>Bacillus circulans</i>	<i>p</i> NP-Gal	<b>1</b>	<b>95</b>	34
		<b>18</b>	<b>98</b>	33
		<b>20</b>	<b>99</b>	38*
		<b>21</b>	<b>100</b>	35
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Gal-1-P	<b>1</b>	<b>95</b>	43
		<b>18</b>	<b>98</b>	44
		<b>20</b>	<b>99</b>	18*
		<b>21</b>	<b>100</b>	23

**Abb. 45** Chemoenzymatische Galactosylierung der Allyl-, Methyl-, Benzyl- und 2-(Trimethylsilyl)-ethyl- $\alpha$ -glycoside von GalNAc. \* Isoliert als Peracetat **101**

Sehr ähnliche Ergebnisse konnten bei der Umsetzung der Akzeptoren mit Galactose-1-phosphat in der Gegenwart der Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* beobachtet werden. Auf den Extraktionsschritt konnte verzichtet werden, weil bei diesem Donor Phosphat freigesetzt wird und nicht *p*-Nitrophenol. Die Ausbeuten waren insgesamt etwas niedriger (Abb. 45), da die Reaktion aber in einer deutlich höheren Verdünnung erfolgte, konnte die schlechtere Wasserlöslichkeit von **20** und **21** nur einen geringen Einfluss haben. Vermutlich machen sich hier entweder sterische Effekte bei der Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms bemerkbar oder die Bindungstasche ist polar ausgelegt und behindert so die Erkennung der recht unpolaren Akzeptoren.

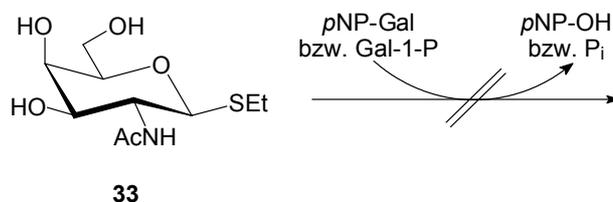
Bei Verwendung der  $\beta$ -Galactosidasen aus *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans* lagen die Ausbeuten der gewünschten  $\beta$ 1-3-verknüpften Produkte unabhängig von der Aglycon-Struktur enger beieinander. Während die Bildung eines Nebenprodukts beim erstgenannten Enzym aber nur in sehr geringen Mengen erfolgte, tritt sie bei der  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* in erheblichem Umfang auf; trotzdem waren die Ausbeuten hier immer noch höher. Im Allgemeinen kann das Transglycosylierungspotential der  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* als vergleichsweise niedrig bezeichnet werden. Bei beiden Enzymen wurde das gebildete Nebenprodukt nach Beendigung der Transglycosylierung durch die  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli* hydrolysiert (Abb. 45). Der Vergleich der Glycosylierung von  $\alpha$ -Allyl-GalNAc mit dem Enzym aus *Bacillus circulans* mit und ohne anschließende Hydrolyse zeigt, dass die Ausbeute des  $\beta$ 1-3-verknüpften Produkts (**95** bzw. **96**) in beiden Fällen gleich ist, die Hydrolyse also selektiv nur das an Position 6 galactosylierte Nebenprodukt abgebaut hat. Auf diese Weise kann ein bei der Transglycosylierung unspezifisches Enzym durch ein bei der Hydrolyse spezifisches für die chemoenzymatische Synthese nutzbar gemacht werden. Ajisaka *et al.* gelang im Gegensatz zu diesen Ergebnissen die regioselektive Galactosylierung von **18** und **20** an Position 3 mit derselben rekombinanten  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* in Ausbeuten von 53 bzw. 62 %, über die Beobachtung eines Nebenprodukts berichteten sie nicht.<sup>290</sup>



**Abb. 46**  $\beta$ -Furanosid **19** als Akzeptor

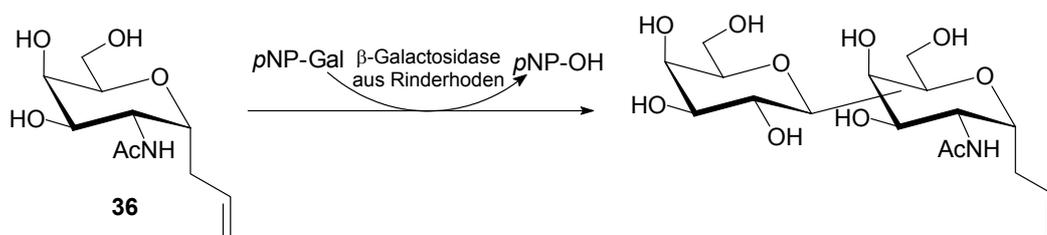
Das bei der Fischer-Glycosylierung von *N*-Acetyl-D-galactosamin erhaltene  $\beta$ -Methyl-furanosid **17** wurde ebenfalls mit den vorhandenen Enzymen inkubiert. Die räumliche Anordnung der Funktionalitäten in der furanoiden Konfiguration unterscheidet sich dermaßen von den bisher untersuchten  $\alpha$ -Pyranosiden, dass in keinem Fall eine Transglycosylierung beobachtet werden konnte, die Hydrolyse der jeweiligen Donoren wurde jedoch nicht beeinflusst.

Thioglycoside fanden trotz ihrer großen Bedeutung in der Kohlenhydratchemie als latente Glycosyldonoren bisher nur vereinzelt Anwendung als Akzeptoren bei chemoenzymatischen Untersuchungen. Streicher konnte mit  $\beta$ 1-4-Galactosyltransferase einen Galactosylrest auf verschiedene Thioglycoside übertragen.<sup>296</sup> Ferner gelang Larsson *et al.* mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden die Galactosylierung von  $\beta$ -Thioethyl-GlcNAc in mäßigen Ausbeuten,<sup>173</sup> wohingegen Distler und Jourdian bei  $\beta$ -Thioglycosiden allgemein inhibitorische Eigenschaften feststellen konnten.<sup>277</sup> Über die anderen hier verwendeten Enzyme gibt es bisher keine Berichte mit Thioglycosiden als Akzeptoren. Die Inkubation des  $\beta$ -Thioglycosids **33** mit den verschiedenen Enzymen – allerdings ohne Zusatz eines entsprechenden Donors – führte nicht zu seiner Hydrolyse, es ist also kein Substrat für die kontaminierenden  $\beta$ -Hexosaminidasen in den Rohextrakten. Es scheint aber auch die gewünschten Glycosidasen und die Phosphorylase zu inhibieren, da mit allen Enzymen die Hydrolyse des jeweiligen Donors sehr stark verlangsamt wurde und keine Produktbildung zu ermitteln war.



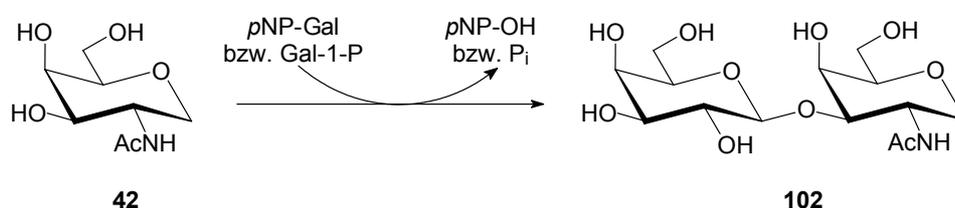
**Abb. 47** Versuchte Galactosylierung eines Thioglycosids

Da von dem C-glycosidischen Akzeptor **36** nur sehr geringe Mengen zur Verfügung standen, wurde die chemoenzymatische Umsetzung mit dem bisher aktivsten Enzym, der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden, durchgeführt. Der Akzeptor wurde laut dünnschichtchromatographischer Untersuchung nur in sehr geringen Ausbeuten erkannt und per Maldi-Tof konnte eine Galactosylierung auch massenspektrometrisch bestätigt werden, das Produkt lag aber nur in Spuren vor und konnte nicht isoliert werden. C-Glycoside sind somit potentiell als Enzymakzeptoren geeignet, für weitergehende Untersuchungen besteht aber Bedarf an verschiedenen möglichen Akzeptor-Strukturen in präparativen Mengen.



**Abb. 48** C-Glycosid **36** als Akzeptor

Mit einem Galactitol als Akzeptor, dem jedwede Aglycon-Struktur fehlt, lässt sich sehr gut die Bedeutung des Aglycons auf chemoenzymatische Galactosylierungen hinsichtlich Ausbeute und Regioselektivität untersuchen. Hierbei können keine Effekte durch das Aglycon auf die Bindung in der aktiven Tasche des Enzyms auftreten. Die Umsetzung mit den Enzymen aus Rinderhoden oder *Bifidobacterium bifidum* zeigte keine Auswirkungen der fehlenden Aglycon-Struktur auf Ausbeute oder Regioselektivität, in beiden Fällen entsprachen sie den Ergebnissen mit den Methyl- und Allylglycosiden (Abb. 49). Bei Verwendung der  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* lag die Ausbeute zwar im Bereich der bisher untersuchten Akzeptoren, aber die Bildung eines größeren Anteils Nebenprodukt als in den anderen Fällen konnte beobachtet werden. Wahrscheinlich fehlen hier günstige sterische oder hydrophobe Wechselwirkungen der Aglycon-Struktur in der Bindungstasche des Enzyms, die eine Orientierung zur Galactosylierung der Position 3 bevorzugen.



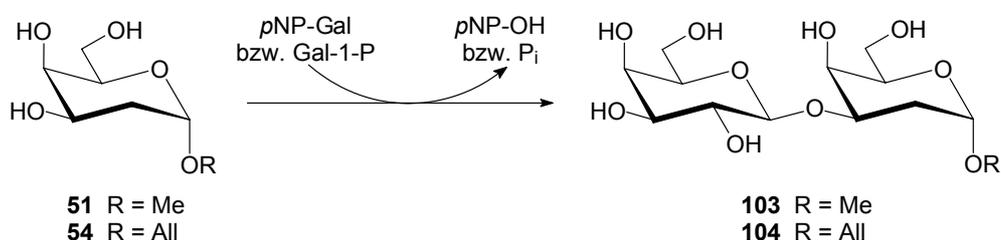
Enzymquelle	Donor	Ausbeute [%]
Rinderhoden	<i>p</i> NP-Gal	70
<i>Xanthomonas manihotis</i>	<i>p</i> NP-Gal	19
<i>Bacillus circulans</i>	<i>p</i> NP-Gal	31
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Gal-1-P	41

**Abb. 49** Glycosylierung des Galactitols **42**

Bereits bei der Untersuchung unterschiedlicher *O*-Glycoside konnte bei der  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* entgegen den anderen Enzymen eine Bevorzugung des  $\alpha$ -Benzyl-GalNAc **20** beobachtet werden (Abb. 45). Möglicherweise befindet sich im aktiven Zentrum des Enzyms eine hydrophobe Tasche, die besonders gut den Benzylrest binden kann. Beim Galactitol **42** fehlt dieses hydrophobe Aglycon und die Bindung an das Enzym erfolgte weniger gut, so dass eine leicht niedrigere Ausbeute an **102** erhalten wurde. Allerdings ist die Schwankungsbreite der Ausbeuten im Vergleich zum Referenz-Akzeptor **1** doch recht gering, dramatische Einflüsse treten also nicht auf.

## 5.2. Enzymatische Umsetzungen mit Akzeptoren ohne Acetamido-Funktion

Umfangreiche Untersuchungen von Gonzales Lio zur Bedeutung der Acetylgruppe als Substituent der 2-Aminofunktion zeigen, dass selbst geringfügige Modifikationen zu den entsprechenden *N*-Chloracetyl- oder *N*-Propionylderivaten eine Erkennung durch die  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden vollständig verhindern.<sup>297</sup> Die Entfernung der Acetamido-Funktion zu 2-Desoxyglycosiden führt dagegen nur zu einer Beeinträchtigung der Bindung durch das Enzym und damit zu niedrigeren Ausbeuten, ohne eine Transglycosylierung komplett zu verhindern. Dies konnte bereits bei der Umsetzung des Akzeptors **54** mit dem Enzym aus Rinderhoden gezeigt werden.<sup>280</sup> Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gelang durch Optimierung der Reaktionsbedingungen eine deutliche Steigerung der dort berichteten Ausbeute von 15 auf sehr gute 42 % für das Produkt **104**.

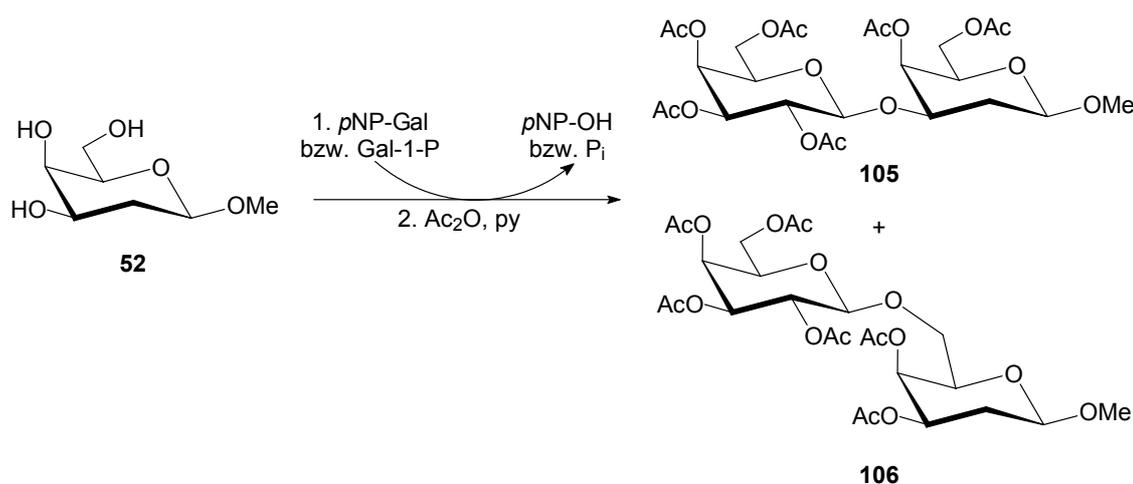


Enzymquelle	Donor	Akzeptor	Produkt	Ausbeute [%]
Rinderhoden	<i>p</i> NP-Gal	<b>51</b>	<b>103</b>	(21) <sup>298</sup>
		<b>54</b>	<b>104</b>	42
<i>Xanthomonas manihotis</i>	<i>p</i> NP-Gal	<b>51</b>	<b>103</b>	13
		<b>54</b>	<b>104</b>	13
<i>Bacillus circulans</i>	<i>p</i> NP-Gal	<b>51</b>	<b>103</b>	11
		<b>54</b>	<b>104</b>	8
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Gal-1-P	<b>51</b>	<b>103</b>	14
		<b>54</b>	<b>104</b>	15

**Abb. 50** Chemoenzymatische Galactosylierung von 2-Desoxy- $\alpha$ -glycosiden

In allen untersuchten Galactosylierungen fielen durch die Entfernung der Acetamido-Funktion unabhängig von der Natur des  $\alpha$ -konfigurierten Aglycons die Ausbeuten deutlich zurück. Der Rückgang erfolgte im geringeren Maße bei den  $\beta$ -Galactosidasen aus Rinderhoden und *Xanthomonas manihotis*, bei denen die Ausbeute immer noch bei zwei Drittel der entsprechenden Acetamidoverbindung lag. Deutlicher fiel dies bei den *Bacillus circulans* und *Bifidobacterium bifidum* Enzymen aus, bei denen eine Verringerung der Ausbeute auf ein Drittel des ursprünglichen Niveaus auftrat (Abb. 50). Das Fehlen der Acetamido-Funktion hatte mit Ausnahme der Umsetzung mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*, bei der in diesem Fall die Bildung eines regioisomeren Nebenprodukts nicht nachgewiesen werden konnte, keinen Einfluss auf die Regioselektivität der Reaktion.

Wie bereits bei der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden beobachtet,<sup>280</sup> wurde die anomere Mischung der reduzierenden 2-Desoxy-D-galactose von keinem der Enzymen als Akzeptor erkannt. Methyl-2-desoxy- $\beta$ -D-galactopyranosid (**52**) erwies sich in Gegenwart aller getesteten Enzyme als relativ hydrolysestabil, interessante Ergebnisse wurden aber bei der Transglycosylierung beobachtet. Während die Phosphorylase mit bekannter Regioselektivität nur die Position 3 galactosylierte, entstanden bei den  $\beta$ -Galactosidasen Regioisomerengemische aus  $\beta$ 1-3- und  $\beta$ 1-6-verknüpften Produkten. Für weitere Untersuchungen wurden diese nicht durch die  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli* hydrolysiert, sondern nach Acetylierung säulenchromatographisch in die Produkte **105** und **106** getrennt (Abb. 51). Besonders ausgeprägt wirkte sich die Inversion der anomeren Konfiguration auf die  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden aus, die mit dem 2-Desoxy- $\alpha$ -glycosid nur das an Position 3 galactosylierte Produkt ergibt,<sup>298</sup> mit dem entsprechenden 2-Desoxy- $\beta$ -glycosid dagegen zusätzlich noch das  $\beta$ 1-6-verknüpfte Produkt im Verhältnis 2:1. Nilsson beobachtete erstmals einen Einfluss der anomeren Konfiguration und Struktur auf die Regioselektivität bei enzymatischen Glycosylierungen,<sup>171</sup> da es sich hierbei aber in aller Regel um Einzelfälle handelt, sind Vorhersagen über die Auswirkung der Inversion am anomeren Zentrum bisher nicht möglich.

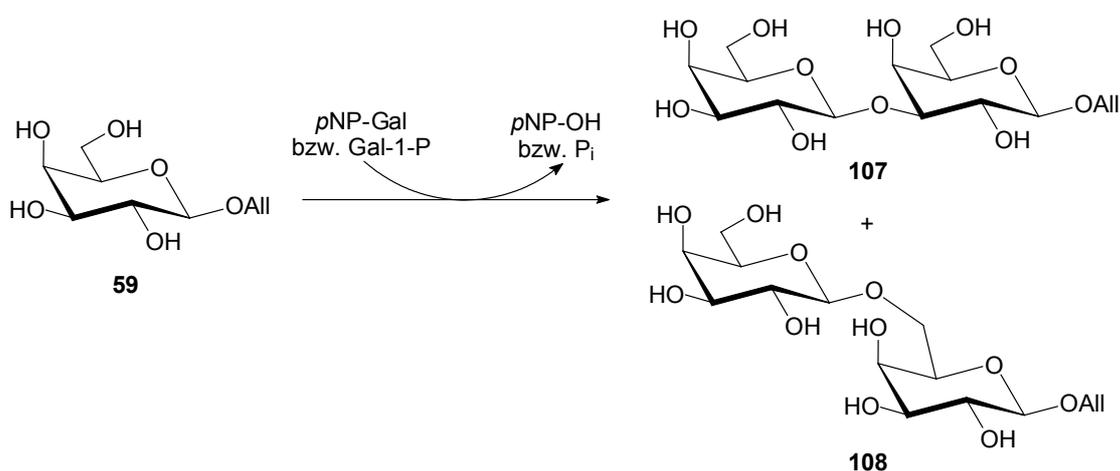


Enzymquelle	Donor	Ausbeute [%]	
		<b>105</b>	<b>106</b>
Rinderhoden	pNP-Gal	17	9
Xanthomonas manihotis	pNP-Gal	11	2
Bacillus circulans	pNP-Gal	19	12
Bifidobacterium bifidum	Gal-1-P	13	---

**Abb. 51** Regioisomerengemisch bei der Glycosylierung von **52**

Bei der Umsetzung von Allylalkohol oder 2-(Trimethylsilyl)-ethanol mit Lactose in der Gegenwart einer  $\beta$ -Galactosidase werden nicht nur die  $\beta$ -Alkylglycoside erhalten, sondern auch ca. 1 % höher galactosylierter Produkte.<sup>150</sup> Aktivierte Donoren wie pNP-Gal werden wesentlich schneller hydrolysiert als  $\beta$ -Alkylglycoside, so dass ihre Transglycosylierung auch in Konkurrenz zur

Hydrolyse des Akzeptors möglich sein sollte, wenn dieser im deutlichen Überschuss vorliegt. Bei Inkubation der  $\beta$ -Alkylglycoside **59** und **60** in der Abwesenheit eines Donors konnte zwar eine offensichtliche Hydrolyse beobachtet werden, nach der Standardreaktionszeit lag aber immer noch über die Hälfte des Akzeptors unverändert vor. Bei Umsetzung von  $\beta$ -Allyl-Gal **59** mit dem Donor *p*NP-Gal waren die Ausbeuten zwar durchwegs schlechter als bei den 2-Acetamido-derivaten, eine Transglycosylierung konnte aber trotzdem beobachtet werden (Abb. 52).

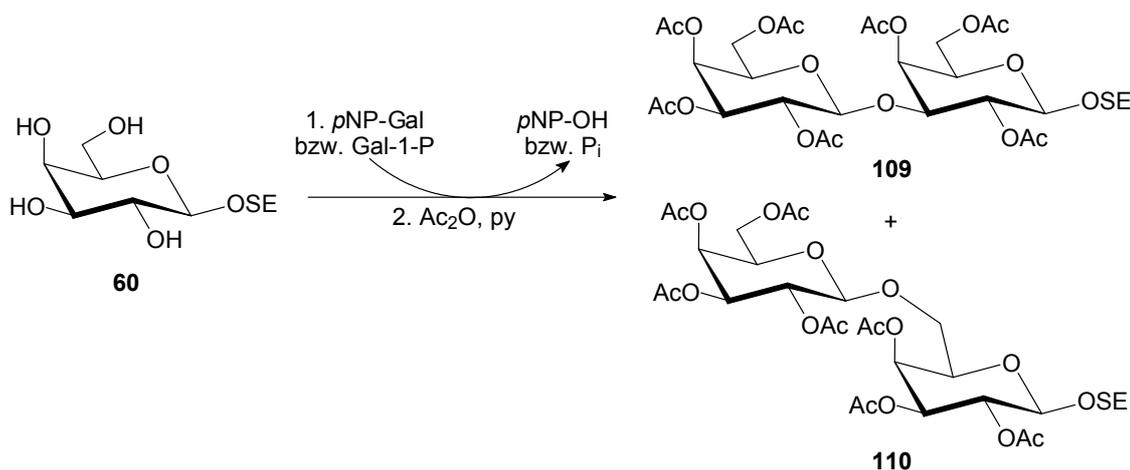


Enzymquelle	Donor	Ausbeute [%]	
		107	108
Rinderhoden	<i>p</i> NP-Gal	11	8
<i>Xanthomonas manihotis</i>	<i>p</i> NP-Gal	4	---
<i>Bacillus circulans</i>	<i>p</i> NP-Gal	10	5
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Gal-1-P	---	---

**Abb. 52** Galactosylierung von  $\beta$ -Allyl-Gal

Wie schon beim Akzeptor **52** zeigte sich die  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden nicht mehr regio-spezifisch und es wurden erhebliche Mengen des  $\beta$ 1-6-verknüpften Produkts erhalten, die Gesamtausbeute war mit 19 % für ein hydrolyseanfälliges  $\beta$ -Alkylglycosid als Akzeptor aber zu vertreten. Die Regioisomere konnten ohne weiteres an Biogel P-2 getrennt werden, eine Acetylierung des Gemisches war nicht nötig. Ähnliches gilt auch für das Enzym aus *Bacillus circulans*, wohingegen die  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* nur das  $\beta$ 1-3-verknüpfte Disaccharid in einer recht niedrigen Ausbeute lieferte. In beiden Fällen wurde auf den Hydrolyseschritt mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli* verzichtet. Da erhebliche Mengen des Akzeptors während der Transglycosylierung hydrolysiert wurden, wären weitere Zugaben im Verlauf der Reaktion wahrscheinlich von Vorteil für die Gesamtausbeute. Da der Akzeptor aber nur im begrenzten Maße zurückgewonnen werden konnte, ist diese Vorgehensweise nicht effizient. Auffallend ist, dass die Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum*  $\beta$ -Allyl-Gal nicht galactosyliert hat (Abb. 52).

Bei Verwendung von 2-(Trimethylsilyl)-ethyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (**60**) als Akzeptor fielen die Ausbeuten hinter denen des  $\beta$ -Allylglycosids **59** zurück und die Produkte wurden zur Aufarbeitung acetyliert und gereinigt (Abb. 53). Vermutlich war die niedrigere Ausbeute durch den hydrophoberen Charakter der 2-(Trimethylsilyl)-ethylgruppe bedingt. Auch in diesem Fall erkannte die Phosphorylase den Akzeptor nicht, die Hydroxygruppe in Position 2 scheint eine Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms zu verhindern.

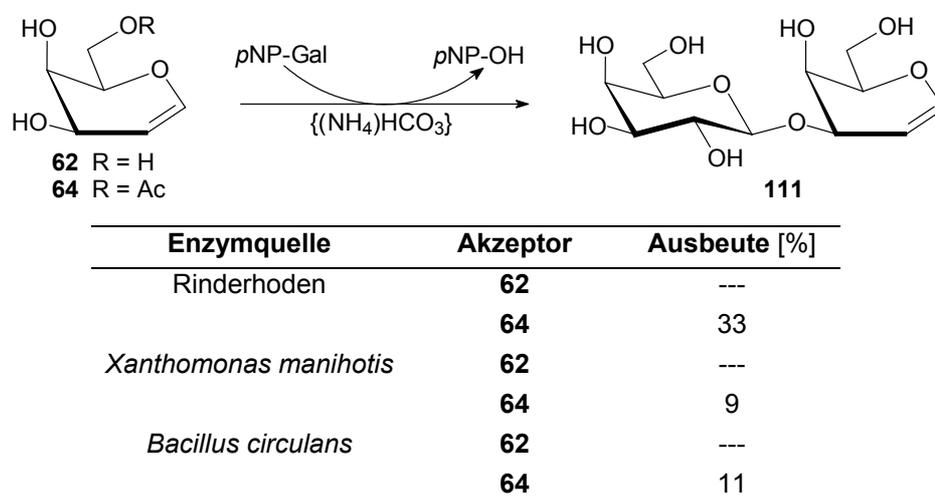


Enzymquelle	Donor	Ausbeute [%]	
		109	110
Rinderhoden	pNP-Gal	3	9
<i>Xanthomonas manihotis</i>	pNP-Gal	3	---
<i>Bacillus circulans</i>	pNP-Gal	9	7
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Gal-1-P	---	---

**Abb. 53** Chemoenzymatische Glycosylierung von **60**

Bei Verwendung der  $\beta$ -Galactosidasen aus *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans* war kein nennenswerter Unterschied zum Akzeptor **59** zu bemerken (auch hier wird auf den Hydrolyseschritt verzichtet), die  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden bevorzugte bei der Galactosylierung von **60** jedoch die Position 6 gegenüber der Position 3. Durch den sterisch anspruchsvolleren und hydrophoberen 2-(Trimethylsilyl)-ethylrest wurde hier noch deutlicher, dass der Akzeptor mit einem äquatorialen Substituenten am anomeren Zentrum nicht mehr wie gewohnt in die Bindungstasche des Enzyms passt.  $\alpha$ -Alkylgalactoside dagegen werden von der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden selektiv in Position 3 galactosyliert,<sup>299</sup> die verringerte Regioselektivität scheint also an der anomeren Konfiguration und nicht an der 2-Hydroxygruppe zu liegen. Da durch die Verunreinigung des Rohextrakts mit einer  $\beta$ -Hexosaminidase nur  $\alpha$ -Glycoside von 2-Acetamidozuckern verwendet werden konnten, ist dies bisher nicht aufgefallen. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass die Ausbeuten und Regioselektivitäten für die präparative Darstellung von *galacto*-Disacchariden unbefriedigend waren.

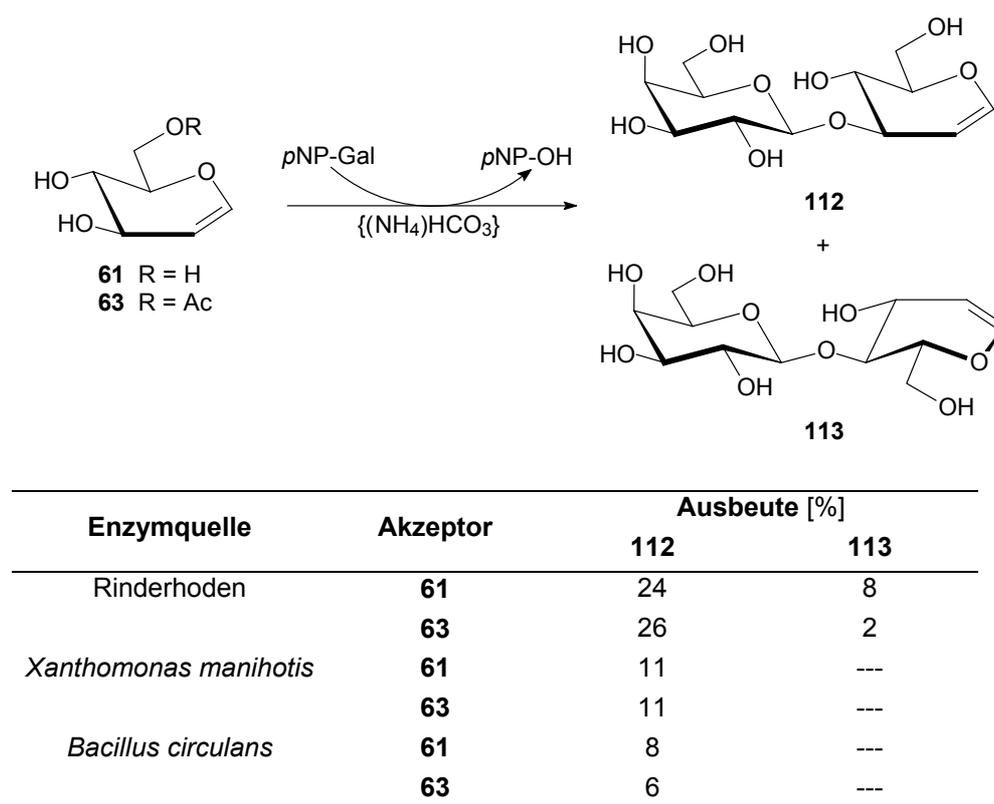
Disaccharidglycale stellen interessante Zwischenstufen bei der Darstellung komplexer natürlicher und unnatürlicher Oligosaccharide dar.<sup>241</sup> An Position 2 kann durch Azidonitratisierung<sup>186</sup> oder Epoxidierung mit anschließender Öffnung<sup>300</sup> eine Amino- bzw. Hydroxy-Funktion eingeführt werden. 2-Desoxyglycoside können mittels der NIS-Methode<sup>234</sup> oder *cis*-Addition<sup>237</sup> an die Doppelbindung erhalten werden. Ferner eröffnen Glycale den Zugang zu Oligosacchariden mittels Ferrier-Umlagerung.<sup>232</sup> D-Galactal wurde von keiner der verwendeten Hydrolasen als Akzeptor erkannt, der Donor *p*NP-Gal wurde sehr langsam ohne Bildung von Transglycosylierungsprodukten hydrolysiert. Allerdings fiel auf, dass bei Inkubation mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden ein Großteil des D-Galactals in eine neue Verbindung überführt wurde, die nach Isolierung als 2-Desoxy-D-galactose identifiziert werden konnte. In einem Blindversuch in Abwesenheit des Enzyms erfolgte keine Addition von Wasser, sie wurde demnach durch die  $\beta$ -Galactosidase verursacht.



**Abb. 54** D-Galactal (**62**) und sein 6-Acetat **64** als Akzeptoren

Wong *et al.* umgingen die inhibitorischen Eigenschaften von D-Galactal auf die  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli*, indem sie die primäre Hydroxygruppe selektiv acetylierten.<sup>244</sup> In Analogie hierzu gelang es ihnen auch den Akzeptor D-Glucal regiospezifisch an Position 3 zu galactosylieren und die Bildung des  $\beta$ 1-6-verknüpften Produkts zu unterbinden.<sup>240</sup> Dieser Ansatz konnte mit Erfolg auf die hier verwendeten  $\beta$ -Galactosidasen zur regioselektiven Darstellung des  $\beta$ 1-3-verknüpften Galactal-Disaccharids übertragen werden, eine Galactosylierung der primären Funktion des Glycals war aufgrund ihrer Blockierung durch eine Acetylgruppe nicht möglich (Abb. 54). Während der Reinigung per Gelpermeationschromatographie an Biogel P-2 wurde durch die Verwendung von Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (0.25 M) als Eluent die Acetatgruppe an Position 6 abgespalten und das komplett entschützte Produkt **111** erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit war die Entschützung durchaus gewollt, besteht für eine spätere Fortführung der Synthese jedoch Bedarf an dieser Schutzgruppe, kann die Spaltung durch Verzicht auf den basischen Puffer vermieden werden. Die Ausbeute von 33 % bei Verwendung der Glycosidase aus Rinderhoden ist sehr gut, die beiden anderen Enzyme zeigten jedoch eine geringere Aktivität (Abb. 54).

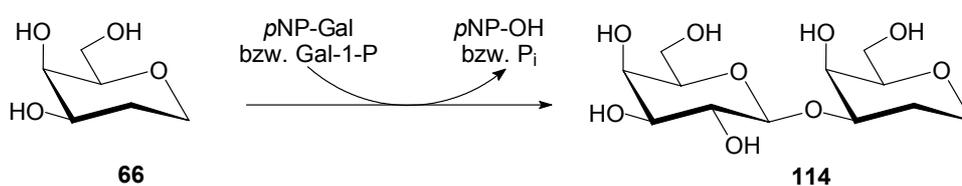
Die Umsetzung von D-Glucal (**61**) und seinem 6-Acetat **63** in Gegenwart der Glycosidasen aus *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans* erfolgte analog zu **64**. Das an Position 3 galactosylierte Glucal wurde regiospezifisch, allerdings in unbefriedigenden Ausbeuten erhalten, ein abschließender Hydrolyseschritt war nicht notwendig (Abb. 55). Die Galactosylierung von D-Glucal mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden verlief auch hier in wesentlich besseren Ausbeuten, nur wurde auch die äquatoriale Hydroxygruppe in Position 4 galactosyliert und die  $\beta$ 1-3- und  $\beta$ 1-4-verknüpften Disaccharideglycale **112** respektive **113** konnten im Verhältnis 3:1 isoliert werden.



**Abb. 55** Chemoenzymatische Galactosylierung von D-Glucal (**61**) und seinem 6-Acetat **63**

Der 6-acetylierte Akzeptor **63** ergab bei Inkubation mit dem Enzym aus Rinderhoden ebenfalls ein Regioisomerenmischung (13:1), das Verhältnis wurde aber eindeutig zu Gunsten des an Position 3 galactosylierten Glucals verschoben. Die Einführung der Acetylgruppe in Position 6 scheint die äquatoriale Position 4 etwas abzuschirmen und dessen Galactosylierung zu behindern. Die beiden Produkte ließen sich an Biogel P-2 trennen, die Acetatgruppe wurde durch das basische Laufmittel auf der Säule abgespalten (Abb. 55). Bei Verwendung von D-Fucal als Akzeptor wurde der Donor  $pNP-Gal$  hydrolysiert, eine Produktbildung konnte aber mit keiner Glycosidase beobachtet werden.

Der 1,2-Didesoxy-Akzeptor **66** wurde von allen verwendeten Enzymen erkannt (Abb. 56). Die Ausbeuten bewegten sich zwischen denen der 1- und den 2-Desoxyglycoside, ein akkumulierter Effekt konnte also nicht beobachtet werden. Auffällig war die sehr gute Ausbeute mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden, die nur geringfügig unter den Akzeptoren mit Acetamido-Funktion liegt, aber deutlich über den nur an Position 2 desoxygenierten Verbindungen. Möglicherweise kann der Akzeptor **66** tiefer in die Bindungstasche des Enzyms eindringen und wird deshalb effektiver glycosyliert. Die Ausbeuten der anderen Enzyme waren nur leicht besser als die der 2-Desoxyglycoside. Bei Verwendung der  $\beta$ -Galactosidasen aus *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans* entstand ein Nebenprodukt, welches durch die *Escherichia coli*-Glycosidase hydrolysiert werden konnte.

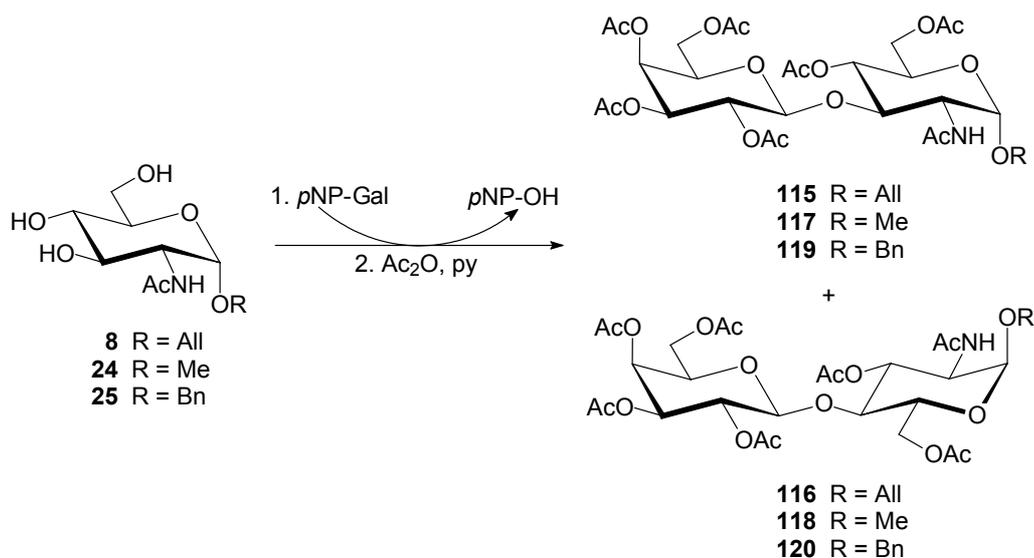


Enzymquelle	Donor	Ausbeute [%]
Rinderhoden	pNP-Gal	61
<i>Xanthomonas manihotis</i>	pNP-Gal	18
<i>Bacillus circulans</i>	pNP-Gal	13
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Gal-1-P	19

**Abb. 56** Galactosylierung des 1,2-Didesoxyderivats **66**

### 5.3. Einfluss der Modifikationen an Position 4 auf die Enzymerkennung

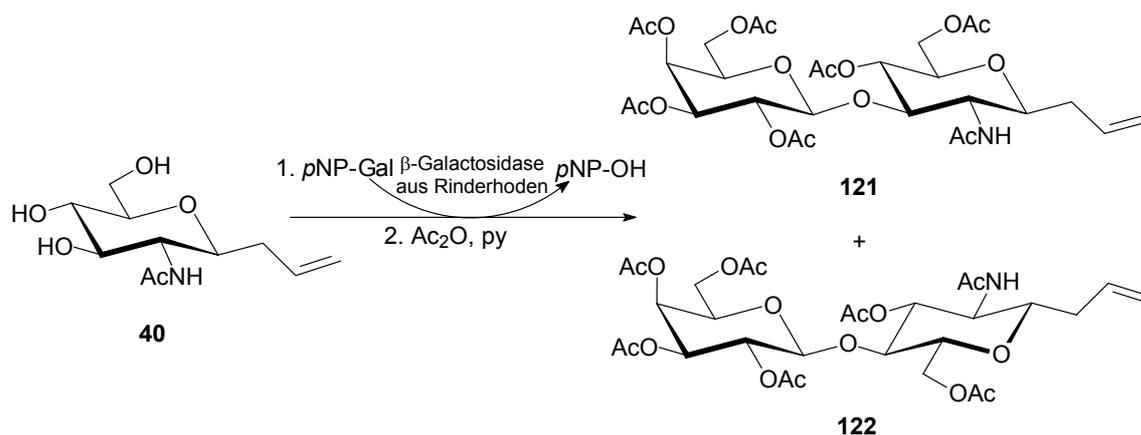
Die chemoenzymatische Galactosylierung der  $\alpha$ -Glycoside **8**, **24** und **25** von *N*-Acetyl-D-glucosamin mit den Enzymen aus *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans* erfolgte regioselektiv nur an Position 3, der abschließende Hydrolyseschritt mit dem Enzym aus *Escherichia coli* war nicht notwendig (Abb. 57). Anscheinend verhindert die axiale Hydroxygruppe bei den Akzeptoren mit *galacto*-Konfiguration eine optimale Erkennung im aktiven Zentrum des Enzyms, so dass ein Teil des GalNAc-Akzeptors auch an Position 6 galactosyliert werden konnte (Abb. 43). Die Ausbeuten der Umsetzungen mit den *gluco*-konfigurierten Akzeptoren bei beiden Enzymen waren denen der entsprechenden GalNAc-Derivate sehr ähnlich. Bei den Umsetzungen fiel auf, dass  $\alpha$ -Benzyl-GlcNAc deutlich besser wasserlöslich war als das analoge GalNAc-Derivat. Dies ist vermutlich als Erklärung für die besseren Ausbeuten anzusehen. Analoge Glycosylierungen mit dem Enzym aus *Bifidobacterium bifidum* mit diesen GlcNAc-Akzeptoren wurden bereits umfangreich untersucht.<sup>294</sup> Die Phosphorylase zeigt eine absolute Regioselektivität für Position 3 mit sehr guten Ausbeuten für die Galactosylierung der Methyl- (49 %) und Allylglycoside (57 %), während  $\alpha$ -Benzyl-GlcNAc nur im geringen Maße (14 %) umgesetzt wird.



Enzymquelle	Akzeptor	Produkte	Ausbeute [%]	
			β1-3	β1-4
Rinderhoden	<b>8</b>	<b>115/116</b>	49	6
	<b>24</b>	<b>117/118</b>	43	16
	<b>25</b>	<b>119/120</b>	39	4
<i>Xanthomonas manihotis</i>	<b>8</b>	<b>115</b>	23	---
	<b>24</b>	<b>117</b>	20	---
	<b>25</b>	<b>119</b>	21	---
<i>Bacillus circulans</i>	<b>8</b>	<b>115</b>	29	---
	<b>24</b>	<b>117</b>	34	---
	<b>25</b>	<b>119</b>	32	---

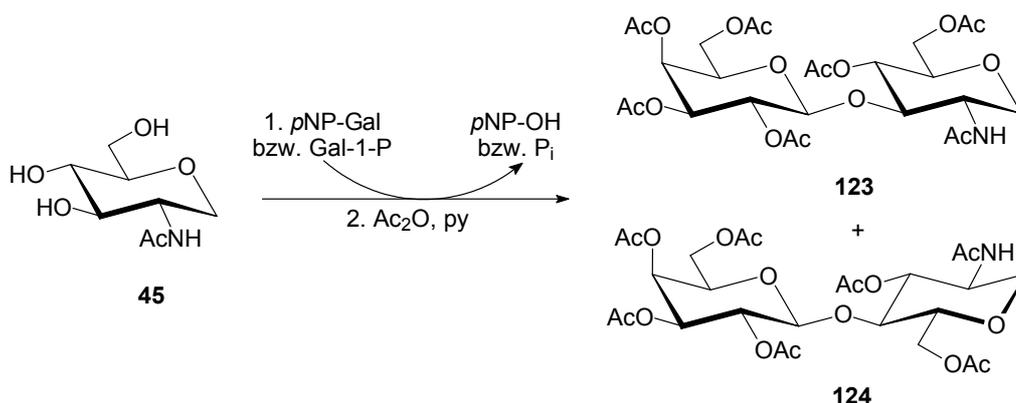
**Abb. 57** Galactosylierung der Allyl-, Methyl- und Benzyl- $\alpha$ -glycoside von GlcNAc

Bei den Glycosylierungen der Akzeptoren mit äquatorialer Hydroxygruppe an Position 4 unterschied sich die  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden von den anderen untersuchten Enzymen, da diese Gruppe sich anscheinend in der Bindungstasche den aktiven Carboxygruppen günstig nähern und zum *N*-Acetyl-D-lactosaminderivat glycosyliert werden kann. Dies resultierte in der Bildung von einem Regioisomerengemisch aus  $\beta$ 1-3- und  $\beta$ 1-4-verknüpften Disacchariden. Eine anschließende Hydrolyse mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli*, mit einer ausgesprochenen Bevorzugung der  $\beta$ 1-6-Bindung, blieb erfolglos und zeigte, dass es sich um die genannten Produkte handeln musste. In allen Fällen überwog das an Position 3 galactosylierte Produkt deutlich, es konnte allerdings eine Tendenz in Abhängigkeit von der Größe des Aglycons beobachtet werden. Während bei der sehr kleinen Methylgruppe am anomeren Zentrum das  $\beta$ 1-4-Produkt immerhin 27 % der Gesamtausbeute ausmachte, nahm dieser Anteil über die Allyl- (11 %) zur Benzylgruppe mit 9 % stark ab. Durch ein sterisch hinreichend anspruchsvolles Aglycon in axialer Position gelang es Regioselektivität bei der enzymatischen Galactosylierung mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden zu induzieren.



**Abb. 58** C-Glycosid **40** als Akzeptor für die Umsetzung mit  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden

Da von dem  $\beta$ -C-Allyl-GlcNAc **40** nur geringe Mengen zur Verfügung standen, konnte die Transglycosylierung nur mit dem Enzym aus Rinderhoden durchgeführt werden. Der Einsatz von drei Äquivalenten Akzeptor ergab ein Regioisomerenmisch, welches zur Reinigung acetyliert wurde und den Zugang zu den  $\beta$ 1-3- und  $\beta$ 1-4-galactosylierten C-Glycosiden in einer Gesamtausbeute von 24 % eröffnete (Abb. 58).

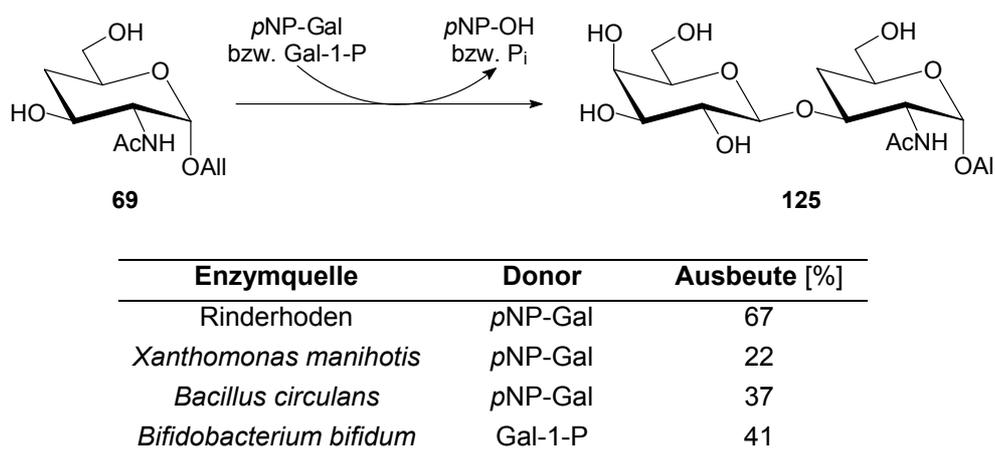


Enzymquelle	Donor	Ausbeute [%]	
		123	124
Rinderhoden	pNP-Gal	30	38
<i>Xanthomonas manihotis</i>	pNP-Gal	24	---
<i>Bacillus circulans</i>	pNP-Gal	33	---
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Gal-1-P	38	---

**Abb. 59** Glycosylierung des Glucitols **45**

Die chemoenzymatische Glycosylierung des 2-Acetamidoglucitols **45** mit  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden gelang in sehr guten Ausbeuten, die Regioselektivität war aber äußerst gering, und es wurde ein Gemisch der  $\beta$ 1-3- und  $\beta$ 1-4-verknüpften Produkte erhalten, die sich nach Acetylierung trennen ließen (Abb. 59). Die bei den O-Glycosiden (Abb. 57) beobachtete Tendenz, dass ein größeres Aglycon die Bildung des an Position 3 galactosylierten GlcNAc-Derivats

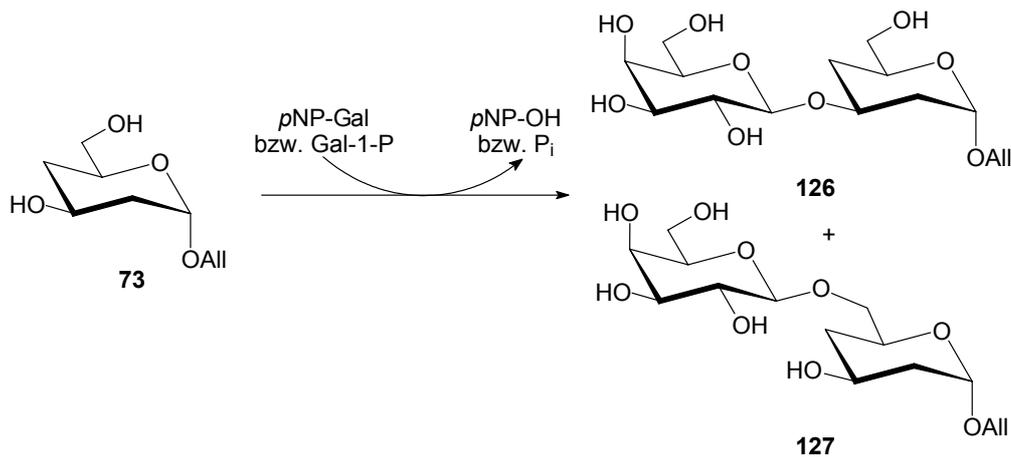
begünstigt, wurde durch den größeren Anteil des  $\beta$ 1-4-verknüpften Produkts bei der Galactosylierung dieses Glucitols bestätigt. Hier gibt es keine störenden Reste am anomeren Zentrum, die eine Positionierung der äquatorialen 4-Hydroxygruppe im aktiven Zentrum beeinträchtigen konnten. Die Umsetzung mit den anderen Enzymen lieferte regioselektiv die an Position 3 galactosylierten Produkte, die Ausbeuten entsprachen denen der Galactosylierung der *O*-Glycoside (Abb. 57).



**Abb. 60** Umsetzungen mit  $\alpha$ -Allyl-4-desoxy-GalNAc (**69**)

Die chemoenzymatische Galactosylierung des 4-Desoxyderivats **69** erfolgte in allen Fällen ausschließlich an Position 3 in Ausbeuten, die den Akzeptoren mit 4-Hydroxygruppe entsprechen (Abb. 60). Das Enzym aus Rinderhoden kann hier die Position 4 nicht galactosylieren, es entstand dementsprechend kein Nebenprodukt. Die  $\beta$ -Galactosidasen aus *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans* glycosylierten *galacto*-konfigurierte Akzeptoren ebenfalls an der primären Position, die entsprechenden *gluco*-konfigurierten nicht (Abb. 57). Dementsprechend ist nicht die äquatoriale Orientierung der 4-Hydroxygruppe für die alleinige Galactosylierung in Position 3 verantwortlich, sondern die axiale Hydroxygruppe bei den GalNAc-Derivaten stört bei der Erkennung durch die Enzyme und hat die Bildung eines Regioisomerengemisches zur Folge.

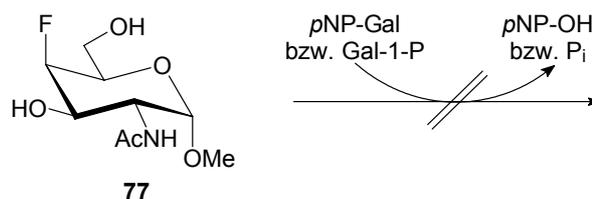
Die Galactosylierung des 2,4-didesoxygenierten Akzeptors **73** verlief relativ unspezifisch (Abb. 61). Die Ausbeuten fielen bei Inkubation mit den  $\beta$ -Galactosidasen deutlich niedriger aus, und es entstanden in allen Fällen Gemische aus dem an Position 3 bzw. 6 galactosylierten Akzeptor **73**, der nicht mehr in einer bevorzugten Orientierung im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden werden kann. Das Regioisomerenverhältnis wurde hauptsächlich durch die Reaktivität der einzelnen primären bzw. sekundären Alkohol-Funktion bestimmt, so dass bevorzugt das Produkt **127** gebildet wurde. Die Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* erkannte den modifizierten Akzeptor überhaupt nicht mehr (Abb. 61).



Enzymquelle	Donor	Ausbeute [%]	
		126	127
Rinderhoden	pNP-Gal	14	31
<i>Xanthomonas manihotis</i>	pNP-Gal	2	8
<i>Bacillus circulans</i>	pNP-Gal	5	12
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Gal-1-P	---	---

**Abb. 61** Chemoenzymatische Galactosylierung der 2,4-Dideoxyverbindung **73**

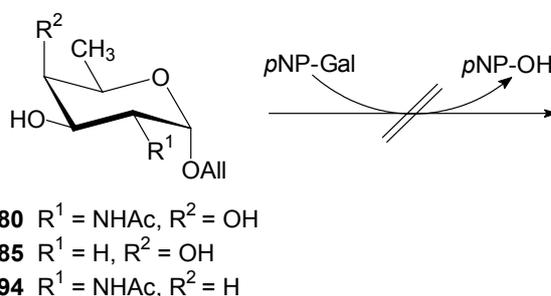
Während alle Enzyme die Akzeptoren mit axialer, äquatorialer oder ohne 4-Hydroxygruppe galactosylierten, erfolgte in Anwesenheit der 4-Fluoroverbindung **77** die Hydrolyse des jeweiligen Donors nur verlangsamt. Eine Produktbildung konnte nicht beobachtet werden; anscheinend handelt es sich bei **77** um einen Inhibitor. Es war bereits bekannt, dass Methyl-4-desoxy-4-fluoro- $\beta$ -D-galactopyranosid ein kompetitiver Inhibitor ( $K_M = 300 \mu\text{M}$ ) der  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli* ist.<sup>301</sup>



**Abb. 62** Versuchte Galactosylierung des 4-Fluoroderivats **77**

#### 5.4. FucNAc-Derivate als Akzeptoren bei Galactosylierungen

Die Untersuchungen mit verschiedenen 6-Desoxyverbindungen, die als Derivate des *N*-Acetyl-D-fucosamins angesehen werden können, wurden nicht mit Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* durchgeführt, da das Enzym nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Bisher wurde noch kein an Position 6 desoxygenerter Akzeptor mit den hier verwendeten  $\beta$ -Glycosidasen umgesetzt, so dass neue Ergebnisse zu erwarten waren. Allerdings wurde weder  $\alpha$ -Allyl-FucNAc (**80**), noch sein 2- oder sein 4-Desoxyderivat **85** respektive **94** als Substrat von den  $\beta$ -Galactosidasen aus Rinderhoden, *Xanthomonas manihotis* oder *Bacillus circulans* erkannt. Die 6-Hydroxygruppe scheint für die Bindung im aktiven Zentrum der Enzyme von grundlegender Bedeutung zu sein.



**Abb. 63**  $\alpha$ -Allyl-FucNAc-Derivate **80**, **85** und **94** als Akzeptoren

Als Fazit lassen sich einige allgemeine Beobachtungen über die Auswirkung der einzelnen Modifikationen auf die Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* und die  $\beta$ -Galactosidasen aus Rinderhoden, *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans* sagen: Keines dieser Enzyme toleriert eine Thiofunktionalität am anomeren Zentrum oder ein Fluorid an der axialen Position 4. Die drei  $\beta$ -Galactosidasen benötigen die primäre Hydroxygruppe zwingend, über die Phosphorylase lässt sich diesbezüglich nichts aussagen.

Bei der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden gewährleistet die 2-Acetamido-Funktion eine optimale Erkennung durch das Enzym, eine Desoxygenierung dieser Position liefert trotzdem noch akzeptable Ausbeuten. Eine Hydroxygruppe in Position 2 bewirkt zusammen mit einem äquatorialen Aglycon nicht nur schlechtere Ausbeuten, sondern auch die Bildung erheblicher Mengen eines  $\beta$ 1-6-Regioisomeren, der Akzeptor kann also in verschiedenen Orientierungen gebunden werden. An Position 4 wird eine evtl. vorhandene äquatoriale Hydroxygruppe ebenfalls galactosyliert, wobei das Regioisomerenverhältnis dabei durch die Größe des Aglycons beeinflusst wird: Bei einem sterisch anspruchsvollen Alkohol überwiegt die  $\beta$ 1-3-Verknüpfung. Dieses Enzym ist optimal für die Galactosylierung an Position 3 von Akzeptoren mit *galacto*-Konfiguration geeignet.

Die  $\beta$ -Galactosidasen aus *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans*, die eine sehr ähnliche Gensequenz besitzen, zeigen in den meisten Fällen vergleichbare Regioselektivitäten, wobei das Enzym aus *Bacillus circulans* in der Regel die Produkte in besseren Ausbeuten liefert. Auch bei diesen beiden Enzymen ermöglicht die Acetamidogruppe die optimale Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms, ihre Entfernung oder Substitution durch eine Hydroxygruppe führt zu schlechteren Ausbeuten und Regioselektivitäten. Die Alkohol-Funktion an Position 4 scheint für die Bindung nicht benötigt zu werden, bei einer axialen Orientierung kommt es zu einem Verlust der Regioselektivität, so dass auch die primäre Hydroxygruppe galactosyliert wird. Akzeptoren mit *gluco*-Konfiguration werden dagegen spezifisch nur an Position 3 galactosyliert.

Die 2-Acetamido-Funktion stellt eine optimale Orientierung des Akzeptors in der Bindungstasche der Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* sicher. Ihre Desoxygenierung führt zu einer schwächeren Bindung, die Substitution durch eine Hydroxygruppe verhindert eine Produktbildung komplett. Das Vorhandensein oder die Konfiguration der Hydroxygruppe an Position 4 bleibt ohne Auswirkung auf die Erkennung durch das Enzym.

## 6. Modifizierte Donoren für enzymatische Galactosylierungen

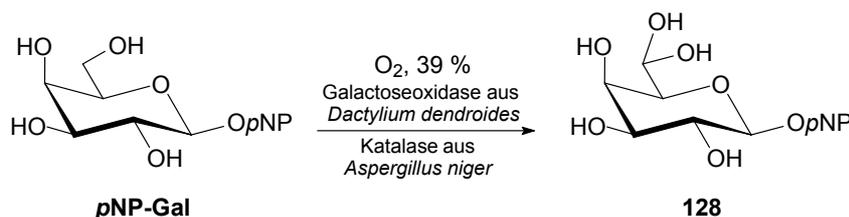
Nachdem mehrere Derivate der T-Antigen-Determinante mit Modifikationen im *N*-Acetyl-D-galactosamin-Teil zur Verfügung stehen, besteht für Untersuchungen der Spezifität von MAG Bedarf an der Synthese von Disacchariden, die an der Galactose modifiziert sind. Die Position 3 soll nicht verändert, sondern später sialyliert werden, da die *N*-Acetylneuraminsäure für die Erkennung durch MAG unbedingt erforderlich ist.<sup>88</sup> Bei der Bindung an MAG üben die Positionen 4 und 6 der subterminalen D-Galactose eine leichte sterische Hinderung aus,<sup>90</sup> Derivate die hier modifiziert sind, können evtl. bessere Inhibitoren sein. Ferner ist die Bedeutung der Hydroxygruppe an Position 2 von Interesse. Die genannten Derivatisierungen können nach Knüpfung der interglycosidischen Bindung, also an Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-OAll **95**, erfolgen. Werden sie dagegen vor der Galactosylierung schon am Donor vorgenommen, lassen sich gleichzeitig auch Rückschlüsse auf die Spezifität der  $\beta$ -Galactosidase für unphysiologische bzw. unnatürliche Glycosyldonoren ziehen, wozu systematische Untersuchungen bisher selten durchgeführt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit soll die chemoenzymatische Galactosylierung des Referenz-Akzeptors  $\alpha$ -Allyl-GalNAc mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden untersucht werden.

Aus Hydrolyseversuchen ist bekannt, dass die  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli* *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-fucopyranosid (*p*NP-Fuc) und *p*-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinopyranosid (*p*NP-Ara) erkennen und hydrolysieren kann.<sup>302</sup> Mit diesen unnatürlichen Glycosyldonoren lassen sich auch einfache Aglycon-Strukturen *in vitro* in präparativen Mengen galactosylieren.<sup>303</sup> Von der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden wird ebenfalls berichtet, dass sie *p*NP-Ara in einer wesentlich niedrigeren Rate als *p*NP-Gal hydrolysiert,<sup>177</sup> synthetische Untersuchungen wurden bisher aber nicht durchgeführt. Die  $\beta$ -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* hat sich gegenüber modifizierten Donoren bereits als besonders tolerant gezeigt: Sie ist nicht nur in der Lage einen an Position 6 acetylierten  $\beta$ -Galactosylrest zu übertragen,<sup>303</sup> sondern kann auch für die Darstellung von  $\beta$ -Glucosiden<sup>148</sup> und  $\beta$ -Mannosiden<sup>304</sup> mit den entsprechenden *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glycosid-Donoren verwendet werden. Ferner gelang mit D-Galactal als Donor die Synthese von 2-Desoxy- $\beta$ -galactosiden mit Monosacchariden als Akzeptoren.<sup>305</sup> Entsprechende Transglycosylierungen auf aliphatische Alkohole sind auch mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli* bekannt.<sup>306</sup> Eine große Zahl an Position 6 modifizierter Derivate von *p*NP-Gal konnte für die Transglycosylierung mit einem Enzymrohextrakt aus Gerste (enthält  $\beta$ -Amylase) oder der Acetonfällung eines Rohextraktes aus Schnecken (SNAP) verwendet werden.<sup>307</sup> In all diesen genannten Beispielen erfolgte die Glycosylierung der verschiedenen Akzeptoren entweder an Position 4 oder 6, die Transglycosylierung eines modifizierten Donors auf Position 3 wurde bisher nicht beschrieben, so dass hier der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden bedeutendes Potential zukommen kann.

## 6.1. Darstellung der modifizierten Donoren

Wong *et al.* oxidierten mit Galactoseoxidase die primäre Alkohol-Funktion von *p*NP-Gal und nutzten das *galacto*-Hexodialdosederivat als Donor bei einer mit  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* katalysierten Transglycosylierung.<sup>308</sup> Dabei stellten sie fest, dass der Enzym-Substrat-Komplex mit dem Aldehyd gegenüber Wasser weniger reaktiv ist, als gegenüber dem verwendeten GlcNAc-Akzeptor. Ferner besitzt das an Position 6' oxidierte LacNAc-Produkt eine deutlich erhöhte Stabilität gegenüber dem nichtoxidierten *N*-Acetyl-D-lactosamin, die sich in einer fast 80 mal höheren Halbwertszeit bei der Hydrolyse ausdrückt. Es wäre von Interesse, diese Methode auch auf die  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden zur Darstellung der T-Antigen-Determinante zu übertragen.

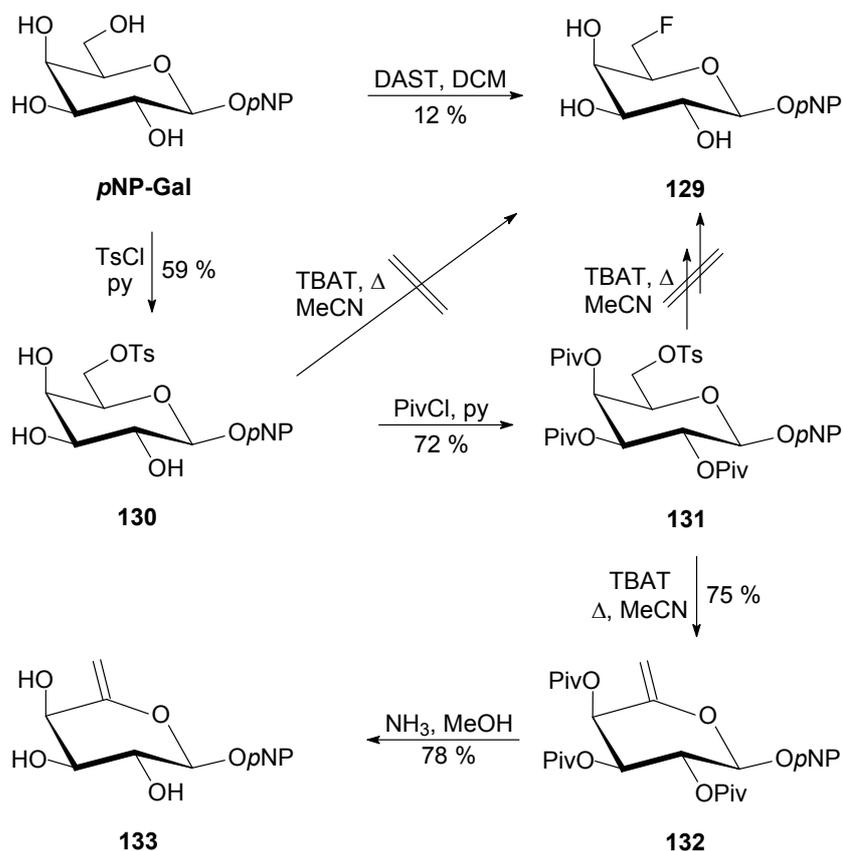
Galactoseoxidase (EC 1.1.3.9), ein Kupferprotein aus parasitischen Pilzen, katalysiert die Oxidation vieler primärer Alkohole, Alditole und der primären Alkohol-Funktion von D-Galactose und D-Talose - auch in Oligosacchariden - zu den entsprechenden Aldehyden.<sup>309</sup> An der Reaktion sind ein einzelnes Kupferion und ein modifizierter Tyrosin-Rest (kovalent über einen aromatischen Kohlenstoff an ein Cystein gebunden) beteiligt, die jeweils ein Elektron aufnehmen können und zusammen als Zwei-Elektronen-Redox-Einheit fungieren.<sup>310</sup> Als Oxidationsmittel findet molekularer Sauerstoff Anwendung und der daraus entstehende Wasserstoffperoxid, ein starker Inhibitor des Enzyms, wird *in situ* durch Katalase abgebaut. Kommerzielle Galactoseoxidase wird durch Lyophilisation erhalten, bei der ca. 75 % der Aktivität verloren geht und erhebliche Unterschiede bei der Reaktivität beobachtet werden.<sup>311</sup> *p*NP-Gal wurde in Gegenwart der Katalase aus *Aspergillus niger* unter einer Sauerstoffatmosphäre mit der Galactoseoxidase aus *Dactylium dendroides*<sup>312</sup> inkubiert und das selektiv an Position 6 oxidierte Produkt **128** ließ sich als Hydrat in 39 % Ausbeute isolieren (Abb. 64).



**Abb. 64** Galactoseoxidase katalysierte Oxidation von *p*NP-Gal

Wie bereits bei der Modifikation der GalNAc-Akzeptoren beschrieben, erweist sich die Substitution der primären Position bei Verbindungen mit *galacto*-Konfiguration häufig als problematisch.<sup>271,313</sup> Gallagher *et al.* berichten von einer direkten Umsetzung des ungeschützten *p*NP-Gal's mit Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) in Dichlormethan, die selektiv das 6-Fluorid **129** in 46 % Ausbeute gibt.<sup>307</sup> Die Reaktion konnte aber nur in deutlich niedrigeren Ausbeuten nachvollzogen werden, da es zur Bildung mehrerer, nicht nur einfach substituierter Produkte kam (Abb. 65). Bei Verwendung des Lösungsmittels Diethylenglycoldimethylether<sup>314</sup> (Diglyme)

konnte hingegen keine Produktbildung beobachtet werden. Das bereits für die Darstellung des 4-Fluoro-GalNAc-Derivats **77** erfolgreich verwendete Tetrabutylammonium(triphenylsilyl)difluorosilicat (TBAT) sollte auch für die Synthese von **129** eingesetzt werden. Als Abgangsgruppe bietet sich die *p*-Toluolsulfonylgruppe (Tosyl) an, die sich selektiv in Position 6 einführen ließ. Die Umsetzung von **130** mit TBAT in Acetonitril führte allerdings zu einer vollständigen Zersetzung.



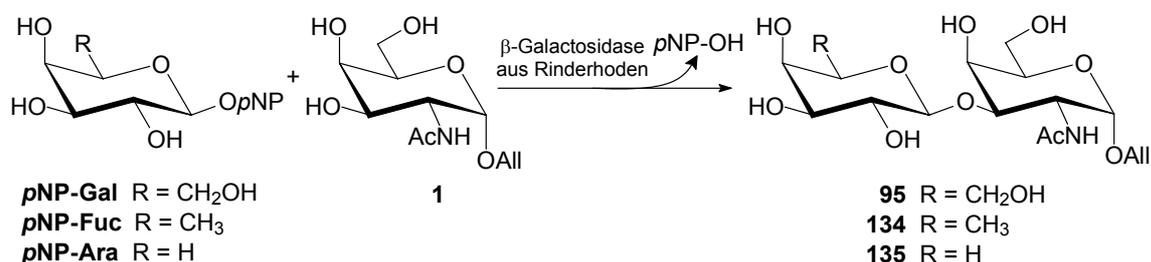
**Abb. 65** Darstellung des an Position 6 fluorierten *p*NP-Gal-Derivats **129** und Bildung des neuartigen Donors **133**

Zur Vermeidung etwaiger Nebenreaktionen an den ungeschützten Hydroxygruppen wurden diese als stabile Pivaloate geschützt (**131**), die anschließend versuchte Fluorierung führte jedoch durch Eliminierung zur Bildung einer exocyclischen Doppelbindung in einer guten Ausbeute von 75 %. Eine derartige Eliminierung primäre Tosylate in der Gegenwart von Silberfluorid ist bereits bekannt.<sup>315</sup> Die Entfernung der Pivaloylgruppen von **132** gelang mit Ammoniak in Methanol und eröffnet den Zugang zu einem bisher noch nicht untersuchten Donor **133** für enzymatische Galactosylierungen (Abb. 65). Die sp<sup>2</sup>-Hybridisierung des C-5 innerhalb des Kohlenhydratringes bewirkt, dass der Ringsauerstoff, C-4 und C-5 in einer Ebene liegen und sich kein stabiles Konformer mehr ausbilden kann. Durch die erhöhte Beweglichkeit des gesamten Ringsystems wird ein Mittelwert für die einzelnen Kopplungskonstanten ( $J_{1,2} = 5.3$  Hz,  $J_{2,3} = 7.4$  Hz) hervorgerufen. Die ungesättigten Kohlenstoffe C-5 (157.6 ppm) und C-6 (99.1 ppm) werden im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum deutlich zu tiefem Feld verschoben beobachtet. Die Doppelbindung und

eines der freien Elektronenpaare am Ringsauerstoff liegen in einer Ebene und bilden ein konjugiertes Doppelbindungssystem, aufgrund dessen im HMBC-NMR-Spektrum eine Kreuzkopplung zwischen einem der H-6 Protonen und dem anomeren Kohlenstoff auftritt.

## 6.2. Chemoenzymatische Galactosylierungen mit modifizierten Donoren

Die Spezifität der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden für die unterschiedlichen Donoren wurde anhand des Referenz-Akzeptors  $\alpha$ -Allyl-GalNAc (**1**) untersucht. Während **1** von *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (*p*NP-Gal) selektiv an Position 3 in sehr guten Ausbeuten galactosyliert wurde (Abb. 45), blieb auch bei den an Position 6 desoxygenierten und verkürzten Donoren *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-fucopyranosid (*p*NP-Fuc) und *p*-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinopyranosid (*p*NP-Ara) die Regioselektivität des Enzyms erhalten. Lediglich eine geringe Abnahme der Ausbeuten kann als Indiz für die nicht-optimale Bindung im aktiven Zentrum der  $\beta$ -Galactosidase angesehen werden (Abb. 66). Vermutlich ist die primäre Hydroxygruppe an stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt, ihr Fehlen beeinträchtigt die Transglycosylierung jedoch nicht übermäßig.

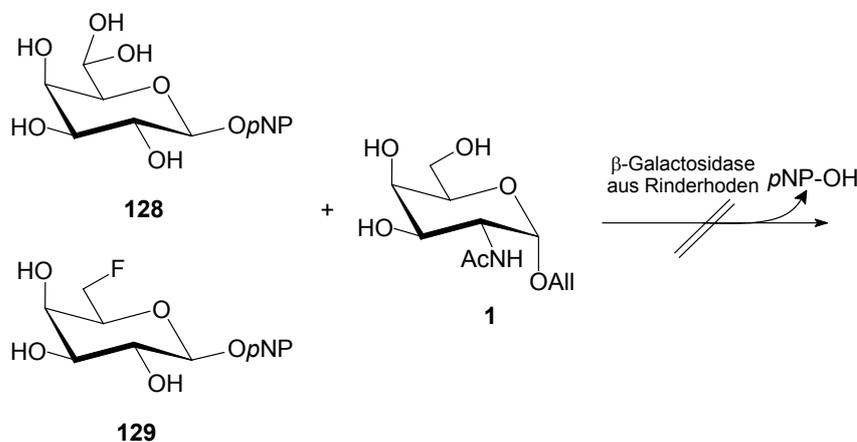


Donor	Produkt	Ausbeute [%]
<i>p</i> NP-Gal	<b>95</b>	67
<i>p</i> NP-Fuc	<b>134</b>	59
<i>p</i> NP-Ara	<b>135</b>	51

**Abb. 66** Galactosylierung, Fucosylierung und Arabinosylierung von  $\alpha$ -Allyl-GalNAc

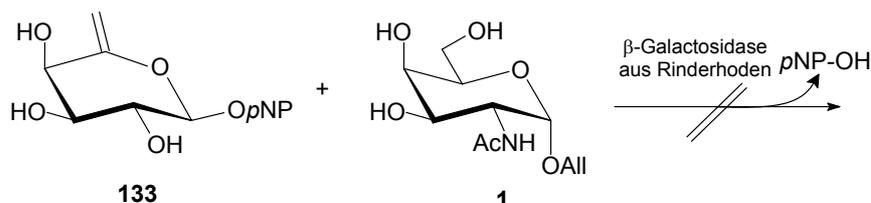
Die ebenfalls an Position 6 modifizierten Donoren **128** und **129**, die beide bereits bei anderen Enzymen ihr Transglycosylierungspotential unter Beweis gestellt haben,<sup>307,308</sup> wurden langsam hydrolysiert, eine Galactosylierung des Akzeptors  $\alpha$ -Allyl-GalNAc konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 67). Der hydratisierte Aldehyd **128** besitzt an Position 6 eine weitere Hydroxygruppe, die dem Donor einen verstärkt hydrophilen Charakter verleiht und die Bindung durch die  $\beta$ -Galactosidase verhindert. Dass **129** nicht als Donor akzeptiert wird ist ein interessantes Ergebnis, da das Fluorid sterisch weniger anspruchsvoll ist als die ursprüngliche Hydroxygruppe, aber gleichfalls als Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung fungieren kann. Es

besitzt zwar keine Donoreigenschaften zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung, die guten Glycosyldonoren *p*NP-Fuc und *p*NP-Ara jedoch auch nicht. Ein ähnlicher Effekt war bereits bei dem modifizierten 4-Fluoro-GalNAc Akzeptor **77** aufgetreten, der ebenfalls nicht von der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden erkannt wurde (Abb. 62).



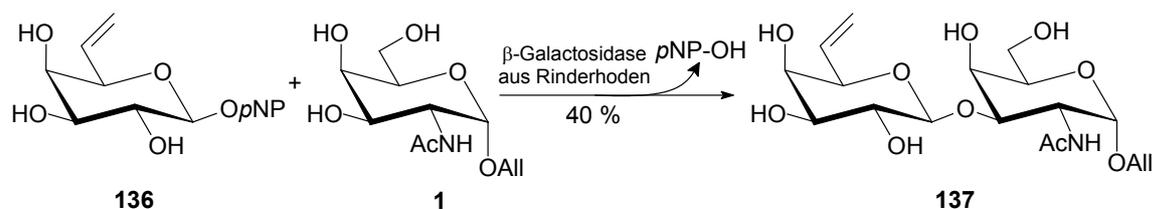
**Abb. 67** Galactosyl-Donoren **128** und **129**

Der in dieser Arbeit erstmalig synthetisierte Donor **133** besitzt nicht nur eine Doppelbindung zwischen C-5 und C-6, mit einer  $sp^2$ -Hybridisierung des Ringkohlenstoffs C-5 kommt es zu einer Verzerrung des gesamten Ringes und einer räumlichen Neuorientierung der Hydroxygruppen im Vergleich zum ursprünglichen *p*NP-Gal. Bei Inkubation mit der  $\beta$ -Galactosidase konnte nur eine minimale Hydrolyse des Donors beobachtet werden, eine Transglycosylierung erfolgte jedoch nicht (Abb. 68).



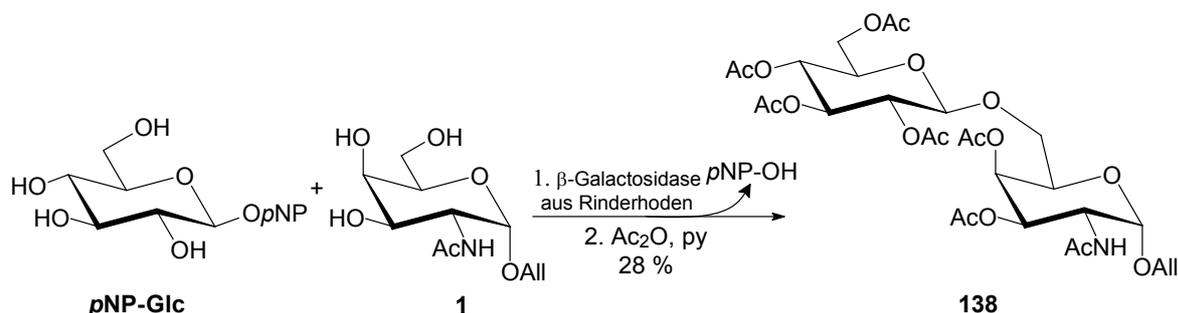
**Abb. 68** **133** als neuartiger Donor

Der um eine Kohlenstoffeinheit verlängerte Donor **136** mit einer Doppelbindung zwischen C-6 und C-7 fand bereits erfolgreich Anwendung bei Transglycosylierungen mit einem Enzymrohextrakt aus Gerste (enthält  $\beta$ -Amylase), der Acetonfällung eines Rohextraktes aus Schnecken<sup>307</sup> und der  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (Biolacta<sup>TM</sup>).<sup>316</sup> Die Umsetzung von **136** mit dem Akzeptor **1** in Gegenwart der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden lieferte in sehr guten Ausbeuten das an Position 3 selektiv glycosylierte Produkt **137** (Abb. 69). Das T-Antigenderivat zeichnet sich durch zwei endständige Doppelbindungen aus, die gleichzeitig für weitere Modifikationen offen stehen.



**Abb. 69** Darstellung von **137**. Die hier verwendete Probe des Donors **136** wurde dankenswerterweise von S. Weingarten zur Verfügung gestellt<sup>316</sup>

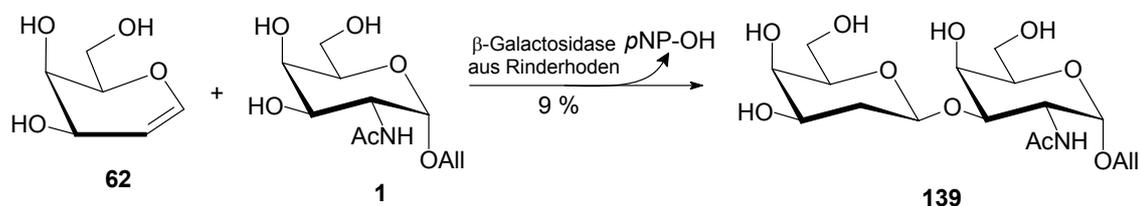
Sauerbrei *et al.* beobachteten, dass die  $\beta$ -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* auch für die Synthese von  $\beta$ -Glucosiden verwendet werden kann.<sup>148</sup> Mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden gelang die Übertragung eines  $\beta$ -Glucosylrests unter Standardbedingungen in einer guten Ausbeute von 28 % (Abb. 70). Da das Rohprodukt jedoch durch geringe Mengen eines Nebenprodukts verunreinigt war, das wahrscheinlich durch Selbstglycosylierung des Donors *pNP*-Glc entstanden war, wurde es acetyliert und gereinigt. Offensichtlich ist die axiale Hydroxygruppe im Donor *pNP*-Gal für die korrekte Orientierung in der Bindungstasche der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden von elementarer Bedeutung, da ihre Inversion zu der Bildung des  $\beta$ 1-6-verknüpften Regioisomeren **138** führt. In diesem Zusammenhang wäre für weiterführende Untersuchungen die Darstellung eines entsprechenden 4-Desoxy-Donors von Interesse.



**Abb. 70**  $\beta$ -Glucosylierung durch die  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden

Schon Distler und Jourdian beobachteten bei der Isolierung der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden, dass D-Galactal als kompetitiver Inhibitor wirkt.<sup>177</sup> Dementsprechend konnte bei dem Versuch D-Galactal mit *pNP*-Gal zu galactosylieren kein Transglycosylierungsprodukt isoliert werden (Abb. 54), stattdessen wurde aber die Bildung von 2-Desoxy-D-galactose beobachtet, die sich nur durch die Hydratisierung des Glycals erklären lässt. Die Hydrolyse (oder Transglycosylierung) mit Glycosidasen verläuft durch Übergangszustände mit substantiellem Oxocarbeniumion-Charakter (Abb. 11), bei denen sich die positive Ladung des anomeren Zentrums z.T. auf den Ringsauerstoff delokalisiert und sich ein partieller Doppelbindungscharakter ausbildet. Im Übergangszustand liegt der Kohlenhydratring nicht mehr als Sessel vor, sondern verzerrt in Form eines Halbsessels, ähnlich den Glycalen.<sup>317</sup>

Erste Untersuchungen zur chemoenzymatischen Glycosylierung mit Glycal-Donoren wurden von Lehmann *et al.* unternommen, die D-Glucal und D-Galactal mit den entsprechenden Glycosidasen hydratisieren<sup>318</sup> und später die Transglycosylierung auf einfache Alkohole mit  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli* unter Bildung der 2-Deoxy- $\beta$ -glycoside beobachten konnten.<sup>319,320</sup> Beau *et al.* gelang es in der Folge mehrere Monosaccharide mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* selektiv an der primären Hydroxygruppe zu glycosylieren.<sup>305</sup> Dies ist besonders beachtenswert, da die Bildung von 2-Desoxy- $\beta$ -glycosiden synthetisch anspruchsvoll ist und es in der Regel einer dirigierenden Gruppe an Position 2 bedarf, die in einem späteren Schritt der Synthese entfernt werden muss.<sup>231</sup> Durch Inkubation von D-Galactal mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden gelang die Synthese des an Position 3 glycosylierten 2'-Desoxy-T-Antigenderivats **139**. In Anbetracht der sonst nötigen vielstufigen Reaktionssequenz bei Verwendung klassischer Glycosylierungsstrategien ist die Ausbeute von 9 % als ausgesprochen positiv zu bewerten.



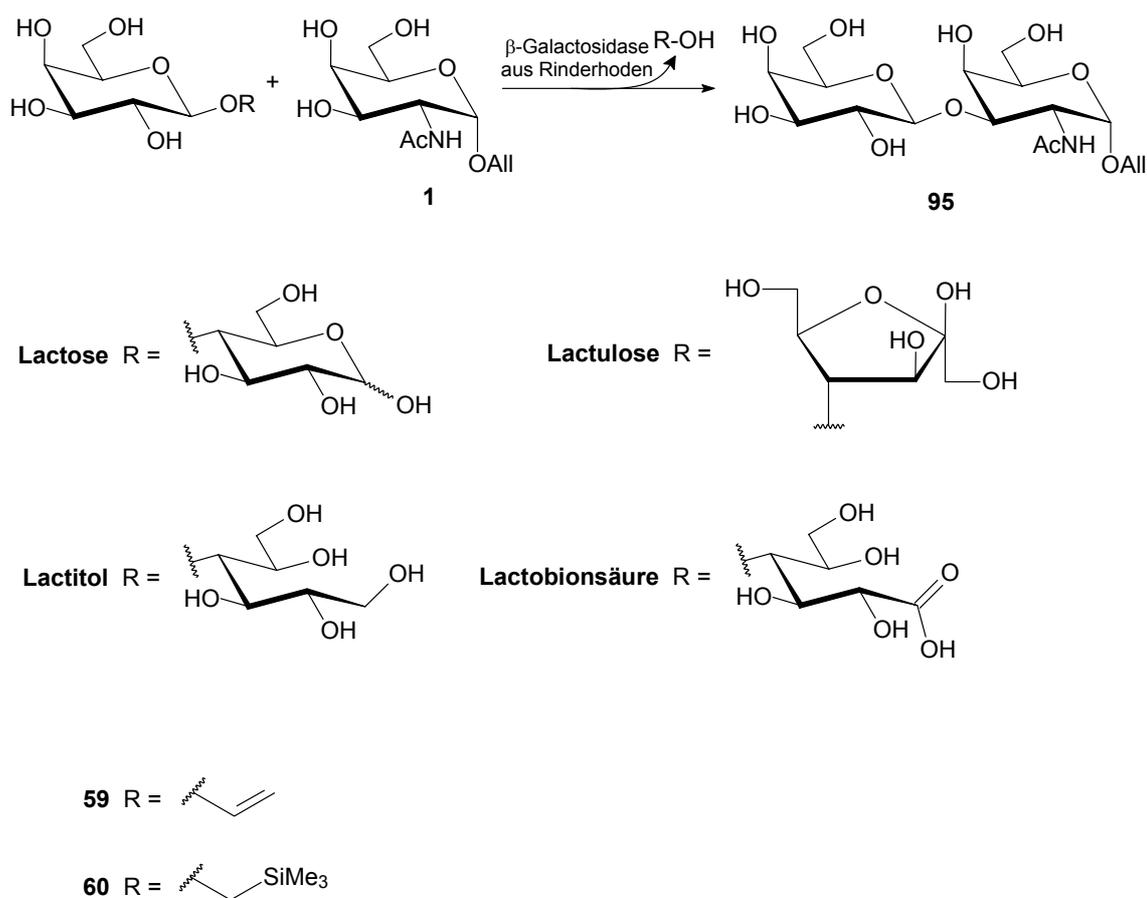
**Abb. 71** Darstellung eines 2-Desoxy- $\beta$ -D-galactopyranosids aus D-Galactal

## 7. Glycosyldonoren mit neuen Abgangsgruppen

Häufig hat die Optimierung der bisher bekannten und bereits erprobten Reaktionsbedingungen bezüglich pH-Wert, Puffer oder Temperatur nur begrenzte Auswirkungen auf die Ausbeute der chemoenzymatischen Glycosylierung. Deutliche Verbesserungen lassen sich aber durch die Modifikation des Enzyms selbst erreichen. Da die Verwendung von Glycosynthasen bisher nur in Einzelfällen erfolgt und sie noch nicht weit verbreitet und für jedermann zugänglich sind,<sup>160</sup> besteht Interesse an einer universellen Möglichkeit, die Ausbeuten bei Transglycosylierungen zu erhöhen. Die Verwendung organischer mit Wasser mischbarer Cosolventien, um die konkurrierende Hydrolyse zu reduzieren, kann allerdings die Enzymaktivität beeinträchtigen. Die gängigste Methode zur Erhöhung der Ausbeuten ist die Verwendung eines großen Überschusses an Akzeptor, der den zweiten Teil der Transglycosylierung (Abb. 12), die Übertragung des Glycosylrests vom intermediären Glycosyl-Enzym-Komplex auf den Akzeptor (statt auf Wasser), zu den Produkten verschieben soll. Dieser Ansatz hat auch in den bisher diskutierten Teilen der hier vorliegenden Arbeit Anwendung gefunden. Der Hauptnachteil wird jedoch bei Verwendung von schwer zugänglichen oder sehr teuren Akzeptoren deutlich, z.B. bei vielen der hier dargestellten modifizierten GalNAc-Akzeptoren. Andererseits kann das Gleichgewicht auch durch eine höhere Konzentration des Glycosyl-Enzym-Komplexes zu den Glycosylierungsprodukten hin verschoben werden. Dies konnte durch die Verwendung von übersättigten Lösungen des weitverbreiteten Donors *p*NP-Gal gezeigt werden, der normalerweise nur schlecht wasserlöslich ist.<sup>281</sup> Unter diesen Reaktionsbedingungen fungiert aber das eingesetzte Donormolekül auch als Akzeptor und es kommt zur Bildung eines Galactobiosids durch Selbstglycosylierung. Zwei mögliche Ansätze für eine schnellere Bildung und damit höhere Konzentration des intermediären Glycosyl-Enzym-Komplexes ergeben sich durch Variation der Abgangsgruppe des Donors. Einerseits sollen durch geeignete Modifikationen besser wasserlösliche Donoren synthetisiert werden, die den Einsatz in höheren Konzentrationen erlauben, und andererseits würden aktivierte Donoren eine höhere Reaktivität aufweisen und die Hydrolyse des bereits gebildeten Produkts zurückdrängen. Auf diesem Prinzip beruht das hohe Transglycosylierungspotential von *p*NP-Gal, dessen weitere Aktivierung angestrebt werden soll. Im folgenden wird die Darstellung adäquater Donoren beschrieben und die Produkte werden auf ihre Eignung für die Transglycosylierung mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden getestet. Um das Transglycosylierungspotential der verschiedenen Donoren miteinander vergleichen zu können, wurden sie im analytischen Maßstab mit dem Referenz-Akzeptor  $\alpha$ -Allyl-GalNAc (**1**) unter den bereits beschriebenen Standardbedingungen umgesetzt und die Menge an entstandenem Produkt **95** durch HPLC-Untersuchungen quantifiziert. Auf diese Weise ließ sich auch erkennen, ob weitere Produkte gebildet wurden.

## 7.1. Disaccharide als Donoren für die Transglycosylierung

Lactose ist ein weit verbreiteter Donor für  $\beta$ -Galactosidasen und zeichnet sich durch eine sehr hohe Wasserlöslichkeit aus.<sup>145</sup> Andere kommerziell erhältliche Disaccharide mit einer  $\beta$ -verknüpften Galactose-Einheit, die sich als Donoren eignen können, sind Lactulose, Lactobionsäure und Lactitol (Abb. 72). Ferner sollten die  $\beta$ -Alkylgalactoside **59** und **60** sowie  $\alpha$ -Galactopyranosylfluorid ( $\alpha$ -Gal-F) auf ihr Potential als Glycosyldonoren mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden untersucht werden. Das  $\beta$ -Fluorid von Galactose ist im Inkubationspuffer (wässrig, pH = 4.3) nicht stabil.<sup>321</sup> Zwei  $\beta$ -Glucosidasen akzeptieren aber das  $\alpha$ - und das  $\beta$ -Glucopyranosylfluorid als Donor,<sup>322</sup> so dass der Einsatz von  $\alpha$ -Gal-F für eine  $\beta$ -Galactosidase zumindest untersuchenswert ist.  $\beta$ -Glycosynthasen, deren nucleophile Carboxygruppe im aktiven Zentrum durch einen nicht-nucleophilen Rest ersetzt wurde, verwenden ausschließlich  $\alpha$ -Gal-F als Donor. Es konnte bei der Umsetzung von  $\alpha$ -Gal-F mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden aber kein Transglycosylierungsprodukt beobachtet werden, stattdessen wurde der Donor langsam hydrolysiert. Diese Beobachtung wurde bei Blindversuchen in Anwesenheit der  $\beta$ -Galactosidase bestätigt.



**Abb. 72** Transglycosylierung mit nichtaromatischen Abgangsgruppen

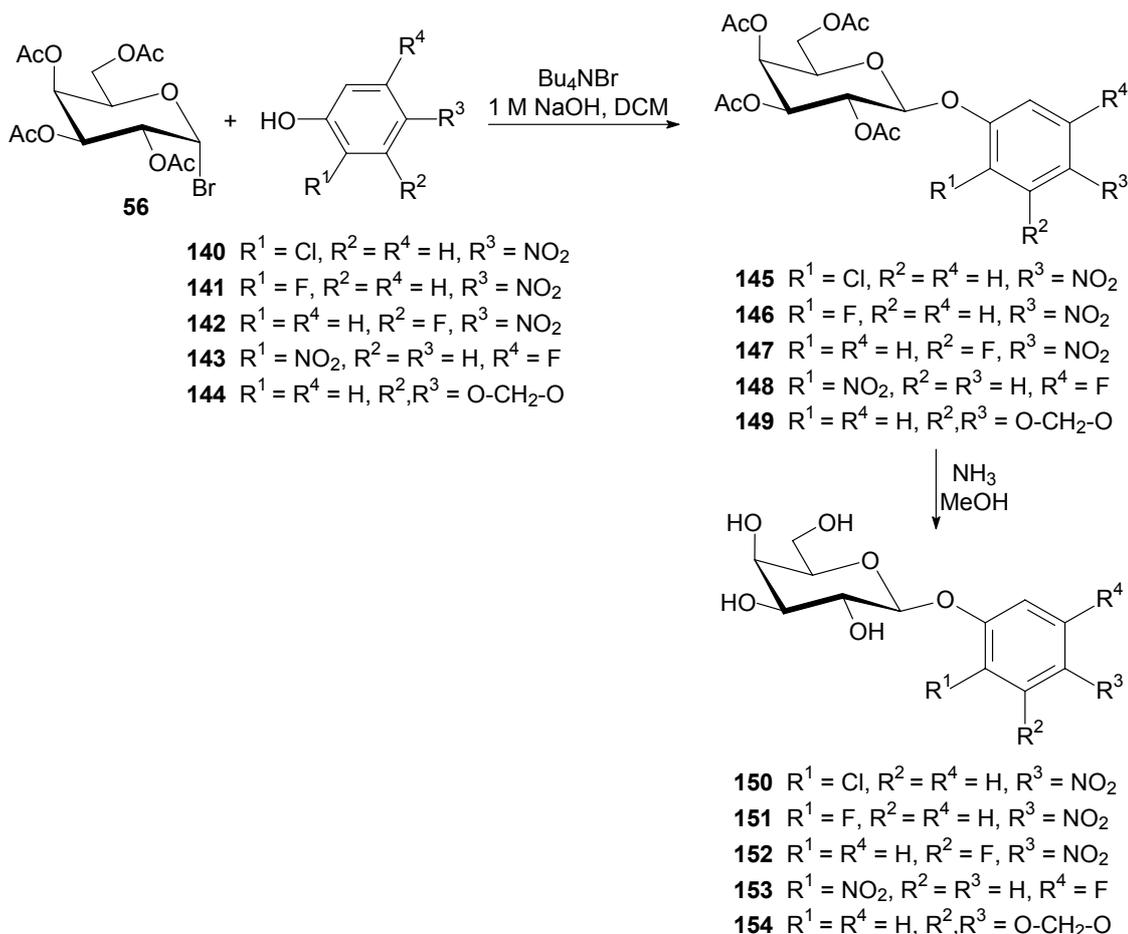
Lactobionsäure und die  $\beta$ -Alkylgalactoside **59** und **60** zeigten sich zwar im Inkubationspuffer stabil, die  $\beta$ -Galactosidase hydrolysierte allerdings langsam ihre glycosidische Bindung, ohne dass eine Transglycosylierung auf den Akzeptor **1** erfolgte. Lactose als Donor ergab **95** in 14 % Ausbeute, andere Glycosylierungsprodukte wurden nicht beobachtet. Lactulose und Lactitol dagegen lieferten, wie bereits von Thiem *et al.* ausführlich untersucht,<sup>323</sup> das gewünschte Produkt in sehr niedrigen Ausbeuten (<5 %) neben anderen Produkten aus Selbstglycosylierungsreaktionen. Keiner der hier getesteten nicht-aromatischen Glycosyldonoren, auch nicht die häufig verwendete Lactose, ermöglichte so gute Ausbeuten, wie sie mit *p*NP-Gal erreicht wurden (67 %, Abb. 45). Allgemein kann gesagt werden, dass sich die Produkte der Transglycosylierung mit Donor-Disacchariden nicht akkumulieren können, da sie häufig ähnlich schnell wie der Donor gespalten und auf einen anderen Akzeptor oder Wasser übertragen werden. Ferner kann das freigesetzte Aglycon als konkurrierender Akzeptor dienen, so dass schwer zu trennende Produktgemische aus Donor-Disaccharid, Produkt-Disaccharid und potentiellen Regioisomeren erhalten werden.<sup>323</sup>

## 7.2. Aromatische Abgangsgruppen in Analogie zu *p*NP-Gal

### 7.2.1. Darstellung

Unter der großen Anzahl an bekannten klassischen Glycosylierungsmethoden<sup>324,325</sup> hat sich für die Darstellung von  $\beta$ -Arylglycosiden besonders die Phasentransferkatalyse durch einfache und schnelle Reaktionsbedingungen und sehr gute Ausbeuten hervor getan.<sup>326</sup> Im Gegensatz zur gängigen Praxis in homogenem Medium erfolgt bei der Phasentransferkatalyse die Reaktion in einem Zwei-Phasen-System. In der organischen Phase befindet sich der Glycosyldonor, die wässrige Phase aus Natriumhydroxid deprotoniert das Phenol. Der Phasentransferkatalysator bildet mit dem Phenolat ein lipophiles Ionenpaar, das in die organische Phase gelangen kann. Handelt es sich bei der organischen Phase um ein aprotisches unpolares Lösungsmittel, ist das Ionenpaar nicht solvatisiert und das Phenolat besitzt eine höhere Nucleophilie, als wenn die Reaktion in einer homogenen Phase eines aprotischen polaren Lösungsmittels ablaufen würde. Als Katalysatoren für diesen Zweck finden meist „Onium-Salze“ (oft quartäre Ammoniumsalze) oder Komplexbildner wie Kronenether Anwendung, die auch in der organischen Phase sehr gut löslich sind.<sup>327</sup>

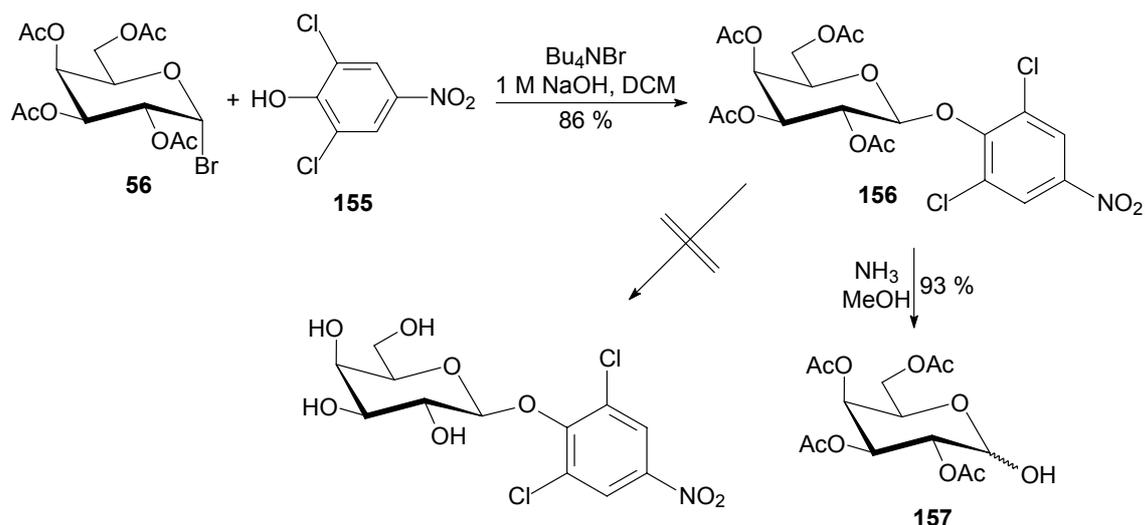
Die Phasentransfer-katalysierte Galactosylierung von 2-Chlor-4-nitro- (**140**), 2-Fluor-4-nitro- (**141**), 3-Fluor-4-nitro- (**142**) und 5-Fluor-2-nitrophenol (**143**) konnte in Gegenwart des Phasentransferkatalysators Tetrabutylammoniumbromid ( $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{Br}^-$ ) und drei Äquivalenten Phenol in einem Zwei-Phasen-System aus wässriger Natronlauge und Dichlormethan in sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden (Abb. 73).



	Akzeptor-Phenol				peracetyliertes Arylglycosid	ungeschützter Donor
	$R^1$	$R^2$	$R^3$	$R^4$		
2-Chlor-4-nitrophenol <b>140</b>	Cl	H	$\text{NO}_2$	H	<b>145</b> , 83 %	<b>150</b> , 98 %
2-Fluor-4-nitrophenol <b>141</b>	F	H	$\text{NO}_2$	H	<b>146</b> , 77 %	<b>151</b> , quant.
3-Fluor-4-nitrophenol <b>142</b>	H	F	$\text{NO}_2$	H	<b>147</b> , 76 %	<b>152</b> , 95 %
5-Fluor-2-nitrophenol <b>143</b>	$\text{NO}_2$	H	H	F	<b>148</b> , 79 %	<b>153</b> , 98 %
Sesamol <b>144</b>	H	$\text{O-CH}_2\text{-O}$	H	H	<b>149</b> , 63 %	<b>154</b> , 87 %

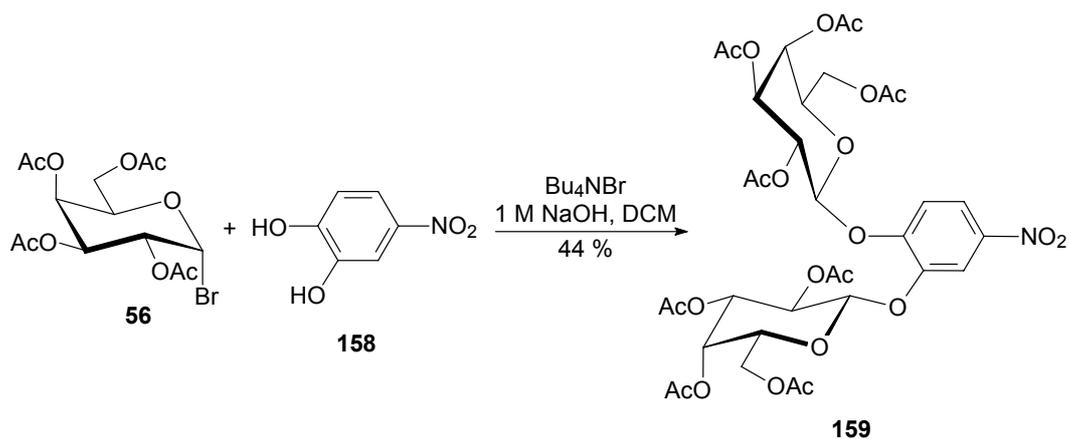
**Abb. 73** Phasentransfer-katalysierte Galactosylierung

In allen Fällen konnte die  $\beta$ -Verknüpfung der glycosidischen Bindung eindeutig durch die Kopplungskonstante  $J_{1,2}$  belegt werden. Ein nicht zu unterschätzender Vorteil ist die Verwendung des einfachen Donors **56**, der in einem Schritt aus D-Galactose erhalten werden kann oder zu einem geringen Preis kommerziell erhältlich ist. Zum Abbruch der Reaktion wurde mit Ethylacetat, worin Tetrabutylammoniumbromid fast unlöslich ist, verdünnt und wässrig aufgearbeitet, um den Katalysator, Natriumhydroxid und überschüssiges Phenol zu entfernen. Die Glycosylierung des Sesamols (**144**) verlief etwas schlechter, da dieses in wässriger Natronlauge nur bedingt stabil ist. Die Entschützung zu den ungeschützten Donoren **150-154** für die folgenden Untersuchungen zur chemoenzymatischen Galactosylierung erfolgte durch Behandlung mit katalytischen Mengen Ammoniak in Methanol (Abb. 73). Die Reinigung war durch Umkristallisation aus Methanol möglich.



**Abb. 74** Beispiel eines Entschützungsversuchs von 2,6-Dichlor-4-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (**156**)

Die Galactosylierung von 2,6-Dichlor-4-nitrophenol (**155**) lieferte **156** in sehr guten Ausbeuten, es gelang allerdings nicht die Acetylgruppen zu entfernen, ohne dass auch die glycosidische Bindung hydrolysiert wird. Eine Vielzahl z.T. sehr schonender Reagenzien zur Deacetylierung ( $\text{NaOMe}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , basischer oder saurer Ionenaustauscher, *N*-Methylpyrrolidin, Guanidin-Hydrochlorid, verdünnte Salzsäure) wurden angewandt, aber in allen Fällen konnte nur die schnelle Abspaltung des Phenols beobachtet werden. Als Beispiel sei die bei ähnlichen Verbindungen sehr erfolgreich angewandte Deacetylierung mit Ammoniak in Methanol genannt, die bei pH 8 nach fünf Minuten Reaktionszeit in der Kälte fast ausschließlich das noch unverändert acetylierte, aber am anomeren Kohlenstoff ungeschützte, Hydrolyseprodukt **157** lieferte (Abb. 74).

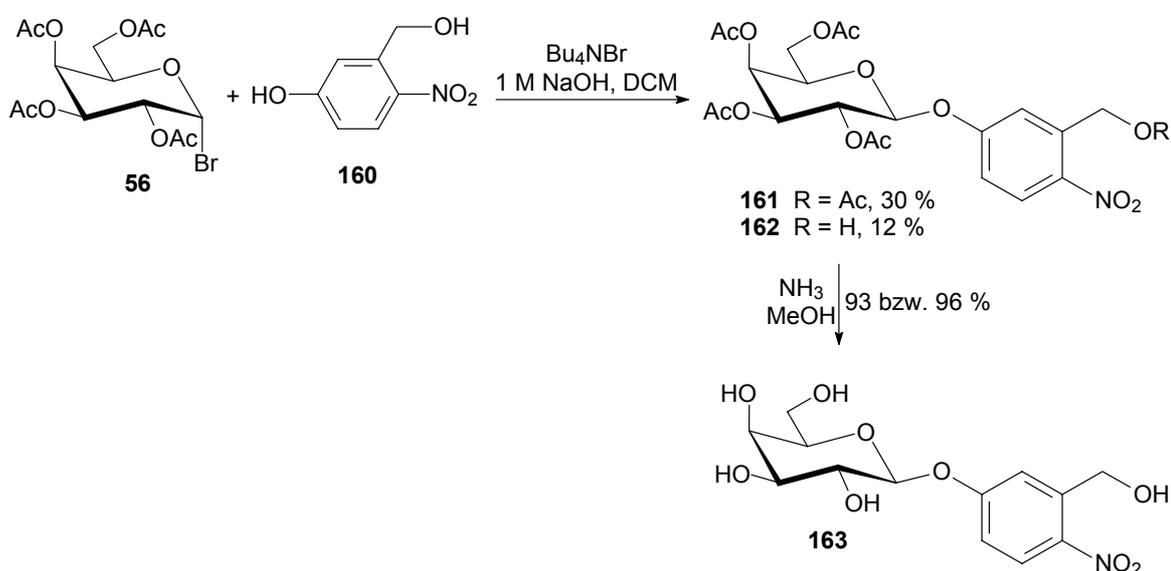


**Abb. 75** Bildung eines bisgalactosylierten Produkts

Bei der Umsetzung mit drei Äquivalenten 4-Nitrocatechin (**158**) wurde das bisgalactosylierte Produkt **159** in einer Ausbeute von 44% isoliert, die Bildung eines monoglycosylierten Produkts konnte trotz eines deutlichen Überschusses an Phenol **158** nicht beobachtet werden (Abb. 75). Die Galactosylierung der ersten Alkoholfunktion des Akzeptors verbessert offenbar

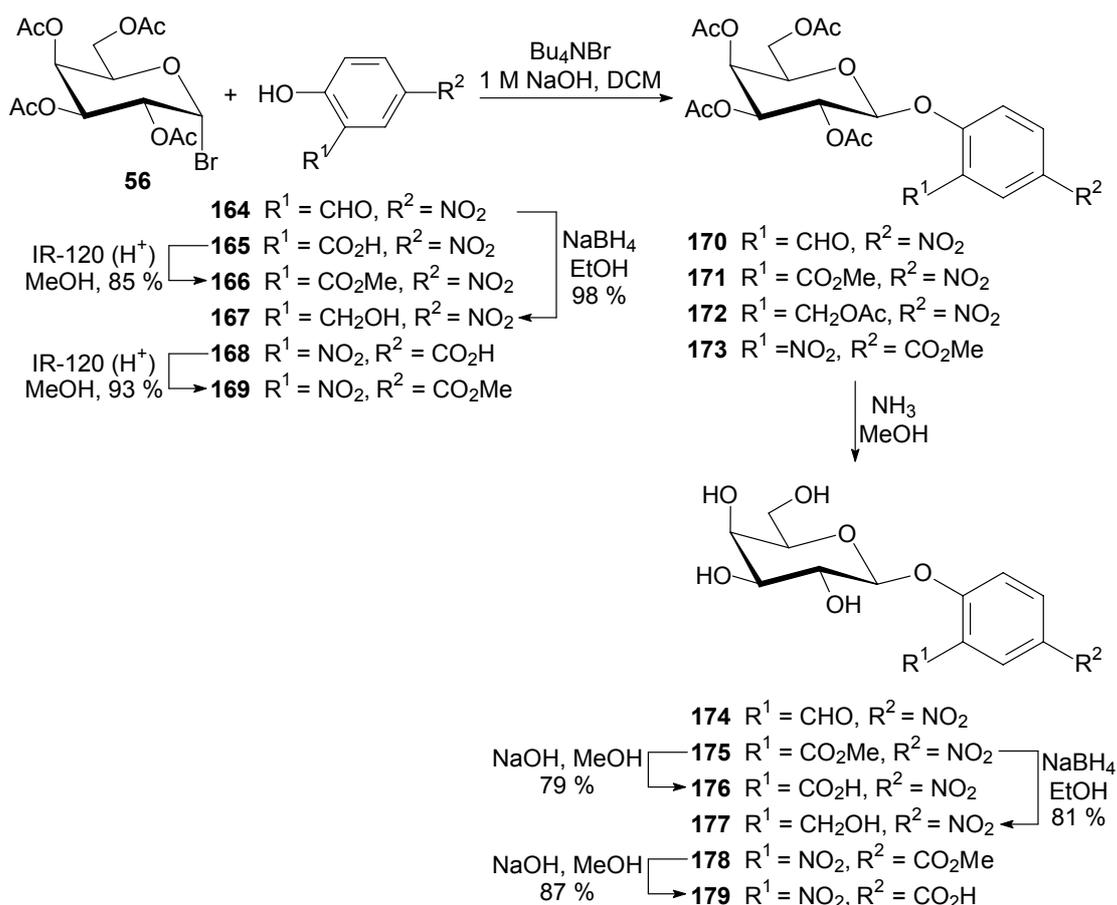
die Löslichkeit in der organischen Phase und scheint die Nucleophilie des zweiten Phenolats so stark zu erhöhen, dass es zur bevorzugten Zweit-Glycosylierung kommt.

Da bei der Phasentransferkatalyse nur Phenole reagieren ist es auch möglich, ein Phenol in Gegenwart eines Benzylalkohols selektiv zu glycosylieren: 5-Hydroxy-2-nitrobenzylalkohol (**160**) wurde ausschließlich an der phenolischen Funktion galactosyliert. Bedingt durch partielle intermolekulare Acetylgruppenwanderung<sup>274</sup> entstand jedoch ein Gemisch der beiden  $\beta$ -Arylglycoside **161** und **162**, die an der benzylichen Alkoholfunktion acetyliert bzw. ungeschützt im Verhältnis 5:2 vorliegen (Abb. 76). Die niedrige Gesamtausbeute bei der Glycosylierung kann an der deutlich besseren Wasserlöslichkeit des Phenols **160** liegen, die zu einer niedrigeren Konzentration in der organischen Phase führt. Nach säulenchromatographischer Trennung der beiden Glycoside erfolgte die Deacetylierung der Einzelverbindungen zu **163**.



**Abb. 76** Intermolekulare Acetylgruppenwanderung bei der Galactosylierung von 5-Hydroxy-2-nitrobenzylalkohol (**160**)

Die Galactosylierung von 2-Hydroxy-5-nitrobenzaldehyd (**164**) wird mit Kaliumcarbonat in Acetonitril beschrieben, die Ausbeute von 29 % ist allerdings unbefriedigend.<sup>328</sup> Unter den bewährten Phasentransferbedingungen konnte die Ausbeute an **170** dagegen auf 59 % verdoppelt werden. Der Aldehyd **164** ließ sich mit Natriumborhydrid in Ethanol glatt zum entsprechenden Benzylalkohol **167** reduzieren,<sup>329</sup> der als weiterer interessanter Akzeptor unter Phasentransferkatalyse **172** in befriedigenden Ausbeuten ergab (Abb. 77). Wie bereits bei der Glycosylierung von **160** beobachtet, erfolgte auch hier eine intermolekulare Acetylgruppenwanderung auf die benzyliche Alkohol-Funktion, in diesem Fall konnte aber kein ungeschütztes Produkt analog zu **162** nachgewiesen werden (Abb. 76). Die beiden für die Galactosylierung verwendeten Benzoesäuremethylester **166** und **169** wurden aus den freien Säuren **165** bzw. **168** durch Behandlung mit saurem Ionenaustauscher in Methanol erhalten. Phasentransfer-katalysierte Glycosylierung der beiden Ester lieferte die  $\beta$ -Arylglycoside **171** und **173** in guten Ausbeuten.



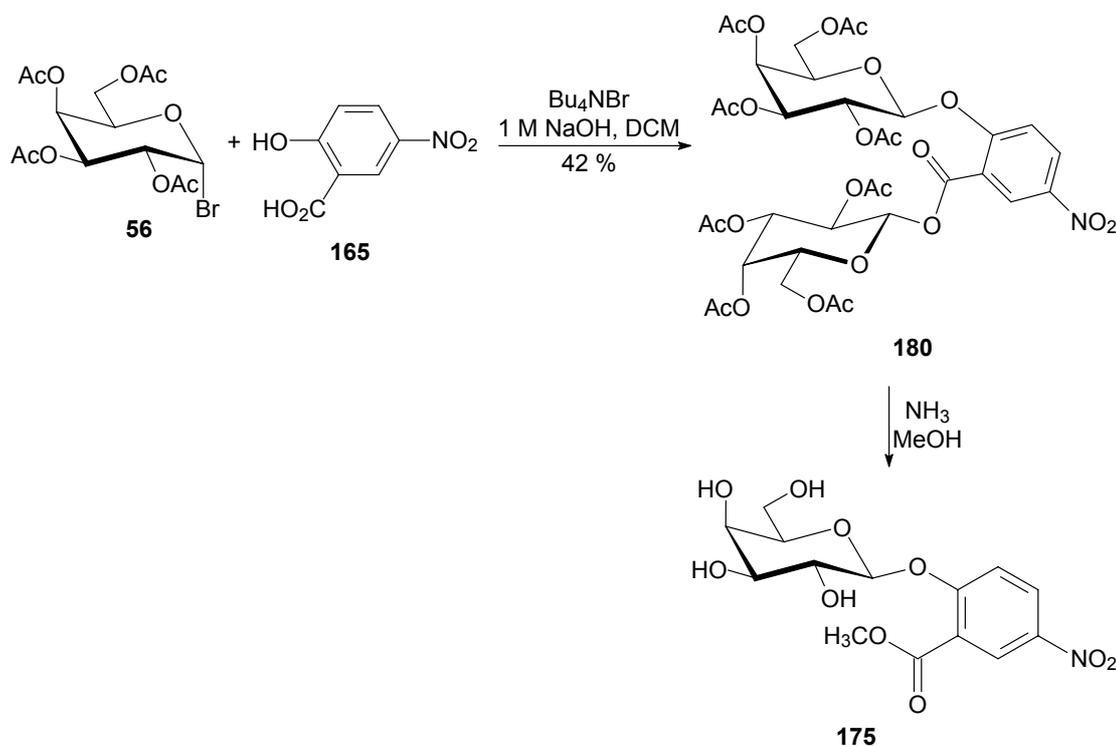
	Akzeptor-Phenol		peracetyliertes Arylglycosid	ungeschützter Donor
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>		
<b>164</b>	CHO	NO <sub>2</sub>	<b>170</b> , 59 %	<b>174</b> , 92 %
<b>166</b>	CO <sub>2</sub> Me	NO <sub>2</sub>	<b>171</b> , 72 %	<b>175</b> , 91 %
<b>167</b>	CH <sub>2</sub> OH	NO <sub>2</sub>	<b>172</b> , 53 %	<b>177</b> , 84 %
<b>169</b>	NO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> Me	<b>173</b> , 67 %	<b>178</b> , 88 %

**Abb. 77** Phasentransfer-katalysierte Galactosylierungen und nachfolgende Modifikationen

Die vier Galactosylierungsprodukte **170-173** wurden unter Standardbedingungen deacetyliert und eröffnen den Zugang zu neuartigen Derivaten von *p*NP-Gal, die am aromatischen Ring eine Aldehyd-, Ester- oder aliphatische Alkohol-Funktion aufweisen (Abb. 77). Der Aldehyd **174** ist etwa viermal besser in Wasser löslich als *p*NP-Gal.<sup>328</sup> Um weitere Funktionalitäten untersuchen zu können, wurden die Methylester **175** und **178** zu den entsprechenden freien Säuren **176** bzw. **179** verseift. Ein alternativer Zugang zum Benzylalkohol **177**, der die niedrige Ausbeute bei der Galactosylierung umgeht, besteht durch Reduktion des Benzoesäuremethylesters **175** mit Natriumborhydrid.

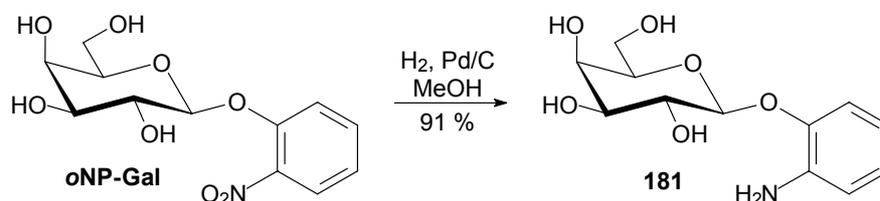
Die Darstellung der freien Säuren **176** bzw. **179** erfolgte über ihre entsprechenden Methylester, da es bei der Umsetzung der Benzoesäure **165** unter den Bedingungen der Phasentransferkatalyse nicht nur zur Galactosylierung der phenolischen Funktion kam, sondern auch ein

$\beta$ -Galactopyranose-Ester entstand und somit das Aglycon quasi bisglycosyliert wurde (Abb. 78). Die Bildung derartiger Kohlenhydratester ist bekannt,<sup>330</sup> es konnte aber trotz des Einsatzes von vier Äquivalenten Akzeptor kein anderes Glycosylierungsprodukt isoliert werden. Beim Versuch die Acetylgruppen von **180** mit Ammoniak in Methanol zu entfernen, kam es erwartungsgemäß zu einer Spaltung der Glycosyl-Ester-Bindung und das bekannte Derivat **175** wurde erhalten.



**Abb. 78** Bildung des Kohlenhydratesters **180**

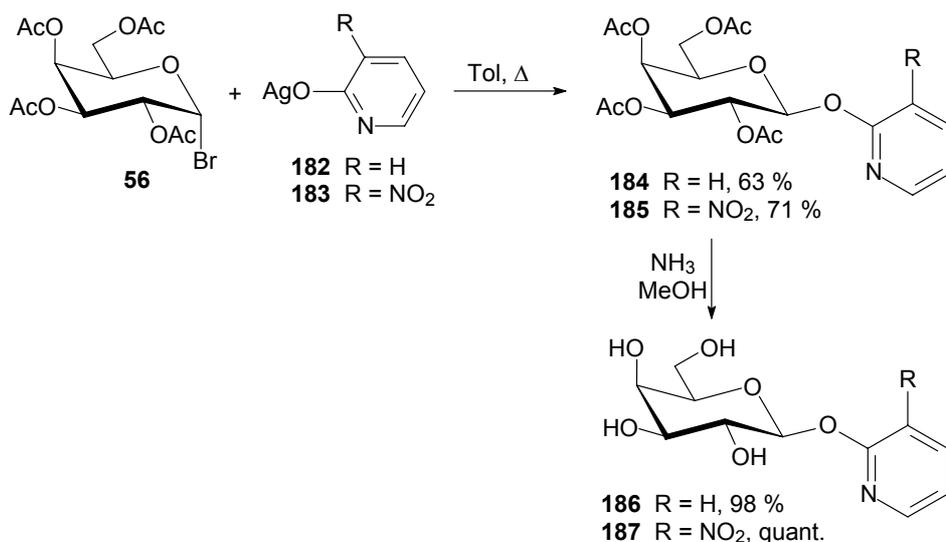
Eine weitere Funktionalität, die die Wasserlöslichkeit der  $\beta$ -Arylglycosid-Donoren erhöhen kann, ist die Aminogruppe. Durch Hydrierung der Nitrogruppe in *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid in Gegenwart von Palladium auf Aktivkohle wurde die Aminofunktion eingeführt und **181** in sehr guten Ausbeuten erhalten.



**Abb. 79** Reduktion von *o*NP-Gal

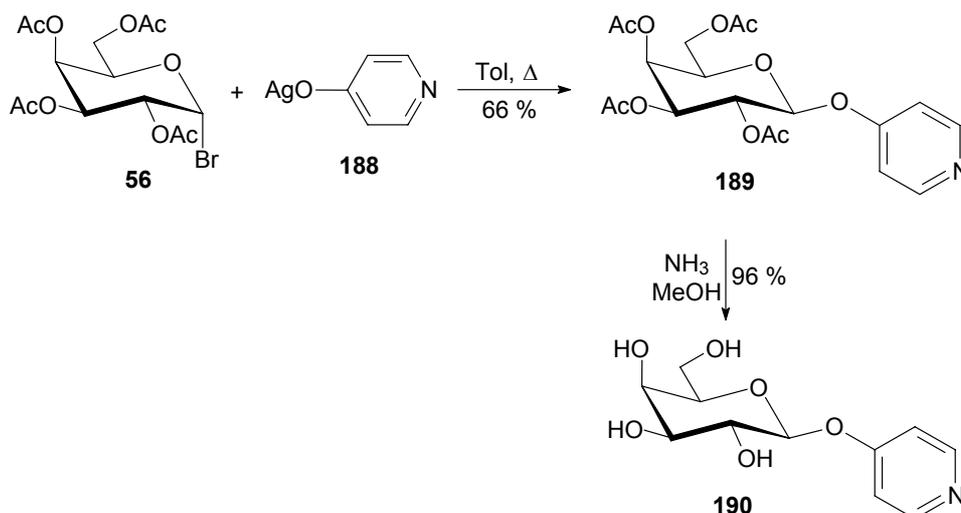
Hanessian *et al.* führten 2-Pyridyl- und 3-Methoxy-2-pyridylglycoside (MOP) als sehr gute anomere Aktivierungsgruppen ein, die eine latente Glycosyl-Imidat-Struktur besitzen und unter milden Bedingungen zur Glycosylierung fähig sind.<sup>331</sup> Die Aktivierung erfolgt durch Protonierung des Stickstoffs im Pyridin-Ring und ein 2[1H]-Pyridon wird abgespalten. Erfolgt eine

derartige Aktivierung des Donors nicht am anomeren Zentrum, wie es bereits bei 2-Pyridyl-1-thio-glycosiden gezeigt werden konnte, spricht man vom „*Remote Activation Concept*“.<sup>332</sup> Da es bei Verwendung der Phasentransfer-katalysierten Glycosylierung mit 2-Hydroxypyridinen häufig zur Bildung des entsprechenden *N*-Glycosids kommt, blieben die Ausbeuten bei den hier verwendeten Standardbedingungen unter 25 %. Die Synthese konnte aber mit den entsprechenden Silber-2-pyridoxinen, die aus den 2-Hydroxypyridinen durch Behandlung mit Silbernitrat im Basischen zugänglich sind, erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 80).<sup>333</sup> Für die Deacetylierung wurde Ammoniak in Methanol verwendet.



**Abb. 80** Darstellung der 2-Pyridyl- $\beta$ -D-galactopyranoside **186** und **187**

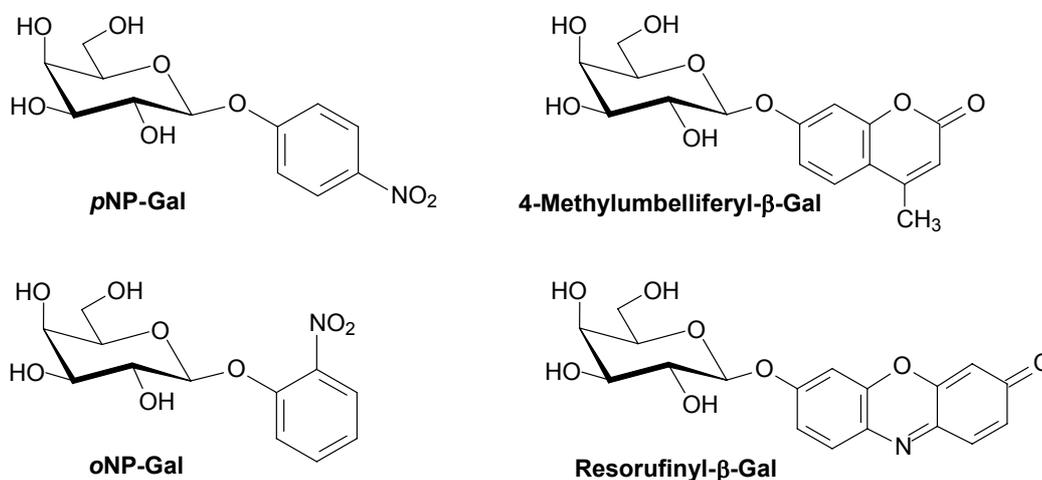
Analog konnte aus 4-Hydroxypyridin der Galactosyl-Donor 4-Pyridyl- $\beta$ -D-galactopyranosid **190** dargestellt werden.



**Abb. 81** Synthese von **190**

## 7.2.2. Donoreigenschaften

*p*-Nitrophenyl- (*p*NP-Gal) und *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (*o*NP-Gal) finden breite Anwendung bei der Transglycosylierung, da sie im Inkubationspuffer stabil sind, sehr effizient von  $\beta$ -Galactosidasen erkannt werden und ihre hohe Reaktivität eine zügige Übertragung des Galactosylrests auf den Akzeptor gewährleistet. In biochemischen Untersuchungen auf  $\beta$ -Galactosidaseaktivität werden häufig die ebenfalls kommerziell erhältlichen fluorogenen  $\beta$ -Galactoside von 4-Methylumbelliferon oder Resorufin verwendet (Abb. 82), die in Anwesenheit einer  $\beta$ -Galactosidase sehr schnell hydrolysiert werden.<sup>334</sup> Besonders Resorufinyl- $\beta$ -D-galactopyranosid wird im Vergleich zu *p*NP-Gal in einer zehnfach niedrigeren Konzentration mit ungefähr derselben Geschwindigkeit gespalten,<sup>335</sup> trotzdem ist seine Verwendung für Transglycosylierungen bisher nicht untersucht worden.



**Abb. 82** Kommerziell erhältliche Donoren

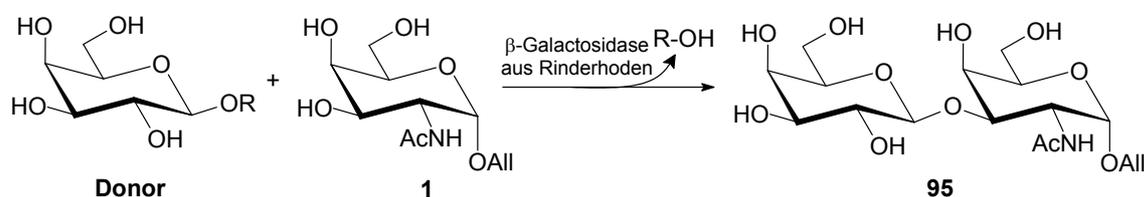
Bei der Analyse der Transglycosylierungsreaktionen mittels HPLC konnte sehr deutlich die Produktbildung beobachtet und quantifiziert werden. Auffallend war, dass sich die Ausbeuten bei den an unterschiedlichen Positionen substituierten *p*NP-Gal und *o*NP-Gal nicht nennenswert unterscheiden haben, die wesentlich unpolaren Donoren 4-Methylumbelliferyl- (MU-Gal) und Resorufinyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (Res-Gal) aber zu einem wesentlich geringeren Teil auf den Akzeptor  $\alpha$ -Allyl-GalNAc übertragen wurden. Für analytische Untersuchungen auf das Vorhandensein von  $\beta$ -Galactosidaseaktivität sind sie durch ihre starke Fluoreszenz und damit niedrige Nachweisgrenze hervorragend geeignet, für Synthesen im präparativen Maßstab ist ihre Löslichkeit im Reaktionsmedium Wasser und damit auch ihre Konzentration aber offensichtlich zu niedrig.

Die Substitution des aromatischen Rings mit einem Halogenid (**150-153**) zeigte keine nennenswerten Auswirkungen auf die Wasserlöslichkeit, schien jedoch einen geringen positiven Effekt

auf die Aktivität des Donors zu besitzen, der daraus resultierende Vorteil ist allerdings nur marginal und sollte mit Vorsicht interpretiert werden.

Das Einführen eines Methylsters (**175**, **178**) hatte genauso wenig Einfluss auf die Galactosylierung wie ein benzylicher Alkohol im Molekül (**163**, **177**), ein positiver Effekt durch höhere Donorkonzentrationen machte sich hier nicht bemerkbar. Eine Glycosylierung des Benzylalkohols im Rahmen einer intramolekularen Transglycosylierung<sup>336</sup> konnte nicht beobachtet werden. Die Ausbeuten bei Verwendung des Sesamol-Donors **154** oder des Aldehyds **174** waren gegenüber dem Vergleichsdonor *p*NP-Gal erhöht.

Die freien Benzoesäuren **176** und **179** zeigten trotz ihrer sehr guten Wasserlöslichkeit kaum Transglycosylierungspotential, bei Verwendung des Anilins **181** konnte gar keine Produktbildung beobachtet werden. Vermutlich gehen diese sehr reaktiven Funktionalitäten in der Bindungstasche des Enzyms starke Wechselwirkungen ein, da die Hydrolyse dieser drei Donoren nur ausgesprochen langsam erfolgte. Als katalytische Reste im aktiven Zentrum fungieren zwei Carboxygruppen. Zwischen diesen katalytischen Resten und den Carboxy-Gruppen der Donoren **176** und **179** kommt es vermutlich zu elektrostatischen Abstoßungen, die ein tieferes Eindringen verhindern. Beim Donor **181** kann die Protonierung statt am anomeren Sauerstoff auch an dem basischen Amin erfolgen, so dass die Bildung des Glycosyl-Enzym-Komplexes nicht mehr erfolgt.



Donor	ROH	Ausbeute [%]	Donor	ROH	Ausbeute [%]
<i>p</i> NP-Gal	<i>p</i> NP-OH	67	<b>174</b>	<b>164</b>	76
<i>o</i> NP-Gal	<i>o</i> NP-OH	69	<b>175</b>	<b>166</b>	64
MU-Gal	Me-Umbelliferon	40	<b>176</b>	<b>165</b>	7
Res-Gal	Resorufin	16	<b>177</b>	<b>167</b>	66
<b>150</b>	<b>140</b>	64	<b>178</b>	<b>169</b>	71
<b>151</b>	<b>141</b>	70	<b>179</b>	<b>168</b>	13
<b>152</b>	<b>142</b>	73	<b>181</b>	<b><i>o</i>NH<sub>2</sub>Ph-OH</b>	---
<b>153</b>	<b>143</b>	72	<b>186</b>	<b>182</b>	12
<b>154</b>	<b>144</b>	75	<b>187</b>	<b>183</b>	---
<b>163</b>	<b>160</b>	71	<b>190</b>	<b>188</b>	77

**Abb. 83** Transglycosylierung mit aromatischen Abgangsgruppen

Befanden sich dieselben Substituenten bei zwei Donoren an verschiedenen Positionen (**175** / **178**, **176** / **179**, **177** / **163**), war die Ausbeute der Transglycosylierung bei den Donoren mit *ortho*-

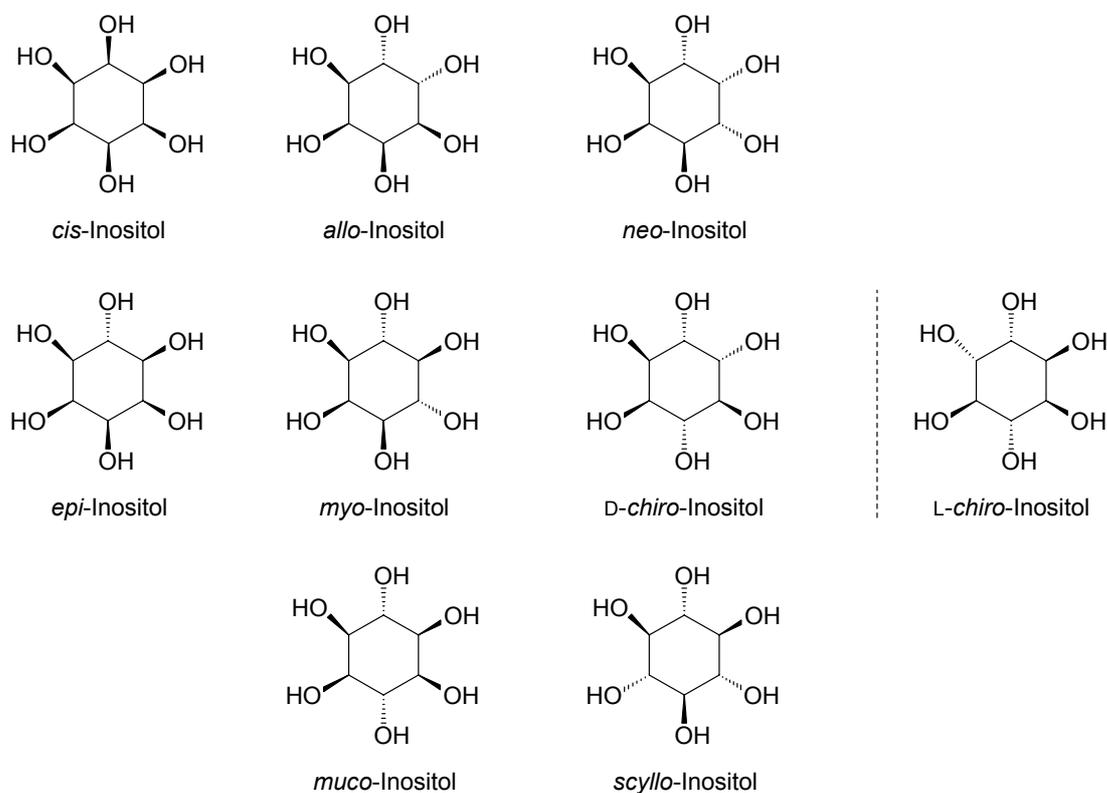
ständigem Substituenten geringfügig niedriger, es scheint zu einer leichten sterischen Hinderung bei der Bildung des Übergangszustandes zu kommen.<sup>337</sup> Eine Ausnahme bilden *p*NP-Gal und *o*NP-Gal.

Fukase und Kusumoto verwendeten die aus klassischen Glycosylierungen bekannten Nitro-2-pyridylglycoside erstmals für chemoenzymatische Glycosylierungen, da sie besser wasserlöslich und durch ihre latente Glycosyl-Imidat-Struktur chemisch reaktiver als die weit verbreiteten Nitrophenylglycoside sind.<sup>338</sup> Transglycosylierungen mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli* konnten durch die Verwendung der neuen Donoren mit höheren Konzentrationen durchgeführt werden und so gelang es die Ausbeuten merklich zu verbessern. Sie berichteten allerdings auch, dass die entsprechenden Methoxy-2-pyridylglycoside trotz ihrer höheren Wasserlöslichkeit schlechtere Ausbeuten bei der Transglycosylierung erbrachten als die Nitrophenylglycoside. Bei der chemischen Glycosylierung mit 2-Pyridyl-Donoren erfolgt eine Protonierung des Ringstickstoffs durch einen zugesetzten Katalysator. Bei einer Galactosidase würde diese Protonierung des basischen Stickstoffs durch eine Carboxygruppe im aktiven Zentrum erfolgen müssen. Die beiden Carboxygruppen der  $\beta$ -Galactosidase sind für ihre normale Funktion einen definierten Abstand voneinander entfernt (5.5 Å, Abb. 11), der Ringstickstoff des Pyridyl-Donors ist aber zwei Bindungslängen von der normalen Protonierungsposition für den anomeren Sauerstoff entfernt. Somit ist es fraglich, ob sich der Donor in geeigneter Weise in der Bindungstasche zur Ausbildung des Glycosyl-Enzym-Komplexes anordnen kann.

Bei der Transglycosylierung mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden konnte bei Verwendung des 3-Nitro-2-pyridyl-Donors **187** keine Produktbildung und nur eine teilweise Hydrolyse des Donors festgestellt werden. Mit dem 2-Pyridyl-Donor **186** erfolgte dagegen im geringen Maße die Galactosylierung des Akzeptors  $\alpha$ -Allyl-GalNAc. Die relative Nähe des basischen Stickstoffatoms scheint sich störend auf die reaktiven Carboxygruppen in der Bindungstasche auszuwirken. Ganz im Gegensatz dazu ermöglichte der Donor 5-Pyridyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (**190**) das Glycosylierungsprodukt in der besten Ausbeute aller untersuchter Donoren darzustellen. Da der Ringstickstoff *para* zur glycosidischen Bindung steht und damit deutlich von den Carboxygruppen des aktiven Zentrums entfernt ist, kann er nicht in den normalen Mechanismus der Hydrolyse (bzw. Transglycosylierung) eingreifen und der Glycosyl-Enzym-Komplex bildet sich unbeeinflusst aus. Die positive Ausbeute kann durch die sehr gute Wasserlöslichkeit, die sechs-mal höher als die der Nitrophenylglycoside ist, und die deshalb möglichen höheren Konzentrationen erklärt werden.

## 8. Enzymatische Galactosylierung von Inositolen

Als Inositole werden Cyclohexan-1,2,3,4,5,6-hexaole bezeichnet, eine Gruppe von sechswertigen cyclischen Alkoholen, die acht mögliche Diastereomere bilden können. Zur Unterscheidung der Isomeren werden kursive Präfixe verwendet, die charakteristisch sind für die relative Lage der einzelnen Hydroxygruppen zueinander (Abb. 84). Die *chiro*-Inositole bilden ein Enantiomerenpaar, so dass es insgesamt neun mögliche Stereoisomere gibt, die alle in der Natur vorkommen. Am weitesten verbreitet ist das *myo*-Inositol, welches frei im Muskelgewebe sowie in vielen pflanzlichen und tierischen Organen vorkommt und als Wachstumsfaktor zum Vitamin-B<sub>2</sub>-Komplex gerechnet wird. Die Aufnahme erfolgt für den Menschen hauptsächlich durch Obst und Getreide, in denen Phytinsäure (*myo*-Inositolhexaphosphat) eine Phosphat-Speicherfunktion erfüllt.



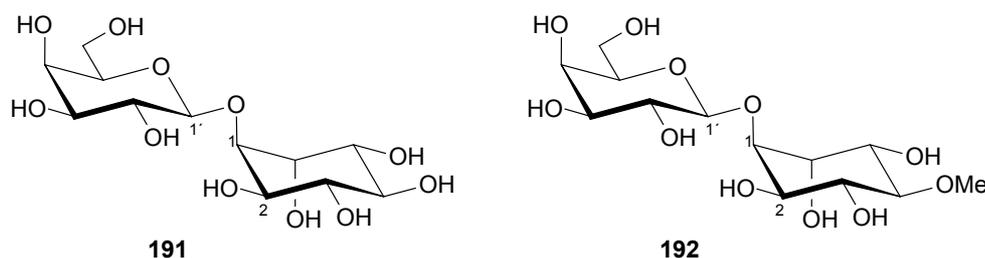
**Abb. 84** Übersicht über die neun möglichen Stereoisomere der Inositole

Inositolphosphoglycane, in denen *myo*-Inositol an D-Glucosamin<sup>339</sup> bzw. 1*D-chiro*-Inositol an D-Galactosamin<sup>340</sup> gekoppelt sind, wirken *in vivo* als „secondary messenger“ von Insulin und normalisieren den Glucose-Level im Blutplasma.<sup>341</sup> Wahrscheinlich bewirkt die Bindung von Insulin an geeignete Rezeptoren von Insulin-empfindlichen Zellen die Freisetzung dieser sekundären Botenstoffe aus Glycosylphosphatidylinositol-Ankern der äußeren Zellmembran.<sup>342,343</sup> Patienten mit einer Diabetes mellitus vom Typ 2, die nicht Insulin-abhängig ist, zeigen einen abnormalen Metabolismus des 1*D-chiro*-Inositols auf.<sup>344</sup> Eine Abnahme der Biosynthese von

1D-*chiro*-Inositol aus *myo*-Inositol auf der Phospholipid-Stufe<sup>345</sup> geht direkt mit einem niedrigeren Level des vermutlichen Insulin-Vermittlers einher.<sup>346</sup> Die verringerte physiologische Konzentration dieser Botenstoffe konnte mit der Ätiologie der Typ 2 Diabetes im Menschen korreliert werden,<sup>347</sup> und im Tiermodell gelang es durch intravenöse und orale Aufnahme von 1D-*chiro*-Inositol die diabetischen Symptome zu reduzieren.<sup>348</sup>

1D-*chiro*-Inositol und sein 3-*O*-Methylether (1D-Pinitol) sind Bestandteile von Oligosacchariden aus den Samen von Hülsenfrüchten wie Buchweizen,<sup>349</sup> Jojoba-Nüssen,<sup>350</sup> Soja-Bohnen,<sup>351</sup> Linsen und Kichererbsen.<sup>352</sup> In Buchweizen treten insgesamt sechs unterschiedliche Fagopyritole – Galactosylderivate des 1D-*chiro*-Inositols - auf, von denen das Fagopyritol B1 (1-D-2-*O*-( $\alpha$ -D-Galactopyranosyl)-*chiro*-inositol) den größten Anteil ausmacht.<sup>353</sup> Diese Fagopyritole der A und B Serie dienen der Stabilisierung von Organellen, Enzymen und anderen Proteinen während Trocknung und Lagerung der geernteten Samen.<sup>354</sup>

Da sich die einzelnen Hydroxygruppen der Inositele durch das Fehlen des Ringsauerstoffs und etwaiger primärer Gruppen hinsichtlich ihrer Reaktivität nicht unterscheiden, steht nur eine begrenzte Anzahl an Schutzgruppenstrategien für die Differenzierung der Hydroxygruppen zur Verfügung. Dadurch macht sich der inhärente Nachteil der umständlichen, arbeits- und zeitintensiven klassischen chemischen Synthese noch stärker bemerkbar als bei der gewöhnlichen Oligosaccharidsynthese.<sup>355-357</sup> Für die Darstellung von Inositolglycosiden bietet sich der Einsatz chemoenzymatischer Methoden, die eine Glycosylierung in nur einem Reaktionsschritt ermöglichen, geradezu an. Der charakteristischen Donor- und Akzeptorspezifität des verwendeten Enzyms entsprechend werden die Inositol-Akzeptoren mit unterschiedlicher Regio- und Stereoselektivität glycosyliert und somit lassen sich aus den gebildeten Produkten Rückschlüsse auf die Akzeptor-Toleranz der verwendeten Enzyme ziehen.



**Abb. 85** Produkte der chemoenzymatische Galactosylierung von 1D-*chiro*-Inositol und 1D-Pinitol mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*.<sup>174</sup> Die Galactosylierung an Position 6 von 1D-Pinitol führt zu einer Änderung der Nummerierung: die galactosylierte Position in **192** besitzt die höchste Priorität und wird zu Position 1 umnummeriert und der Methylsubstituent sitzt somit jetzt an Position 4, ohne dass er seine Position wirklich gewechselt hätte

Die bisher einzige Anwendung einer Glycosidase zur Synthese von Inositolglycosiden ist die Galactosylierung von 1D-*chiro*-Inositol und 1D-Pinitol mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (Biolacta<sup>TM</sup>).<sup>174</sup> 1D-*chiro*-Inositol wird dabei an einer der beiden Hydroxygruppen an

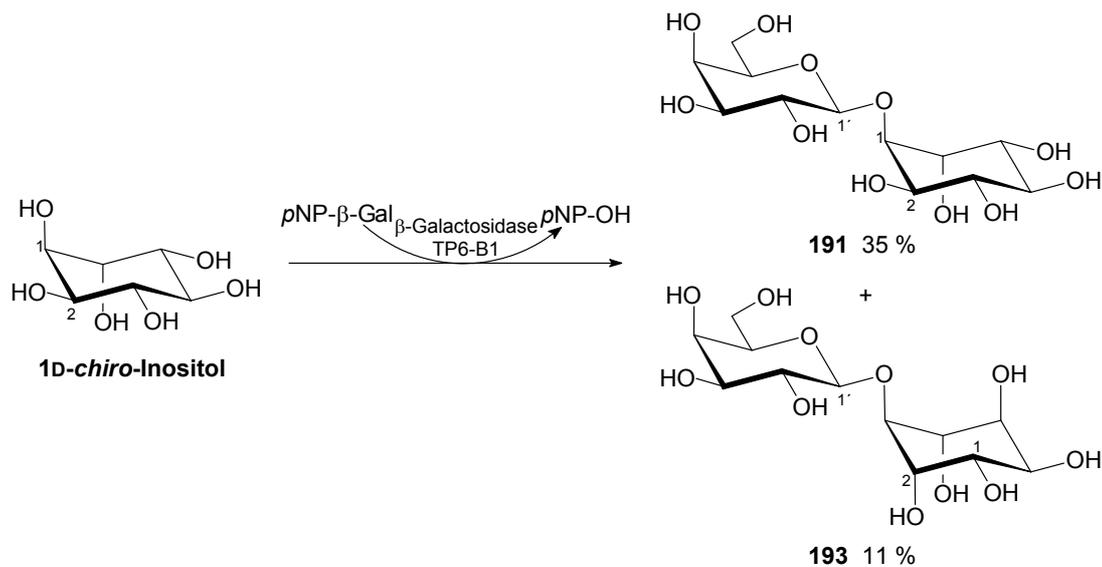
Position 1 oder 6, die aufgrund der C<sub>2</sub>-Symmetrie äquivalent sind, in 43 % Ausbeute galactosyliert (Abb. 85). Das entstandene Pseudo-Disaccharid **191** fungiert seinerseits auch als Akzeptor und es werden noch 9 % des an der Position 4' der Galactose glycosylierten Pseudo-Trisaccharids erhalten. Im Gegensatz dazu wird 1D-Pinitol (1D-3-*O*-Methyl-*chiro*-inositol) von der  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* ausschließlich an Position 6 galactosyliert, der axialen Hydroxygruppe, die vom Methylether weiter entfernt ist. Es können 45 % des Pseudo-Disaccharids **192** und 7 % des an der Position 4' der Galactose glycosylierten Pseudo-Trisaccharids isoliert werden. Eine Galactosylierung von *myo*-Inositol oder den L-Enantiomeren 1L-*chiro*-Inositol und 1L-Quebrachitol (1L-2-*O*-Methyl-*chiro*-inositol) mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (Biolacta<sup>TM</sup>) gelingt jedoch nicht.

Mit keiner der in den vorherigen Abschnitten verwendeten  $\beta$ -Galactosidasen aus Rinderhoden, *Bacillus circulans* (bgaC-Gen) und *Xanthomonas manihotis* oder der Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Umsetzung mit einem der erwähnten Inositole beobachtet werden.

Viele thermophile Enzyme besitzen eine breitere Substratspezifität als ihre mesophilen Gegenstücke, da das aktive Zentrum bei höheren Temperaturen beweglicher ist; es darf für den Erhalt der Funktionalität nicht so dicht gepackt sein wie der Rest des Proteins. Nach der Arrhenius-Beziehung müsste ein thermophiles Enzym eine höhere katalytische Umsatzrate haben. Dem wirkt allerdings entgegen, dass die strukturellen Voraussetzungen für ein thermostabiles dreidimensionales Makromolekül auch funktionelle Auswirkungen haben. In der Realität haben somit funktionell verwandte Enzyme von Mikroorganismen unterschiedlicher thermischer Biotope ähnliche katalytische Raten bei ihrer jeweiligen optimalen Wachstumstemperatur, eine Tatsache die im präexponentiellem Faktor der Arrhenius-Gleichung berücksichtigt ist.<sup>358</sup>

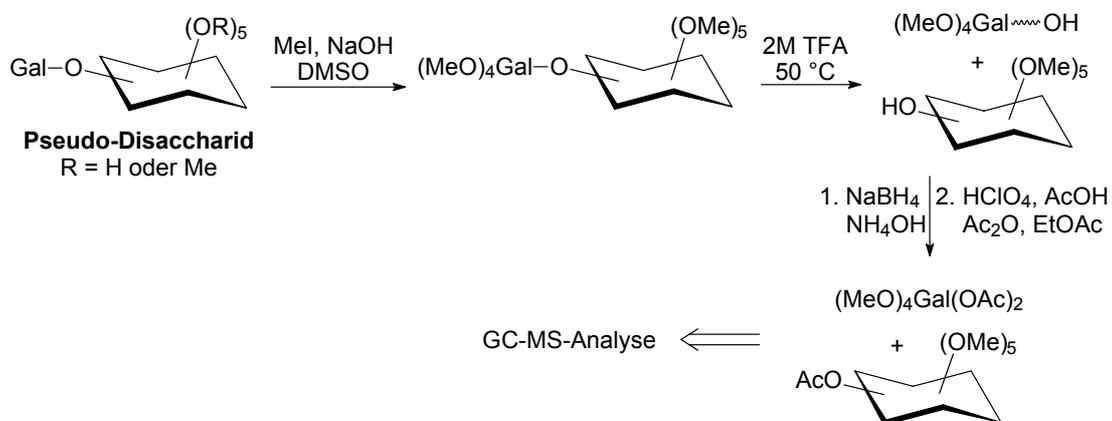
Aus einer heißen Quelle in der Nähe von Taupo, Neuseeland konnte *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1 isoliert werden, ein anaerober Gram-negativer extremer Thermophil.<sup>359</sup> Dieses Bakterium enthält eine intrazelluläre  $\beta$ -Galactosidase, die Lactose sowie *p*- und *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid als Substrate erkennt. Erste Untersuchungen zu den optimalen Inkubationsbedingungen ergaben, dass die neue  $\beta$ -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. TP6-B1 die höchste Aktivität in einem Phosphat-Citrat-Puffer bei pH 7.0 und 37 °C besitzt. Interessanterweise erfolgte bei höheren Temperaturen kein nennenswerter Umsatz mehr, das Enzym besitzt anscheinend eine geringere Thermostabilität als bei seinen Lebensbedingungen zu erwarten wäre. Dies ist eine häufig angewandte Strategie bei thermophilen Organismen, da ein schneller Abbau und eine schnelle Resynthese des Enzyms eine zeitlich enge Aktivitätskontrolle seiner Biofunktion ermöglichen. In Gegenwart der gängigen Monosaccharide D-Glucose, D-Galactose, D-Mannose, *N*-Acetyl-D-glucosamin und *N*-Acetyl-D-galactosamin oder ihrer entsprechenden  $\alpha$ -*O*-Methylglycoside konnte keine Galactosylierung der potentiellen Akzeptoren mit dem Donor *p*NP-Gal beobachtet werden.

Im Gegensatz zur selektiven Galactosylierung von 1D-*chiro*-Inositol mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* ausschließlich an Position 1,<sup>174</sup> wurde bei der Umsetzung mit dem Enzym aus *Thermoanaerobacter* sp. TP6-B1 die Bildung eines Produktgemisches aus zwei Pseudo-Disacchariden im Verhältnis 10:3 mit einer Gesamtausbeute von 46 % beobachtet (Abb. 86). Die NMR-spektroskopische Untersuchung der Produktmischung ergab, dass es sich bei dem Hauptprodukt um das bereits bekannte 1-D-1-O-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*chiro*-inositol **191** handelte. Eine eindeutige Identifizierung des Nebenprodukts **193** war aufgrund der Komplexität der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren aber nicht zweifelsfrei möglich.



**Abb. 86** Galactosylierung von 1D-*chiro*-Inositol

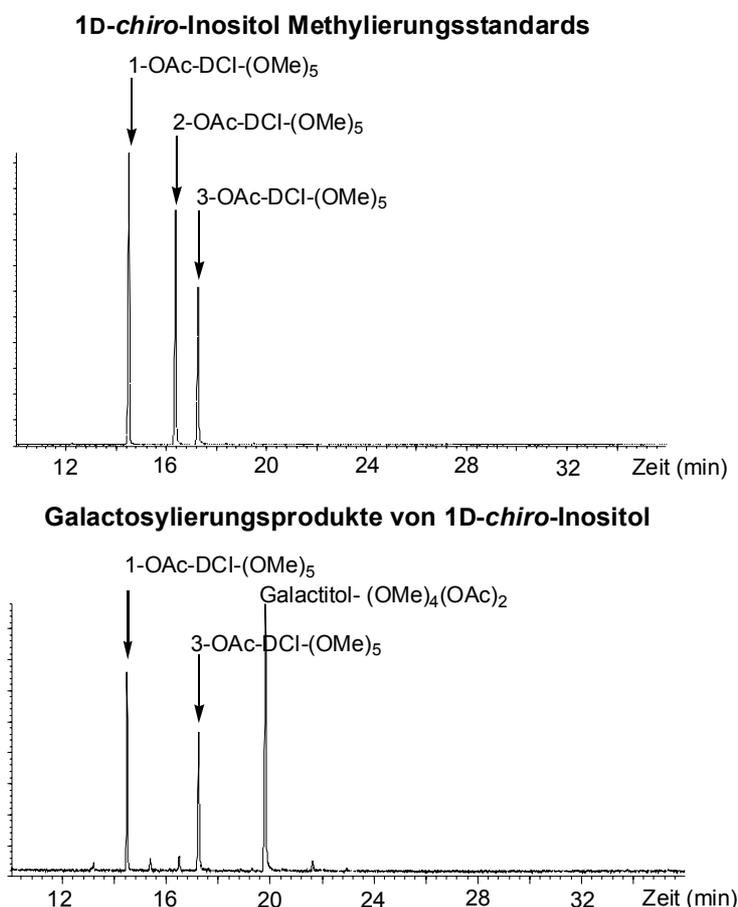
Um den Ort der Verknüpfung von **193** ermitteln zu können und auch bei den folgenden Galactosylierungen anderer Inositole die eindeutige Identifizierung der Produkte sicherzustellen, erfolgte eine Permethylierungsanalyse mittels Gaschromatographie (Abb. 87).



**Abb. 87** Prinzip der Permethylierungsanalyse<sup>360</sup>

Verschiedene penta-*O*-methylierte und mono-*O*-acetylierte Vergleichsstandards von *chiro*- und *myo*-Inositol können gaschromatographisch sehr gut getrennt werden. Die entsprechenden derivatisierten Reaktionsproduktgemische aus den chemoenzymatischen Galactosylierungen wurden ebenfalls per GC-MS untersucht und mit den Retentionszeiten der Standards verglichen. Auf diese Weise konnte der Ort der Verknüpfung eindeutig nachgewiesen und das Verhältnis der einzelnen Produkte zueinander quantifiziert werden.<sup>360</sup>

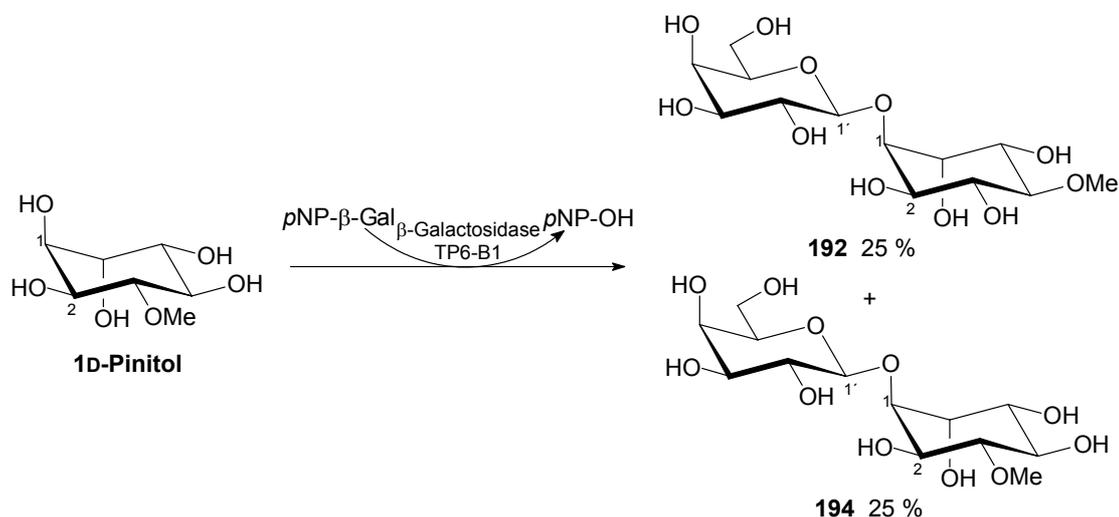
Das Potential dieser Methode konnte sehr gut bei der Analyse des Produktgemisches der Galactosylierung von 1*D*-*chiro*-Inositol demonstriert werden (Abb. 88). Durch Vergleich mit den Retentionszeiten der Vergleichsstandards ließ sich eindeutig zeigen, dass das Hauptprodukt an Position 1 galactosyliert wurde, das Nebenprodukt dagegen an Position 3 (Abb. 86).



**Abb. 88** GC-MS-Analyse des Produktgemisches der Galactosylierung von 1*D*-*chiro*-Inositol (DCI)<sup>360</sup>

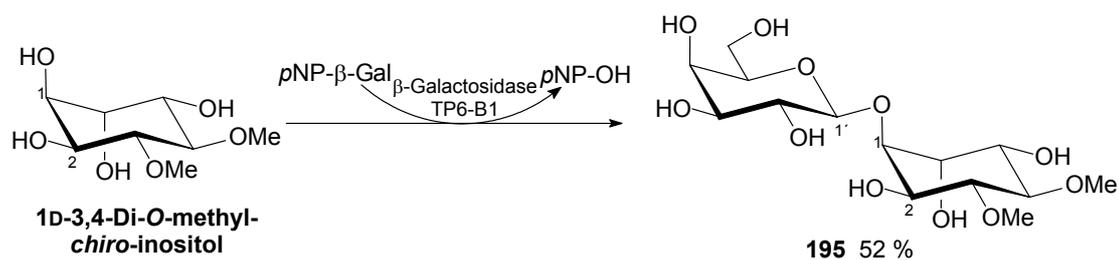
Bei der Galactosylierung von 1*D*-Pinitol (1*D*-3-*O*-Methyl-*chiro*-inositol) mit der  $\beta$ -Galactosidase TP6-B1 wurde ein äquimolares Gemisch zweier Produkte in einer Gesamtausbeute von 50 % erhalten (Abb. 89). NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass es sich um die an Position 1 bzw. 6 galactosylierten Inositole handelt. Für das aktive Zentrum der  $\beta$ -Galactosidase TP6-B1 scheint die Methylgruppe des 1*D*-Pinitols keinen störenden Einfluss zu besitzen, da die beiden Regioisomere **192** und **194** durch Galactosylierung der axialen Hydroxygruppe in

Position 6 respektive 1 im gleichen Maße gebildet wurden. Dieses Ergebnis konnte durch eine gaschromatographische Methylierungsanalyse bestätigt werden. Die  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* glycosyliert dagegen nur die axiale Hydroxygruppe an Position 6, die am weitesten von dem Methylether entfernt ist, unter der alleinigen Bildung von **192**.<sup>174</sup>



**Abb. 89** 1D-Pinitol als Akzeptor der  $\beta$ -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1 (zur Nummerierung siehe Abb. 85)

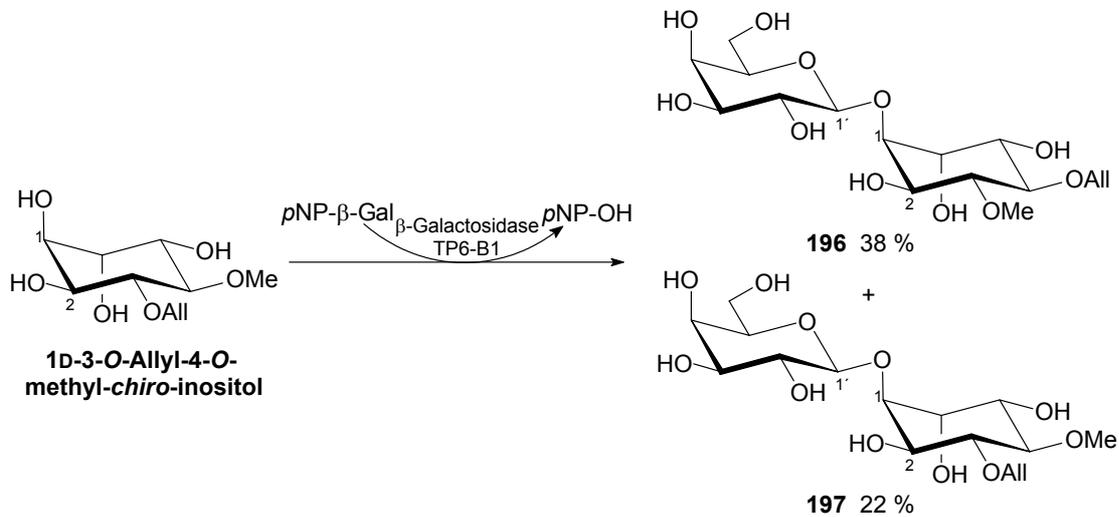
Bei der Galactosylierung von 1D-3,4-Di-*O*-methyl-*chiro*-inositol<sup>361</sup> mit  $C_2$ -Symmetrie mit der  $\beta$ -Galactosidase TP6-B1 wurde nur ein Produkt in sehr guten 52 % Ausbeute isoliert, da die beiden potentiellen Galactosylierungsstellen 1 und 6 äquivalent sind und dasselbe Pseudo-Disaccharid **195** ergeben (Abb. 90). Dies steht in Einklang mit der Bildung von **192** und **194** bei der Galactosylierung von 1D-Pinitol in einer vergleichbaren Gesamtausbeute, es ist also nicht relevant, ob der Methylether zwei oder drei Positionen entfernt ist.



**Abb. 90** Darstellung von **195**

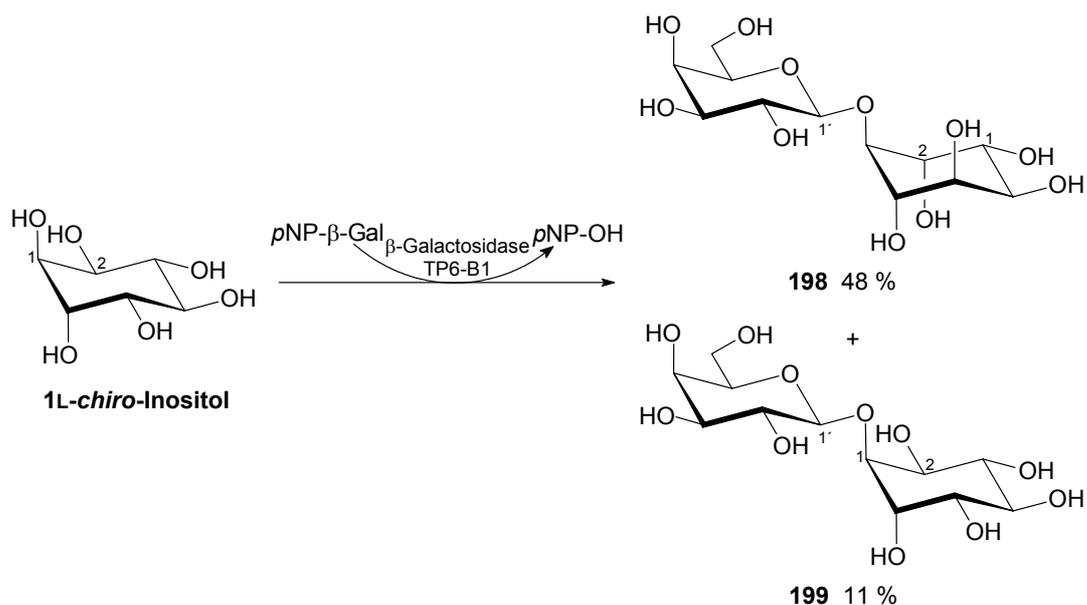
Ein Gemisch aus zwei Pseudo-Disacchariden im Verhältnis 16:9 und einer Gesamtausbeute von 60 % wurde bei der chemoenzymatischen Galactosylierung von 1D-3-*O*-Allyl-4-*O*-methyl-*chiro*-inositol<sup>360</sup> erhalten (Abb. 91). Mittels NMR-Spektroskopie konnte eindeutig gezeigt werden, dass das Hauptprodukt **196** dieser Reaktion durch Galactosylierung der axialen, von der Allylgruppe weiter entfernten Hydroxygruppe (ehemals Position 6) zustande kam. Das in geringeren Mengen gebildete **197** entstand durch Glycosylierung der axialen Hydroxygruppe in

Position 1, die näher an der sterisch leicht anspruchsvolleren Allylgruppe liegt. Dieser Einfluss der Allylgruppe auf die Regioselektivität der Glycosylierung konnte nach Methylierung des Produktgemisches per GC-MS-Analyse bestätigt werden.



**Abb. 91** Chemoenzymatische Galactosylierung von 1D-3-O-Allyl-4-O-methyl-*chiro*-inositol

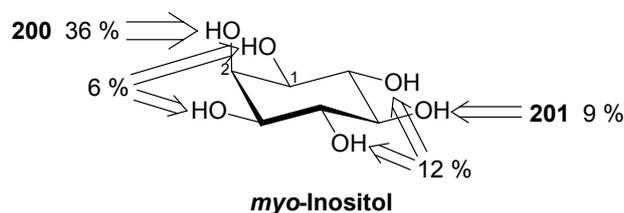
Die Inkubation von 1L-*chiro*-Inositol, dem Enantiomeren von 1D-*chiro*-Inositol, mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1 lieferte ebenfalls zwei Produkte, die sich aber an Biogel P-2 säulenchromatographisch leicht trennen ließen. Bei dem Hauptprodukt, isoliert in 48 % Ausbeute, handelte es sich um das an Position 3 von 1L-*chiro*-Inositol galactosylierte Pseudo-Disaccharid **198**. Das analoge mit dem Inositol an Position 1 verknüpfte Produkt **199** konnte in einer Ausbeute von 11 % gewonnen werden (Abb. 92).



**Abb. 92** 1L-*chiro*-Inositol als Akzeptor der  $\beta$ -Galactosidase TP6-B1

Auch in diesem Fall wurde die aus dem NMR-Spektrum ermittelte Verknüpfung durch die Methylierungsanalyse bestätigt. Bei der Umsetzung mit dem entsprechenden an Position 2 methylierten 1L-Quebrachitol (1L-2-*O*-Methyl-*chiro*-inositol) konnte hingegen keine Produktbildung beobachtet werden. Anscheinend wird der Akzeptor von der  $\beta$ -Galactosidase TP6-B1 nicht erkannt, wenn sich in direkter Nachbarschaft der zu glycosylierenden Hydroxygruppe ein Methylsubstituent befindet.

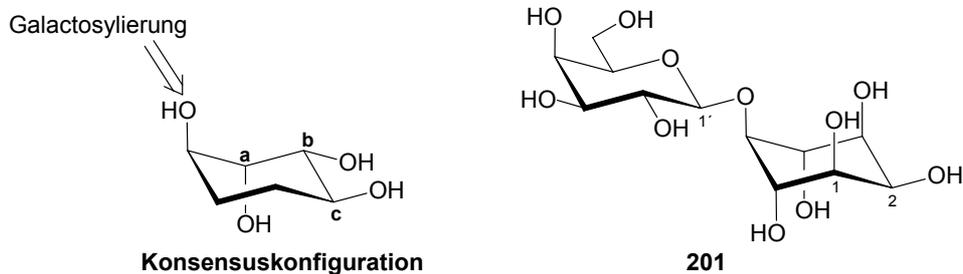
Bei der chemoenzymatischen Galactosylierung von *myo*-Inositol mit dem Enzym aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1 wurde in einer Gesamtausbeute von 63 % ein nicht zu trennendes Gemisch aus vier Pseudo-Disacchariden erhalten (Abb. 93). Zur Identifizierung der Regioisomeren, wurde die Produktmischung einer Methylierungsanalyse mittels GC-MS unterzogen. Das größte Signal entspricht einer Galactosylierung an Position 2, so dass es sich bei dem Hauptprodukt mit einer Ausbeute von 36 % um 2-*O*-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*myo*-inositol **200** handelt. Das über Position 5 verknüpfte Produkt 5-*O*-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*myo*-inositol **201** wurde laut Chromatogramm in 9 % Ausbeute gebildet. Das zweithöchste Signal wurde durch eine Galactosylierung an Position 4 oder 6 des *myo*-Inositols hervorgerufen, da die beiden entsprechenden Vergleichstandards der Methylierungsanalyse aber Enantiomere sind, würde für ihre Trennung eine chirale Gaschromatographie nötig sein, die nicht zur Verfügung stand. Es kann somit nur gesagt werden, dass 12 % von 1*D*- oder 1*L*-4-*O*-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*myo*-inositol gebildet wurde, aber nicht welches der Pseudo-Disaccharide oder ob evtl. sogar beide entstanden sind. Dasselbe Problem tritt bei einer Galactosylierung der 1- oder 3-Hydroxygruppe auf, so dass 1*D*- oder 1*L*-1-*O*-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*myo*-inositol in einer Ausbeute von 6 % erhalten wurden. Ohne zu wissen, welche der Enantiomere entstanden sind, können keine weiteren Aussagen zur Enzymspezifität aus der Galactosylierung von *myo*-Inositol gemacht werden, außer dass die Regioselektivität sehr gering ist und abgesehen von Position 2 kein bevorzugter Ort für die Galactosylierung vorhanden war.



**Abb. 93** Positionen der Galactosylierung von *myo*-Inositol

Die  $\beta$ -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1 besitzt eine sehr breite Toleranz gegenüber unterschiedlichen Inositol-Akzeptoren und ihren verschiedenen Derivaten, ganz im Gegensatz zu der bereits untersuchten  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. Zusammenfassend lässt sich jedoch eine Konsensuskonfiguration für eine optimale Erkennung und Galactosylierung durch das Enzym erkennen (Abb. 94). Die besten Ausbeuten bei der Galactosylierung an

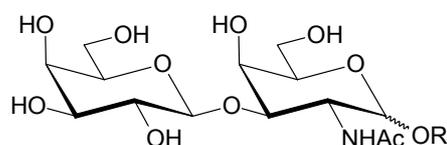
der hervorgehobenen axialen Hydroxy-Funktion werden erhalten, wenn die Hydroxygruppe **a** axial und die Gruppen **b** und **c** äquatorial orientiert sind (im Fall von **191**, **192/194**, **195**, **196/197** und **198**). Die Ausbeute fällt niedriger aus und das gebildete Pseudo-Disaccharid ist nur ein Nebenprodukt, wenn sich nur zwei der drei Gruppen **a-c** in optimaler Konfiguration befinden: **a** und **c** (**193** und **201**) bzw. **b** und **c** (**199** und **200**). Eine Methylierung der Position **c** hat keine Auswirkung auf das Ergebnis der Glycosylierung (vgl. Abb. 89), weswegen dieser Gruppe möglicherweise eine Funktion als Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung zukommt, die auch eine Etherbrücke erfüllen kann. Da 1L-Quebrachitol nicht galactosyliert wird, eine Methylierung an Position **a** also die Erkennung verhindert, fungiert diese Hydroxygruppe entweder als Donor für eine Wasserstoffbrückenbindung oder die Methylgruppe ist sterisch zu anspruchsvoll für die Bindungstasche. Dies erklärt auch, warum D-Galactose nicht als Akzeptor erkannt wird.



**Abb. 94** Vorgeschlagene Konsensuskonfiguration für die Erkennung durch die  $\beta$ -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1 und mögliche Konfiguration von *myo*-Inositol zur Galactosylierung an Position 5 (Bildung von **201**, vgl. Abb. 93)

## 9. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Darstellung einer Vielzahl modifizierter Derivate der T-Antigen-Determinante Gal $\beta$ 1-3GalNAc mit chemoenzymatischen Methoden. In allen Fällen erfolgte die Modifikation an dem jeweiligen monomeren Baustein vor der Bildung des entsprechenden Disaccharids. Für die Knüpfung der glycosidischen Bindung fanden die  $\beta$ -Galactosidasen aus Rinderhoden, *Bacillus circulans* (bgaC-Gen) und *Xanthomonas manihotis* sowie eine Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* Anwendung. Der Einfluss der unterschiedlichen Akzeptor-Strukturen auf Ausbeute und Regioselektivität der Glycosylierung erlaubte es Rückschlüsse auf die Substratspezifität der verwendeten Enzyme zu ziehen.



T-Antigen-Determinante (Gal $\beta$ 1-3GalNAc1-OR)

Für die Darstellung verschiedener  $\alpha$ -konfigurierter *O*-Glycoside von GalNAc wurden mehrere Synthesewege von der direkten Fischer-Glycosylierung mit GalNAc bis zur Azidonitratisierung nach Lemieux mit anschließender Glycosylierung mit dem entsprechenden Trichloracetimidat-Donor **5** untersucht. Hinsichtlich der Kosten der Edukte und synthetischem Aufwand hat sich die Epimerisierung der entsprechenden GlcNAc-Derivate in Form ihrer 3,6-Dipivalote als besonders vorteilhaft erwiesen. Auch für die Darstellung des 1,5-Anhydrogalactitols **42** wurde die Epimerisierung des entsprechenden Glucitols mit Erfolg angewendet. Die chemoenzymatische Galactosylierung der  $\alpha$ -konfigurierten Methyl- (**18**), Allyl- (**1**), Benzyl- (**20**) und 2-(Trimethylsilyl)ethyl- (**21**) Glycoside von GalNAc sowie von **42** lieferten stets die  $\beta$ 1-3-verknüpften Disaccharide in guten bis sehr guten Ausbeuten. Bei Verwendung der  $\beta$ -Galactosidasen aus *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans* konnte das ebenfalls gebildete 1-6-Regioisomer im Anschluss an die Transglycosylierung durch Zugabe der  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli* hydrolysiert werden. Das gleichfalls dargestellte  $\beta$ -Thioglycosid **33** zeigte bei allen Enzymen inhibitorische Eigenschaften und konnte nicht galactosyliert werden. Dagegen ließen sich *C*-Glycoside als Akzeptoren für die Galactosylierung einsetzen.

In den Untersuchungen zur Darstellung von 2-Desoxy- $\alpha$ -glycosiden zeigte sich bei einfachen Aglycon-Strukturen die Falck-Mioskowski-Methode hinsichtlich Selektivität und Ausbeute der NBS-/NIS-Methode und der Glycosylierung nach Sabesan überlegen. Alle Enzyme glycosylierten die  $\alpha$ -verknüpften 2-Desoxy-glycoside in niedrigeren Ausbeuten als die 2-Acetamidoverbindungen, eine Verminderung der Regioselektivität wurde dagegen nicht beobachtet. Die  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden glycosylierte allerdings Methyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**51**) regio-spezifisch in Position 3, bei Verwendung des entsprechenden 2-Desoxy- $\beta$ -glycosids

**52** als Akzeptor entstand ebenfalls das  $\beta$ 1-6-Regioisomer im Verhältnis 2:1. Die chemoenzymatische Galactosylierung von  $\beta$ -Alkylgalactosiden verlief mit den  $\beta$ -Galactosidasen nur in niedrigen Ausbeuten, und es entstand ein Gemisch aus  $\beta$ 1-3- und  $\beta$ 1-6-verknüpften Produkten. Interessanterweise konnte mit dem Enzym aus Rinderhoden ein Wechsel der Regioselektivität beobachtet werden: während das Allyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (**59**) eher an Position 3 galactosyliert wurde, entstand beim entsprechenden 2-(Trimethylsilyl)-ethylderivat **60** bevorzugt das  $\beta$ 1-6-verknüpfte Produkt (Verhältnis 3:1). Mit der Phosphorylase konnte in keinem Fall eine Umsetzung beobachtet werden.

D-Galactal (**62**) ließ sich nicht von den  $\beta$ -Galactosidasen glycosylieren, gab aber bei der selektiven Acetylierung an Position 6 mit der Lipase aus *Candida rugosa* das acetylierte Galactal **64**. Mit diesem lieferten alle Enzymen regiospezifisch das  $\beta$ 1-3-verknüpfte Produkt. Die entsprechenden Inkubationen mit den *gluco*-konfigurierten Derivaten **61** und **63** ergaben mit den Enzymen aus *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans* das an Position 3 galactosylierte Glucal in vergleichbaren Ausbeuten. Die  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden führte in guten Ausbeuten zur Bildung eines Regioisomerengemisches durch Glycosylierung an den beiden äquatorialen Positionen 3 und 4 im Verhältnis 3:1 beim ungeschützten Akzeptor **61** und 13:1 im Falle des an Position 6 acetylierten D-Glucals (**63**). Die durch Hydrierung von D-Galactal erhältliche 1,2-Didesoxyverbindung **66** wurde von allen verwendeten Enzymen in guten bis sehr guten Ausbeuten in Position 3 galactosyliert.

$\alpha$ -Allyl-GlcNAc (**8**) und die entsprechenden Methyl- (**24**) und Benzyl- (**25**) Derivate wurden von den  $\beta$ -Galactosidasen aus *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans* in guten Ausbeuten regioselektiv an Position 3 glycosyliert. Das Enzym aus Rinderhoden ergab dagegen, wie bereits beim D-Glucal, ein Regioisomerengemisch aus dem  $\beta$ 1-3- und dem  $\beta$ 1-4-Produkt, wobei die Regioselektivität mit steigendem sterischen Anspruch des Aglycons zunahm. Diese Beobachtung wurde bei der Galactosylierung des 1,5-Anhydroglucitols (**45**) bestätigt: bei Umsetzung mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden überwog das an Position 4 galactosylierte Produkt, die anderen eingesetzten Enzyme ergaben ausschließlich das  $\beta$ 1-3-verknüpfte Disaccharid. Das an Position 4 desoxygenierte  $\alpha$ -Allylderivat **69** konnte in hervorragenden Ausbeuten mittels Barton-McCombie-Desoxygenierung gewonnen werden, und es wurde von allen zur Verfügung stehenden Enzymen ausschließlich an Position 3 galactosyliert. Das 4-Fluorderivat **77** mit *galacto*-Konfiguration wird dagegen von keinem der Enzyme akzeptiert.

Die Darstellung des 2,4-Didesoxyderivats **73** erfolgte ebenfalls durch Barton-McCombie-Desoxygenierung der Position 4 vom Allyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**54**) ausgehend. Die anschließende chemoenzymatische Umsetzung mit den  $\beta$ -Galactosidasen verlief relativ unspezifisch unter der Bildung von Gemischen, in denen das an Position 6 glycosylierte Produkt den größeren Anteil gegenüber dem  $\beta$ 1-3-verknüpften Disaccharid ausmachte. Die Phosphorylase erkannte den so modifizierten Akzeptor nicht mehr. Die Darstellung von  $\alpha$ -Allyl-FucNAc (**80**)

und den an den Positionen 2 (**85**) bzw. 4 (**94**) desoxygenierten FucNAc-Derivaten wurde durchgeführt, allerdings wurde mit keinem dieser Akzeptoren die Galactosylierung mit einer der  $\beta$ -Galactosidasen beobachtet.

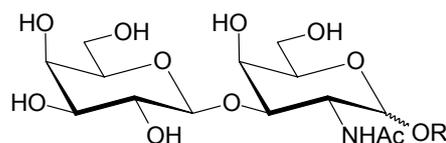
In einem zweiten Teil zur Darstellung von Derivaten der T-Antigen-Determinante wurde der Einsatz modifizierter Donoren für die chemoenzymatische Galactosylierung mit der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden untersucht. Es gelang den Referenz-Akzeptor  $\alpha$ -Allyl-GalNAc nicht nur mit *p*NP-Gal, sondern ebenfalls mit den an Position desoxygenierten und verkürzten Donoren *p*NP-D-Fuc bzw. *p*NP-L-Ara zu glycosylieren, wobei es zu einer geringen Abnahme der Ausbeute kam. Die Umsetzung von *p*NP-Gal mit der Galactoseoxidase aus *Dactylium dendroides* lieferte den Aldehyd **128** als oxidierten Donor, der aber nicht von dem Enzym aus Rinderhoden erkannt wurde. Dies gilt ebenfalls für das 6-Fluoro-*p*NP-Gal (**129**), bei dessen Synthese die Bildung des neuartigen Donors **133** erfolgte, der durch Eliminierung eine exocyclische Doppelbindung erhielt. Während **133** von der  $\beta$ -Galactosidase nicht erkannt wurde, konnte ein um einen Kohlenstoff verlängerter Donor **136** mit vinyli-scher Doppelbindung regioselektiv auf Position 3 von  $\alpha$ -Allyl-GalNAc übertragen werden. Der an Position 4 epimerisierte Donor *p*NP-Glc wurde ebenfalls erkannt, allerdings erfolgte die Transglycosylierung ausschließlich auf die primäre Alkoholfunktion des Akzeptors in guten Ausbeuten. Während eine Galactosylierung von D-Galactal (**62**) mit *p*NP-Gal nicht möglich war, konnte eine langsame Addition von Wasser an die Doppelbindung beobachtet werden. Unter optimierten Reaktionsbedingungen gelang die Umsetzung von **62** mit  $\alpha$ -Allyl-GalNAc in der Gegenwart der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden unter regiospezifischer Bildung des Disaccharids 2dGal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -OAll (**139**).

In einer vergleichenden Untersuchung mit *p*NP-Gal als Referenz-Donor wurden mehrere potentielle Donoren für  $\beta$ -Galactosidasen mit unterschiedlichen Abgangsgruppen synthetisiert und mit dem Enzym aus Rinderhoden umgesetzt. Einsatz fanden zunächst Disaccharide mit einer  $\beta$ -verknüpften Galactose am nichtreduzierenden Ende, wobei die Ausbeuten der Transglycosylierung allerdings niedrig ausfielen. Ferner wurde eine große Zahl neuartiger  $\beta$ -Arylgalactoside in der Regel durch Phasentransferkatalyse dargestellt, die als Abgangsgruppe unterschiedliche halogenierte Phenole, Benzylalkohol, Benzoesäure, Benzoesäuremethylester, Benzaldehyd oder ein Anilin enthalten. Erwähnt sei das Auftreten einer intermolekularen Acetylgruppenwanderung auf die benzyli-sche Alkoholgruppe bei der Galactosylierung von Hydroxybenzylalkoholen, z. B. **160** oder **167**. Die Synthese der ebenfalls untersuchten Pyridylglycoside erfolgte durch Umsetzung mit den jeweiligen Silberpyridoxinen. Bei der Transglycosylierung zeigten die Donoren mit halogenierten Phenolen, Benzylalkoholen oder Benzoesäuremethylestern als Abgangsgruppen keinen Einfluss auf die Ausbeuten. Eine leichte Verbesserung der Ausbeuten konnte mit einem Benzaldehyd als Abgangsgruppe erreicht werden, wohingegen Benzoesäuren oder Aniline niedrige bis gar keine Ausbeuten ergaben. Schließlich zeigten auch die kommerziell erhältlichen, unpolaren Glycosyldonoren Resorufinyl- und 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -Gal ein niedrigeres Transglycosylierungspotential als *p*NP-Gal.

Im abschließenden Teil der Arbeit wurde eine neue thermophile  $\beta$ -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1 zur chemoenzymatischen Galactosylierung von verschiedenen Inositolen verwendet. Hierbei handelt es sich erst um das zweite Beispiel der Anwendung einer  $\beta$ -Galactosidase für die Synthese derartiger Pseudo-Disaccharide mit einer deutlich breiteren Substratspezifität. Die Identifizierung der Glycosylierungsprodukte erfolgte sowohl durch umfangreiche NMR-Spektroskopie als auch die Permethylierungsanalyse nebst Gaschromatographie. 1D- und 1L-*chiro*-Inositol konnten jeweils in Position 1 und 3 galactosyliert werden, 1D-Pinitol in Position 1 und 6, 1L-Quebrachitol wurde dagegen nicht erkannt. Aus den Ergebnissen ließ sich eine Konsensuskonfiguration für die optimale Erkennung durch die  $\beta$ -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1 ermitteln.

## 9. Summary

Within this work a multitude of modified derivatives of the T-antigen Gal $\beta$ 1-3GalNAc motif were synthesised employing chemoenzymatic methods. Modifications were introduced on the stage of the monomeric building blocks prior to formation of the disaccharides. The glycosidic linkage was established by means of the  $\beta$ -galactosidases from bovine testes, *Bacillus circulans* (bgaC-gene) and *Xanthomonas manihotis* as well as the phosphorylase from *Bifidobacterium bifidum*. Conclusions on the substrate specificities of the employed enzymes were drawn, facilitated by the influence of the diverse acceptor structures concerning yield and regioselectivity.



T-Antigen-Determinant (Gal $\beta$ 1-3GalNAc1-OR)

Different approaches for the synthesis of  $\alpha$ -configured *O*-glycosides of GalNAc were evaluated. Epimerisation of the corresponding GlcNAc derivatives, protected in position 3 and 6 as pivaloates, proved to be beneficial compared to direct Fischer glycosylation of GalNAc or azidonitration of galactal according to Lemieux followed by trichloroacetimidate-based glycosylation. A corresponding epimerisation was successfully applied for the preparation of 1,5-anhydrogalactitol **42** as well. Enzymatic galactosylation of the  $\alpha$ -configured methyl (**18**), allyl (**1**), benzyl (**20**) and 2-(trimethylsilyl)-ethyl (**21**) glycosides of GalNAc as well as **42** gave the  $\beta$ 1-3-linked disaccharide products in good to excellent yields. In the reactions utilising the  $\beta$ -galactosidases from *Xanthomonas manihotis* and *Bacillus circulans* the formation of a  $\beta$ 1-6 linked product was observed as well; these in turn could be selectively hydrolysed by the addition of a  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* after finishing transglycosylation.  $\beta$ -Thioglycoside **33**, another potential acceptor, showed inhibitory properties independent of the enzyme used. In contrast, *C*-glycosides could be galactosylated chemoenzymatically.

Investigations into the synthesis of simple 2-deoxy- $\alpha$ -glycosides revealed the Falck-Mioskowski method to be superior in respect to selectivity and yield compared to the NBS-/NIS-methods and the glycosylation according to Sabesan. All enzymes were able to glycosylate 2-deoxy- $\alpha$ -glycosides without loss of regioselectivity although the yields were generally lower.  $\beta$ -Galactosidase from bovine testes glycosylated methyl 2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranoside (**51**) exclusively in position 3, however, the corresponding  $\beta$ -anomer gave both the  $\beta$ 1-3 and the  $\beta$ 1-6-regioisomers in a ratio of 2:1. Treatment of  $\beta$ -alkyl galactosides with the available  $\beta$ -galactosidases provided a mixture of the  $\beta$ 1-3- and  $\beta$ 1-6-linked disaccharides in low yields. The bovine testes enzyme exhibited a noteworthy regioselectivity depending on the nature of the aglycon: Whereas incubation of allyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (**59**) favoured the galactosylation at position

3, the respective 2-(trimethylsilyl)-ethyl derivative **60** preferentially gave rise to the  $\beta$ 1-6-linked product in a ratio of 3:1. No reaction was observed in these cases employing the phosphorylase.

D-Galactal (**62**) was not an acceptor of any of the employed glycosylating enzymes, but it could be selectively acetylated at position 6 applying a lipase from *Candida rugosa*. With this acetylated galactal **64** all enzymes provided regiospecifically the  $\beta$ 1-3-linked product. Incubation of the corresponding *gluco*-configured derivatives **61** and **63** with the  $\beta$ -galactosidases from *Xanthomonas manihotis* and *Bacillus circulans* gave only rise to glycosylation at position 3 of the respective acceptor. In contrast, the enzyme from bovine testes afforded a mixture of regioisomers, glycosylated at position 3 and 4. In case of the unprotected acceptor **61** the ratio was 3:1, whereas the 6-acetylated D-glucal **63** shifted the ratio to 13:1 in favour of the  $\beta$ 1-3-linked product. 1,2-Dideoxy derivative **66**, formed by hydrogenation of **62**, was galactosylated by all enzymes at position 3 in good to excellent yields.

On treatment with the  $\beta$ -galactosidases from *Xanthomonas manihotis* and *Bacillus circulans* the allyl (**8**), methyl (**24**) and benzyl (**25**) 2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosides gave only the  $\beta$ 1-3-linked products. On the other hand, the enzyme from bovine testes catalysed glycosylation at position 3 and 4, the regioselectivity increasing in favour of the  $\beta$ 1-3-product with increasing sterical demand of the aglycon. Chemoenzymatic galactosylation of 1,5-anhydroglucitol **45** confirmed this observation: incubation with the  $\beta$ -galactosidase from bovine testes afforded preferentially the  $\beta$ 1-4-linked product, whereas the other enzymes glycosylated only position 3. The  $\alpha$ -allyl derivative **69**, deoxygenated at position 4, was available by Barton-McCombie deoxygenation in excellent yields. Treatment with any of the enzymes resulted in regiospecific galactosylation of position 3. In contrast, the 4-fluoro derivative **77** with *galacto*-configuration was accepted by non of the enzymes.

Starting from allyl 2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranoside (**54**), Barton-McCombie deoxygenation enabled the synthesis of the 2,4-dideoxy derivative **73**, which was not accepted by the phosphorylase. **73** was galactosylated by the  $\beta$ -galactosidases with low selectivity, the  $\beta$ 1-6-linked disaccharide being formed preferentially over its  $\beta$ 1-3-regioisomer.  $\alpha$ -Allyl FucNAc (**80**) and its derivatives **85** and **94**, deoxygenated in position 2 and 4, respectively, were synthesised, however on treatment with the enzymes no galactosylation of these acceptors could be observed.

In the second part concerning the synthesis of T-antigen derivatives, the feasibility of employing modified donors in bovine testes  $\beta$ -galactosidase catalysed reactions was examined. The reference acceptor  $\alpha$ -allyl-GalNAc was glycosylated in a slightly reduced yield, employing the modified donors *p*NP-D-Fuc and *p*NP-L-Ara. Oxidation of *p*NP-Gal in the presence of galactose oxidase from *Dactylium dendroides* provided aldehyde **128** as an oxidised donor, which was not recognized by the enzyme from bovine testes. The same was true for known donor 6-fluoro-*p*NP-Gal (**129**). While exploring a new access to **129**, elimination occurred and resulted in the

novel donor **133**, which contained an exocyclic double bond. **133** was not accepted by the  $\beta$ -galactosidase. In contrast, an elongated donor **136**, containing a vinylic double bond was transferred to position 3 of  $\alpha$ -allyl-GalNAc. The epimeric donor *p*NP-Glc was recognized as a donor, but transglycosylation occurred only to position 6. Whereas galactosylation of D-galactal (**62**) with *p*NP-Gal was not achievable, slow addition of water was observed, resulting in 2-deoxy-D-galactose. Optimised reaction conditions enabled the condensation of **62** and  $\alpha$ -allyl-GalNAc in the presence of  $\beta$ -galactosidase from bovine testes, forming the disaccharide 2dGal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -OAll (**139**).

In a comparative study using *p*NP-Gal as a reference, potential donors for  $\beta$ -galactosidases with different leaving groups were synthesised and reacted in the presence of the enzyme from bovine testes. The yields were low employing disaccharides containing a  $\beta$ -linked galactose moiety at the non reducing end. In addition, a large number of novel  $\beta$ -aryl galactopyranosides were synthesised employing phase transfer catalysis. They contained different halogenated phenols, benzyl alcohol, benzoic acid, methyl benzoate, benzaldehyde, or aniline as leaving groups. During synthesis an unusual intermolecular acetyl migration onto the benzylic alcohol group was observed during galactosylation of hydroxyl benzyl alcohols, e. g. **160** or **197**. Pyridyl glycosides were obtained by reaction with the corresponding silver pyridoxides. Donors with halogenated phenols, benzyl alcohol, or methyl benzoate as leaving groups had no influence on the yields of transglycosylation. A minor increase was achieved with a bezaldehyde as leaving group, whereas benzoic acids or aniline gave a very low or no yield of the transglycosylation product. Finally, commercially available donors resorufinyl and 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-galactopyranosides exhibited a lower transglycosylation potential than *p*NP-Gal.

In the final part a new thermophilic  $\beta$ -galactosidase from *Thermoanaerobacter* sp. strain TP6-B1 was employed for chemoenzymatic galactosylations of different inositols. This is the second application of a  $\beta$ -galactosidase for the synthesis of such pseudo disaccharides with a noticeable broader substrate specificity. Identification was achieved by extensive NMR spectroscopy and permethylation analysis together with gas chromatography. Galactosylation of 1D- and 1L-*chiro*-inositol occurred in each case at position 1 and 3. 1D-Pinitol was glycosylated at position 1 and 6, in contrast, 1L-quebrachitol was not recognized by the enzyme. These results led to an assessment of the acceptor preferences of the  $\beta$ -galactosidase from *Thermoanaerobacter* sp. strain TP6-B1.

## 10. Experimenteller Teil

### 10.1. Allgemeine Methoden

#### Reaktionsführung

Die in Reaktionen verwendeten Lösungsmittel wurden stets frisch destilliert oder wenn nötig nach gängigen Labormethoden absolutiert. Wurden Reaktionen unter einer Argonatmosphäre nach der Schlenck-Technik durchgeführt, geschah dies in einer unter Vakuum gründlich ausgeheizten Apparatur. Molekularsieb wurde direkt vor einer Reaktion durch Erhitzen auf über 150 °C im Hochvakuum über Nacht aktiviert. Druckhydrierungen wurden mit einem Berghof-Maasen Laborautoklaven durchgeführt.

Enzymatische Reaktionen wurden in einem Eppendorf Thermomixer comfort in Eppendorf Einweggefäßen zu 0.5, 0.7, 1.5 oder 2.0 ml durchgeführt. Die Pufferlösungen für enzymatische Ansätze und Laufmittel für die Gelpermeationschromatographie wurden mit deionisiertem Wasser (Seralpur Pro 90C oder Millipore Milli-Q) angesetzt. Bei den Pufferlösungen für enzymatische Reaktionen wurde 0.02 % Natriumazid zugesetzt, um eine Kontamination durch Mikroorganismen zu vermeiden. Die Bestimmung der pH-Werte erfolgte mit einem Toledo MP220-pH-Meter. Wässrige Lösungen wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und an einer Lyovac GT2 (Leybold-Heraeus) oder einer Alpha 1-4 LD (Christ) im Hochvakuum gefriergetrocknet.

#### Chromatographie

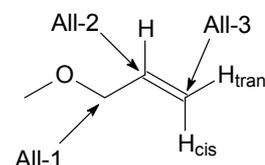
Alle Reaktionen wurden dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgelfolien (DC-Alufolien, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck) verfolgt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Absorption und/oder durch Besprühen mit 20%iger ethanolischer Schwefelsäure und anschließender Wärmebehandlung. Für Reaktionen mit Amininen wurde als Sprühreagenz 0.2%ige ethanolische Ninhydrinlösung verwendet. Glycosylbromide wurden außerdem durch Behandlung mit essigsaurer Wasserstoffperoxidlösung gefolgt von ethanolischer Fluoresceinlösung detektiert.

Die Kieselgelchromatographie wurde nach der Flash-Methode bei einem Überdruck von 0.2-0.4 bar mit Kieselgel 60 M (230-400 mesh, 40-63 µm) der Firmen Merck, ICN oder Scharlau mit den jeweils angegebenen Laufmitteln durchgeführt. Gelpermeationschromatographie erfolgte an Biogel P-2 (Bio-Rad, fine, 45-90 µm) mit Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (0.25 M, 3 x 130 cm) oder deionisiertem Wasser (2 x 140 cm). Die Zuordnung der einzelnen Fraktionen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Trennungen durch analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC von Merck/Hitachi) wurden mit einer Niederdruckgradientenpumpe L-6250 und einem Diodenarray-Detektor L-3000 mit DAD-Manager-Software LiChrograph Version 4 an einer LiChrospher NH<sub>2</sub>-Säule (5 µm, 4 x 250 mm, 1 ml/min) mit 5 %

Acetonitril durchgeführt. Zur Entfernung von Salzen wurde durch „*mixed-bed*“ Ionac NM-60 (Sybron Chemicals) oder Amberlite MB-3 Ionenaustauscher filtriert.

### Spektroskopie

Die Messung der NMR-Spektren erfolgte an einem Avance-300 (75.48 MHz für  $^{13}\text{C}$ ), AMX-400 (100.61 MHz für  $^{13}\text{C}$ ) oder DRX-500 (125.77 MHz für  $^{13}\text{C}$ ) der Firma Bruker bei 300 K im Automationsbetrieb. Wenn erforderlich, wurden für die Zuordnung der Signale  $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY-, TOCSY-, ROESY-,  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -COSY-, HMQC- oder HMBC-Experimente durchgeführt. Als interner Standard wurde Tetramethylsilan verwendet, oder es wurde auf das charakteristische Lösungsmittelsignal von  $\text{CHCl}_3$  in  $\text{CDCl}_3$  (7.24 ppm),  $\text{d}_3$ -MeOH in  $\text{d}_4$ -MeOH (3.31 ppm),  $\text{d}_5$ -DMSO in  $\text{d}_6$ -DMSO (2.50 ppm) oder HDO in  $\text{D}_2\text{O}$  (4.79 ppm) kalibriert. Die Spektren wurden nach Erster Ordnung ausgewertet, die Konnektivitäten der Kohlenstoffatome wurden durch DEPT- oder PENDANT-Experimente ermittelt. Methylenprotonen werden mit a (tiefes Feld) oder b (hohes Feld) oder wo möglich mit ax (axial) und eq (äquatorial) indiziert. Zur Kennzeichnung der Multiplizitäten der Signale finden folgende Abkürzungen Anwendung: s (Singulett), bs (breites Singulett), d (Dublett), dd (doppeltes Dublett), ddd (Dublett eines doppelten Dubletts), dddd (doppeltes Dublett eines doppelten Dubletts), bd (breites Dublett), dt (doppeltes Triplet), dq (doppeltes Quartett), t (Triplet), vt (virtuelles Triplet), m (Multiplet durch Signalüberlagerung mehrerer nichtäquivalenter Protonen),  $m_c$  (zentriertes Multiplet eines einzelnen Protons, dessen Aufspaltungsmuster nicht befriedigend nach Erster Ordnung beschrieben werden kann). Die Zuordnung der Signale von den Allylgruppen erfolgt wie nebenstehend gekennzeichnet, das Allyl-3<sub>trans</sub>-Proton zeigt also eine *cis*-Kopplung mit dem Allyl-2-Proton.



Massenspektrometrie: FAB-MS wurde mit einem VG-Microtech Analytical 70-250S (IonTech Kanone, Matrix: *m*-Nitrobenzylalkohol), MALDI-TOF-MS mit einem Bruker Biflex III (*positive reflector mode*, Matrix: 2,5-Dihydroxybenzoesäure, DHB) und ES-MS mit einem Mariner Biospectrometer durchgeführt.

### Analytik

Schmelzpunkte wurden mit einem Schmelzpunktbestimmungsgerät ST-apotec oder einem Reichert Heiztischmikroskop gemessen und sind unkorrigiert. Die Bestimmung der Drehwerte erfolgte mit einem Perkin-Elmer-Polarimeter 341 (Natrium-D-Linie 589 nm, Küvettenlänge 1 dm) bei 20 °C. Ein Shimadzu-Spektralphotometer UV-160-A wurde für spektrometrische Messungen mit Polyethylenküvetten (Länge 1 cm) verwendet. GC-MS erfolgte durch gaschromatographische Trennung an einer Hewlett Packard Ultra 2 Kapillarsäule (0.33  $\mu\text{m}$ , 50 m x 0.2 mm) mit einer Erwärmung der Ofentemperatur von 75 °C (1 Minute gehalten) auf 130 °C (Heizrate 40 °C/ $\text{min}$ ) und dann mit einer Rate von 4 °C/ $\text{min}$  auf 250 °C, gefolgt durch massenspektrometrische Detektion mit einem Hewlett Packard 5970 MSD. Die Elementaranalysen

wurden von der Abteilung Zentrale Elementanalytik des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg ausgeführt.

### Verwendete Enzyme

$\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden, EC 3.2.1.23, isolierter Rohextrakt<sup>168</sup>

$\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*, bgaC-Gen, rekombinant,<sup>288</sup> EC 3.2.1.23, zur Verfügung gestellt von Dr. Katsumi Ajisaka, Meiji Milk Products, Japan

$\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*, EC 3.2.1.23, New England Biolabs, USA

$\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli*, EC 3.2.1.23, Grade VI, Sigma, Deutschland

$\beta$ -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1,<sup>359</sup> EC 3.2.1.23, zur Verfügung gestellt von Prof. Roy Daniel, Waikato University, Neuseeland

$\beta$ 1-3-Galactosyl-*N*-acetylhexosamin-Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082,<sup>292</sup> Rohextrakt isoliert von Prof. Stéphane Bouquelet, Université Lille, Frankreich

Lipase S-VII aus *Candida rugosa*, EC 3.1.1.3, Sigma, Deutschland

Galactoseoxidase aus *Dactylium dendroides*, Sigma, Deutschland

Katalase aus *Aspergillus niger*, Sigma, Deutschland

## **10.2. Enzymisolierung und Assays zur Enzymaktivität**

### Isolierung der $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden

Die Rinderhoden werden schlachtfrisch mit Trockeneis gekühlt und bis zur Verarbeitung bei -70 °C gelagert. Alle Enzymreinigungsschritte werden im Kühlraum oder in einer Kühlzentrifuge bei jeweils 4 °C durchgeführt. Zuerst werden die Rinderhoden geschält und das Unterhautfett entfernt. 1 Rinderhoden (300 g) wird mit dem Skalpell kleingeschnitten, mit 300 ml Essigsäure (0.1 M) versetzt und für 10 Minuten im Mixer (Moulinex) homogenisiert. Durch Zugabe von Salzsäure (0.77 M) wird auf einen pH-Wert von 4.0 eingestellt, weitere 30 Minuten gerührt und anschließend für 20 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und langsam mit 124 g Ammoniumsulfat bis 40 % Sättigung versetzt. Nach einer Stunde rühren wird für 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert und das Pellet in 100 ml McIlvaine-Puffer (pH 4.3) gelöst. Die Lösung wird für 15 Minuten im Wasserbad auf 50 °C erhitzt und nochmals für 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wird im Dialyseschlauch (Ausschlussgröße:  $M \leq 12$  kDa) zweimal je 12 Stunden gegen jeweils 9 l McIlvaine-Puffer dialysiert. Die gefriergetrocknete  $\beta$ -Galactosidase mit einer Aktivität von 50.1  $\frac{U}{g}$  kann bei -18 °C drei Jahre ohne nennenswerten Verlust der Reaktivität gelagert werden.

### Assay zur Aktivitätsbestimmung von $\beta$ -Galactosidasen

$\beta$ -Galactosidasen (EC 3.2.1.23) katalysieren die glycosidische Spaltung von *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (*p*NP-Gal) und das freigesetzte *p*-Nitrophenol (*p*NP-OH) kann anschließend photometrisch quantifiziert werden. Als Beispiel sei hier die optimierte Vorschrift für die  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden angegeben. Für die Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen wurden Temperatur, pH-Wert und verwendeter Puffer variiert und evtl. ein geeignetes Cosolvens zugesetzt. 10, 20, 30 und 50  $\mu$ l *p*NP-Gal (2 mM in McIlvaine-Puffer, 50 mM, pH 4.3) werden mit einem entsprechenden Volumen McIlvaine-Puffer auf 50  $\mu$ l aufgefüllt und auf 37 °C erwärmt. 50  $\mu$ l einer bereits auf 37 °C vorgewärmten Lösung der  $\beta$ -Galactosidase in McIlvaine-Puffer (4.0  $\frac{mg}{ml}$ ) werden dem Substrat zugesetzt. Zur Bestimmung des Blindwertes werden zwei Vergleichsmischungen angesetzt, bei denen entweder die Substrat- oder die Enzymlösung durch reinen McIlvaine-Puffer ersetzt wird. Nach genau 20 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von 1.0 ml Glycinpuffer (250 mM, pH 10) beendet. Aus der bei 410 nm gemessenen Extinktion der Probe kann anhand einer Kalibrierung mit Standardlösungen von *p*NP-OH (0-2 mM) in Glycinpuffer (250 mM, pH 10) die Konzentration bestimmt werden. Die benötigte Enzymmenge, um 1  $\mu$ mol *p*NP-Gal pro Minute unter den Assaybedingungen zu hydrolysieren, entspricht einer Unit enzymatischer Aktivität.

### Ermittlung des Proteingehalts nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt nach der Methode von Bradford.<sup>362</sup> 5 ml Coomassie-Blue G-250 Farbstofflösung (Bio-Rad) werden mit deionisiertem Wasser auf 25 ml verdünnt und zu jeweils 5 ml dieser Lösung werden 100  $\mu$ l der zu untersuchenden Enzymlösung gegeben. Nach 10 Minuten wird die Extinktion des blauen Farbstoffs bei 595 nm ermittelt und die Proteinkonzentration anhand einer Kalibrierung mit Rinderserumalbumin (BSA, Sigma) bestimmt.

### HPLC-Assay

Zur Ermittlung des Transglycosylierungspotentials neuartiger Glycosyldonoren mit unterschiedlichen Abgangsgruppen werden sie in analytischen Ansätze umgesetzt und die Ausbeuten mittels HPLC-Untersuchungen quantifiziert. 13.1 mg (50.1  $\mu$ mol) des Referenz-Akzeptors **1** und 60.2  $\mu$ mol (1.2 eq.) des entsprechenden Donors werden in 350  $\mu$ l McIlvaine-Puffer (50 mM, pH 4.3) gelöst und auf 37 °C erwärmt. 5.6 mU  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden werden zugegeben und der Reaktionsansatz für 50 h bei 37 °C inkubiert. 50  $\mu$ l werden entnommen, mit deionisiertem Wasser auf 500  $\mu$ l verdünnt und das Protein mit einem Membranfilter (0.45  $\mu$ m) abfiltriert. 100  $\mu$ l der Lösung werden auf eine analytische  $NH_2$ -Säule gegeben und mit 5 % Acetonitril eluiert. Die Ausbeutebestimmung erfolgt durch Integration des Produktpeaks, bekannt aus präparativ dargestelltem **95**.

### Derivatisierung der Transglycosylierungsprodukte für die GC-MS-Analyse

Alle Reaktionen werden in Plastik-Einweggefäßen durchgeführt. Zu 500 µg des Pseudo-Disaccharids werden 200 µl Dimethylsulfoxid, 50 µl Methyljodid und 200 µl einer Suspension von Natriumhydroxid in Dimethylsulfoxid (4 Plätzchen NaOH in 2 ml DMSO) gegeben. Der Ansatz wird 60 Minuten im Ultraschallbad behandelt, wobei nach der Hälfte der Zeit weitere 50 µl Methyljodid zugegeben werden. Die Reaktion wird durch Zugabe von 4 ml Wasser beendet. 2 ml Dichlormethan werden zugegeben, die organische Phase zweimal gewaschen und anschließend im Luftstrom bei 30 °C getrocknet. Der Rückstand wird mit 250 µl 2 molarer Trifluoressigsäure versetzt und 1 Stunde bei 120 °C behandelt. Die Probe wird wieder im Luftstrom bei 40 °C getrocknet und sodann mit Toluol codestilliert. Die Reduktion erfolgt mit 4 mg Natriumborhydrid in 0.25 ml einer 1 molaren wässrigen Lösung von Ammoniumhydroxid bei 40 °C. Nach 1 Stunde wird die Reaktion durch Zugabe von 0.5 ml Aceton beendet und zur Trockne eingeeengt. Die abschließende Acetylierung erfolgt mit Perchlorsäure nach der Methode von Falshaw und Furneaux.<sup>363</sup> Die partiell methylierten und acetylierten Derivate werden per GC-MS analysiert.

## **10.3. Allgemeine Arbeitsvorschriften**

### AAV 1: Acetylierung

Essigsäureanhydrid (5 Äquivalente je Hydroxygruppe) wird zu einer Lösung der OH-freien Verbindung im doppelten Volumen absolutem Pyridin unter Eiskühlung langsam zugegeben. Nach vollständiger Zugabe wird das Eisbad entfernt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mehrmals mit Toluol codestilliert und anschließend flashchromatographisch mit dem jeweils angegebenen Laufmittelgemisch gereinigt.

### AAV 2: Deacylierung

- a) nach Zemplén: Die zu deacylierende Verbindung wird in absolutem Methanol gelöst und mit katalytischen Mengen einer 0.5 molaren Natriummethanolat-Lösung in absolutem Methanol versetzt. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur gerührt, bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr nachzuweisen ist. Durch Zugabe von Ionenaustauscher Amberlite IR 120 (H<sup>+</sup>) oder Trockeneis wird die Reaktion neutralisiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand bei Bedarf säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.
- b) Das acylierte Edukt wird in absolutem Methanol gelöst und bei Raumtemperatur mit einer 7 molaren Lösung von Ammoniak in Methanol (Aldrich) behandelt, bis die Entschützung vollständig ist. Unter vermindertem Druck wird eingeeengt und der Rückstand bei Bedarf durch Säulenchromatographie gereinigt.

### AAV 3: Phasentransferkatalysierte Galactosylierung von Phenolen

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosylbromid<sup>364</sup> (**56**) wird mit äquimolaren Mengen Tetra-butylammoniumbromid und 3 Äquivalenten des Phenols in Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe des gleichen Volumens Natronlauge (1 M) wird bei 35 °C intensiv gerührt. Ist der Glycosyldonor verbraucht, wird mit Ethylacetat verdünnt und die organische Phase nacheinander dreimal mit einer 1 molaren Natriumhydroxid-Lösung, zweimal mit Wasser und einmal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen werden jeweils mit etwas Ethylacetat gegengeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel.

### AAV 4: Enzymatische Transglycosylierung mit $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden

Der Donor *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid und 10 Äquivalente Akzeptor werden in McIlvaine-Puffer (50 mM, pH 4.3) suspendiert und auf 37 °C vorgewärmt. Nach Zugabe der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden ( $4.7 \frac{U}{mmol}$ ) in etwas Puffer wird bei 37 °C über 50 Stunden inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wird das Enzym durch fünfminütiges Erhitzen auf 90 °C denaturiert, und anschließend freigesetztes *p*-Nitrophenol mit Ethylacetat extrahiert. Die Aufreinigung erfolgt durch Gelpermeationschromatographie über zwei Biogel P-2 Säulen, erst mit Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer und anschließend mit deionisiertem Wasser. Restliche Puffersalze werden durch eine kurze „mixed bed“ Ionenaustauschersäule entfernt.

### AAV 5: Enzymatische Transglycosylierung mit $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*

*p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid, 3 Äquivalente Akzeptor und etwas Rinderserumalbumin (BSA) werden in Natriumacetat-Puffer (100 mM, pH 5.5, 10 % Acetonitril) gelöst.  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* ( $230 \frac{U}{mmol}$ ) wird zugegeben und der Ansatz über 50 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird das Enzym durch Erhitzen auf 90 °C für 5 Minuten denaturiert und *p*-Nitrophenol mit Ethylacetat extrahiert. Die Reinigung erfolgt über zwei Biogel P-2 Säulen (Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer und deionisiertes Wasser) und Filtration durch „mixed bed“ Ionenaustauscher.

### AAV 6: Enzymatische Transglycosylierung mit $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*

In Kaliumphosphat-Puffer (100 mM, pH 6.0, 20 % *N,N*-Dimethylformamid) werden der Donor *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid, 3 Äquivalente Akzeptor und die  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (bgaC-Gen,  $5.9 \frac{U}{mmol}$ ) 4½ Stunden bei 37 °C geschüttelt. Der Reaktionsansatz wird kurz auf 90 °C erhitzt und anschließend *p*-Nitrophenol durch Extraktion mit Ethylacetat entfernt. Die Reinigung erfolgt an Biogel P-2 mit Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer gefolgt von deionisiertem Wasser. „Mixed bed“ Ionenaustauscher dient zur Entfernung der Puffersalze.

**AAV 7: Enzymatische Transglycosylierung mit Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum***

Galactose-1-phosphat (Gal-1-P) und 1.2 Äquivalente des Akzeptors werden in Imidazol-Puffer (25 mM, pH 6.8) gelöst und auf mehrere Reaktionsgefäße verteilt (jeweils maximal 700 µl) und mit der Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 ( $30 \frac{\mu\text{U}}{\mu\text{mol}}$ ) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 20 Stunden bei 37 °C wird der Ansatz gefriergetrocknet. Der Rückstand lässt sich über zwei Biogel P-2 Säulen aufrennen, die mit Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer respektive deionisiertem Wasser eluiert werden. Puffersalze werden anschließend mit „mixed bed“ Ionenaustauscher entfernt.

**AAV 8: Enzymatische Hydrolyse mit  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli***

Nach Denaturierung der jeweiligen  $\beta$ -Galactosidase für die Transglycosylierung wird der Reaktionsansatz auf das zehnfache Volumen mit Natriumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7.0, 1 mM Magnesiumchlorid) verdünnt. Die  $\beta$ -Galactosidase aus *Escherichia coli* ( $250 \frac{\text{U}}{\text{mmol}}$ ) wird zugegeben und die Reaktion bei 37 °C über 4 Stunden bis zur vollständigen Hydrolyse des störenden Nebenprodukts inkubiert. Anschließend wird der pH-Wert mit Zitronensäure auf 4.3 eingestellt und das Enzym bei 90 °C denaturiert. Die Reinigung erfolgt wie in der ursprünglichen **AAV 5** bzw. **6** beschrieben.

**AAV 9: Enzymatische Transglycosylierung mit  $\beta$ -Galactosidase TP6-B1**

Der Donor *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid und 5-6 Äquivalente Inositol-Akzeptor werden in Natriumphosphat-Puffer (100 mM, pH 7.0) mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1 bei 37 °C inkubiert. Nach 3 Tagen wird die Reaktion durch Erwärmen auf 95 °C beendet, *p*-Nitrophenol mit Ethylacetat extrahiert und die Lösung lyophilisiert. Der Rückstand wird durch „mixed bed“ Ionenaustauscher filtriert und anschließend zweimal an Biogel P-2 (deionisiertes Millipore-Wasser) gereinigt.

**10.4. Spezielle Synthesevorschriften****Allyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (1)****a) Durch Fischer-Glycosylierung aus *N*-Acetyl-D-galactosamin**

2.77 g (12.5 mmol) *N*-Acetyl-D-galactosamin werden in 45 ml frisch destilliertem Allylalkohol suspendiert und mit 140 µl Acetylchlorid versetzt. Es wird 9 Stunden unter Rückfluss erhitzt, wobei sich die Lösung über violett bis nach schwarz verfärbt. Der Reaktionsansatz wird im Vakuum zur Trockne eingeengt und der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen. Nach Adsorption auf grobem Kieselgel werden Lösungsmittelreste im Hochvakuum entfernt. Das Produkt wird mit Ethylacetat/Methanol 6:1 über eine Kieselgelsäule eluiert. Die Ausbeute an **1** beträgt 2.03 g (7.77 mmol, 62 %).

**b) Aus 7 (nach Azidonitratisierung)**

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 2a**:

2.93 g (7.56 mmol) **7**, 120 ml abs. Methanol, 2.5 ml NaOMe-Lösung (0.5 M), 22 Stunden.

Ausbeute: 1.96 g (7.50 mmol, 99 %).

**c) Aus 11 (nach Epimerisierung an Position 4)**

Die Darstellung erfolgt nach **AAV 2a**:

Rückstand **11**, 50 ml abs. Methanol, 1.5 ml NaOMe-Lösung (0.5 M), 20 Stunden. Ausbeute:

1.04 g (3.98 mmol, 45 % über 3 Schritte).

**d) Aus 14 oder 15 (nach Epimerisierung an Position 4)**

Die Darstellung erfolgt nach **AAV 2a**:

7.31 g (17.0 mmol) **14** oder **15**, 150 ml abs. Methanol, 5.5 ml NaOMe-Lösung (0.5 M),

32 Stunden. Ausbeute: 4.44 g (17.0 mmol, quant.).

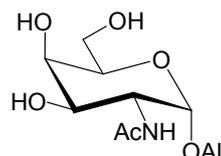
$C_{11}H_{19}NO_6$  (261.27)

weißer Feststoff, Smp.: 198 °C

$[\alpha]_D^{20} = +201^\circ$  (c 0.2, H<sub>2</sub>O)

Lit.<sup>201</sup> Smp.: 193-194 °C

$[\alpha]_D^{20} = +213^\circ$  (c 0.35, H<sub>2</sub>O)



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO):  $\delta = 7.63$  (d, 1 H, NH), 5.88 (dddd, 1 H, All-2), 5.30 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.13 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.68 (d, 1 H, H-1), 4.08 (dddd, 1 H, All-1a), 4.04 (ddd, 1 H, H-2), 3.91 (dddd, 1 H, All-1b), 3.72 (bd, 1 H, H-4), 3.66-3.57 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.54-3.44 (m, 2 H, H-6a/b), 1.83 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 13.7, J<sub>All-1a,2</sub> = 4.8, J<sub>All-1b,2</sub> = 5.6, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.3, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.4, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 1.5, J<sub>1,2</sub> = 3.6, J<sub>2,NH</sub> = 8.4, J<sub>2,3</sub> = 11.2, J<sub>3,4</sub> = 3.6 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, DMSO):  $\delta = 169.95$  (COCH<sub>3</sub>), 135.15 (All-2), 116.68 (All-3), 96.76 (C-1), 71.75 (C-5), 68.50 (C-4), 67.76 (C-3), 67.32 (All-1), 61.02 (C-6), 50.15 (C-2), 23.04 (COCH<sub>3</sub>) ppm.

**O-(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-trichloracetimidat (5)**

Unter Argon werden zu einer Lösung aus 4.50 g (13.6 mmol) 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose<sup>188</sup> (**4a**) und 12.5 ml (125 mmol, 9.2 eq.) Trichloracetonitril in 125 ml absolutem Dichlormethan 5 Tropfen 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en zugegeben. Nach drei Stunden rühren bei Raumtemperatur wird bei vermindertem Druck bis zur Trockne

eingengt und der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan / Aceton 60:1) gereinigt.

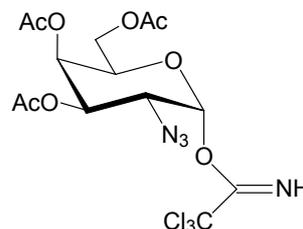
$C_{14}H_{17}Cl_3N_4O_8$  (475.67)

Ausbeute: 5.23 g (11.0 mmol, 81 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +97^\circ$  (c 1,  $CHCl_3$ )

Lit.:<sup>188</sup>  $[\alpha]_{578}^{25} = +104^\circ$  (c 1,  $CHCl_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 497.0 [M+Na]^+$ ,  $513.0 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 8.78$  (s, 1 H, NH), 6.49 (d, 1 H, H-1), 5.52 (dd, 1 H, H-4), 5.36 (dd, 1 H, H-3), 4.40 (dt, 1 H, H-5), 4.13 (dd, 1 H, H-6a), 4.04 (dd, 1 H, H-6b), 4.01 (dd, 1 H, H-2), 2.15, 2.06, 1.99 (3 s, 9 H, 3  $COCH_3$ ) ppm.

$J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,3} = 11.2$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 6.6$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (125.8 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 169.25$ , 168.90, 168.66 (3 C, 3  $COCH_3$ ), 159.69 (C=NH), 93.49 (C-1), 68.12 (C-5), 67.68 (C-3), 65.93 (C-4), 60.19 (C-6), 56.05 (C-2), 29.90 ( $CCl_3$ ), 19.62, 19.59, 19.57 (3 C, 3  $COCH_3$ ) ppm.

### Allyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (6)

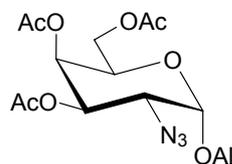
In einer ausgeheizten Apparatur werden unter Schutzgas 2.86 g (6.01 mmol) **5** und 620  $\mu$ l (9.07 mmol, 1.5 eq.) frisch destillierter Allylkohol in 50 ml absolutem Diethylether gelöst und auf  $-50^\circ C$  abgekühlt. 3.0 ml (0.6 mmol) einer Lösung von Trimethylsilyltrifluormethansulfonat in Dichlormethan (0.2 M) werden durch ein Septum zugetropft und der Ansatz bei  $-50^\circ C$  2½ Stunden stehen gelassen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt säulenchromatographisch mit Petrolether (50/70) / Ethylacetat 3:1 gereinigt.

$C_{15}H_{21}N_3O_8$  (371.35)

Ausbeute: 2.03 g (5.47 mmol, 91 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +15^\circ$  (c 1,  $CHCl_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 394.1 [M+Na]^+$ ,  $410.1 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 5.91$  (dddd, 1 H, All-2), 5.35 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.23 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 5.19 (dd, 1 H, H-4), 5.02 (dd, 1 H, H-3), 4.98 (d, 1 H, H-1), 4.74 (dd, 1 H, H-6a), 4.48 (dd, 1 H, H-6b), 4.25 (dddd, 1 H, All-1a), 4.14 (dddd, 1 H, All-1b), 4.09 (dt, 1 H, H-5), 3.78 (dd, 1 H, H-2), 2.12, 2.02, 1.99 (3 s, 9 H, 3  $COCH_3$ ) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 13.7$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 4.8$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 5.6$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,3} = 10.9$ ,  $J_{3,4} = 3.5$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 6.5$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.4$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.53$ , 170.18, 169.93 (3 C, 3  $\text{COCH}_3$ ), 132.64 (All-2), 116.98 (All-3), 96.91 (C-1), 69.22 (C-5), 68.85 (C-3), 68.77 (All-1), 68.13 (C-4), 61.02 (C-6), 55.71 (C-2), 21.01, 20.72, 20.57 (3 C, 3  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### Allyl-2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (7)

1.91 g (5.14 mmol) **6** und 1.69 g (6.44 mmol, 1.25 eq.) Triphenylphosphin werden unter Schlenck-Bedingungen in 70 ml wasserfreiem Toluol gelöst, mit 600  $\mu\text{l}$  (8.41 mmol, 1.6 eq.) Acetylchlorid versetzt und 4½ Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert, mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie (Petrolether (50/70) / Ethylacetat 1:2) gereinigt.

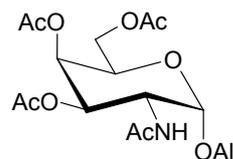
$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_9$  (387.39)

Ausbeute: 1.73 g (4.47 mmol, 87 %)

amorpher weißer Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +29^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )

Lit.:<sup>365</sup>  $[\alpha]_D^{26} = +42^\circ$  (c 0.92,  $\text{CHCl}_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 410.1$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 426.1  $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.87$  (dddd, 1 H, All-2), 5.56 (d, 1 H, NH), 5.36 (dd, 1 H, H-4), 5.27 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.22 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 5.17 (dd, 1 H, H-3), 4.91 (d, 1 H, H-1), 4.58 (ddd, 1 H, H-2), 4.19-4.13 (m, 2 H, All-1a, H-5), 4.12-4.03 (m, 2 H, H-6a/b), 3.99 (dddd, 1 H, All-1b), 2.14, 2.03, 1.97, 1.94 (4 s, 12 H, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 12.7$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.3$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 6.4$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.0$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.2$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 9.9$ ,  $J_{2,3} = 11.2$ ,  $J_{3,4} = 3.3$ ,  $J_{4,5} = 1.0$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 171.32$ , 170.80, 170.74, 170.42 (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ), 133.60 (All-2), 118.74 (All-3), 97.32 (C-1), 69.17 (All-1), 68.83 (C-3), 67.81 (C-4), 67.22 (C-5), 62.34 (C-6), 48.15 (C-2), 23.70, 21.31, 21.14, 21.08 (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### Allyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosid (8)

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von **1** durch Fischer-Glycosylierung:

25.0 g (113 mmol) *N*-Acetyl-D-glucosamin, 400 ml frisch destillierter Allylkohol, 1.5 ml Acetylchlorid, 2 Tage unter Rückfluss erhitzen. Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 6:1.

$C_{11}H_{19}NO_6$  (261.27)

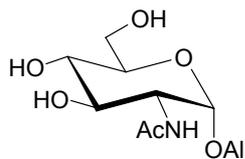
Ausbeute: 25.2 g (96.5 mmol, 85 %)

weißer Feststoff, Smp.: 162 °C

$[\alpha]_D^{20} = +151^\circ$  (c 1, H<sub>2</sub>O)

Lit.:<sup>200</sup> Smp.: 160 °C

$[\alpha]_D^{20} = +142^\circ$  (c 1, H<sub>2</sub>O)



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 5.78$  (dddd, 1 H, All-2), 5.18 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.09 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.75 (d, 1 H, H-1), 4.05 (dddd, 1 H, All-1a), 3.86 (dddd, 1 H, All-1b), 3.75 (dd, 1 H, H-2), 3.70 (dd, 1 H, H-6a), 3.61 (dd, 1 H, H-6b), 3.59-3.53 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.32 (vt, 1 H, H-4), 1.87 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 13.2, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.6, J<sub>All-1b,2</sub> = 6.1, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.3, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.7, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 1.5, J<sub>1,2</sub> = 3.6, J<sub>2,3</sub> = 10.7, J<sub>3,4</sub> = 9.2, J<sub>4,5</sub> = 9.7, J<sub>5,6a</sub> = 2.0, J<sub>5,6b</sub> = 5.6, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 12.2 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 174.82$  (C=OCH<sub>3</sub>), 133.99 (All-2), 118.26 (All-3), 96.45 (C-1), 72.30 (C-3), 71.38 (C-5), 70.37 (C-4), 68.82 (All-1), 60.89 (C-6), 54.02 (C-2), 22.21 (COCH<sub>3</sub>) ppm.

### Allyl-2-acetamido-3,6-di-O-benzoyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosid (9) und Allyl-2-acetamido-3,4,6-tri-O-benzoyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosid (10)

10.88 g (41.6 mmol) **8** werden in 120 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und auf -35 °C gekühlt. 10.6 ml (91.2 mmol, 2.2 eq.) Benzoylchlorid werden langsam zugetropft und die Reaktionslösung über einen Zeitraum von 5 Stunden auf 10 °C erwärmt. Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von etwas Methanol wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand in Chloroform aufgenommen. Die organische Phase wird mit 2 molarer Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wird der verbleibende Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan / Aceton 30:1) aufgetrennt in **9** und **10**.

#### Allyl-2-acetamido-3,6-di-O-benzoyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosid (9)

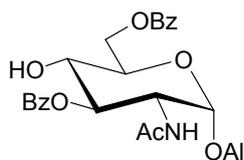
$C_{25}H_{27}NO_8$  (469.49)

Ausbeute: 13.9 g (29.6 mmol, 71 %)

weißer Feststoff, Smp.: 84 °C

$[\alpha]_D^{20} = +125^\circ$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>)

Lit.:<sup>201</sup>  $[\alpha]_D^{26} = +114^\circ$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 470.2 [M+H]<sup>+</sup>, 492.2 [M+Na]<sup>+</sup>, 508.2 [M+K]<sup>+</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.08\text{--}7.99$  (m, 4 H, Ar), 7.60–7.38 (m, 6 H, Ar), 5.90 (dddd, 1 H, All-2), 5.80 (d, 1 H, NH), 5.36 (dd, 1 H, H-3), 5.29 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.22 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.92 (d, 1 H, H-1), 4.77 (dd, 1 H, H-6a), 4.52 (dd, 1 H, H-6b), 4.47 (ddd, 1 H, H-2), 4.23 (dddd, 1 H, All-1a), 4.06–3.99 (m, 2 H, All-1b, H-5), 3.83 (dd, 1 H, H-4), 3.19 (bs, 1 H, OH), 1.84 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 12.7$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.1$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 4.1$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.2$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 9.7$ ,  $J_{2,3} = 10.7$ ,  $J_{3,4} = 9.2$ ,  $J_{4,5} = 9.7$ ,  $J_{5,6a} = 4.1$ ,  $J_{5,6b} = 2.5$ ,  $^2J_{6a/b} = 12.2$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.40$ , 168.32, 167.42 (3 C, 1  $\text{COCH}_3$ , 2  $\text{COC}_6\text{H}_5$ ), 133.93, 133.76 (2 C, Ar), 133.64 (All-2), 130.38, 130.29, 130.23, 130.18, 129.98, 129.59, 128.99, 128.94, 128.91, 128.89 (10 C, Ar), 118.71 (All-3), 97.12 (C-1), 75.16 (C-3), 71.02 (C-5), 69.50 (C-4), 69.03 (All-1), 63.75 (C-6), 51.96 (C-2), 23.61 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### Allyl-2-acetamido-3,4,6-tri-O-benzoyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosid (10)

$\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{NO}_9$  (573.60)

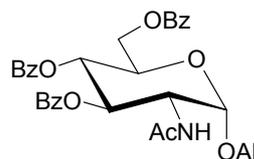
Ausbeute: 2.87 g (5.00 mmol, 12 %)

weiße Kristalle, Smp.: 87 °C

$[\alpha]_D^{20} = +52^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )

Ber.: C 67.01 H 5.45 N 2.44

Gef.: C 66.49 H 5.50 N 2.53



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 596.2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 612.1  $[\text{M}+\text{K}]^+$

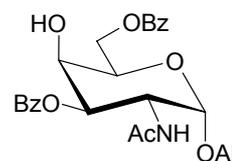
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.06\text{--}8.00$  (m, 2 H, Ar), 7.94–7.87 (m, 4 H, Ar), 7.56–7.29 (m, 9 H, Ar), 5.94 (dddd, 1 H, All-2), 5.86 (d, 1 H, NH), 5.73–5.63 (m, 2 H, H-3, H-4), 5.32 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.24 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 5.01 (d, 1 H, H-1), 4.63–4.54 (m, 2 H, H-2, H-6a), 4.41 (dd, 1 H, H-6b), 4.33 (ddd, 1 H, H-5), 4.27 (dddd, 1 H, All-1a), 4.08 (dddd, 1 H, All-1b), 1.86 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 12.7$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.6$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 6.1$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.2$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 9.2$ ,  $J_{4,5} = 9.7$ ,  $J_{5,6a} = 3.1$ ,  $J_{5,6b} = 5.1$ ,  $^2J_{6a/b} = 12.2$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 166.07$ , 165.17, 164.13 (3 C, 1  $\text{COCH}_3$ , 2  $\text{COC}_6\text{H}_5$ ), 132.39 (All-2), 132.36, 132.21, 132.15, 132.12, 128.89, 128.85, 128.77, 128.71, 128.66, 128.63, 128.58, 127.99, 127.92, 127.85, 127.80, 127.41, 127.39, 127.37 (18 C, Ar), 117.48 (All-3), 95.63 (C-1), 70.72 (C-3), 68.22 (C-4), 67.93 (All-1), 67.28 (C-5), 61.92 (C-6), 51.29 (C-2), 22.20 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

**Allyl-2-acetamido-3,6-di-O-benzoyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (11)**

4.15 g (8.84 mmol) **9** werden in 50 ml absolutem Dichlormethan gelöst und mit 1.7 ml wasserfreiem Pyridin versetzt. Bei -20 °C wird unter Schlenck-Bedingungen eine Lösung von 1.8 ml (10.7 mmol, 1.2 eq.) Trifluormethansulfonsäureanhydrid in 50 ml Dichlormethan zugetropft. Nach drei Stunden bei dieser Temperatur wird mit Chloroform verdünnt und auf Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wird mit Chloroform extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird mehrmals mit Toluol codestilliert und dann in 15 ml *N,N*-Dimethylformamid aufgenommen und mit 4.8 g (69.6 mmol, 7.9 eq.) Natriumnitrit versetzt. Nach fünf Stunden Reaktionszeit wird mit Toluol verdünnt und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wird in etwas Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird das Rohprodukt direkt für die Entschützung eingesetzt (siehe **1c**).

**Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3,6-di-O-pivaloyl- $\alpha$ -D-glucoopyranosid (12) und Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-O-pivaloyl- $\alpha$ -D-glucoopyranosid (13)**

17.5 g (67.0 mmol) **8** werden in 70 ml wasserfreiem Dichlormethan und 140 ml absolutem Pyridin gelöst und im Eisbad mit 24.7 ml (201 mmol, 3.0 eq.) Pivalinsäurechlorid 7½ Stunden gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 7 ml Methanol beendet und mit 840 ml Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wird nacheinander mit verdünnter Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel (Petrolether (50-70) / Ethylacetat 2:1) in die Produkte **12** und **13** getrennt.

Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3,6-di-O-pivaloyl- $\alpha$ -D-glucoopyranosid (12)

$C_{21}H_{35}NO_8$  (429.51)

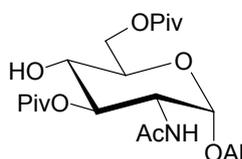
Ausbeute: 22.2 g (51.7 mmol, 77 %)

weiße Kristalle, Smp.: 49 °C

$[\alpha]_D^{20} = +60^\circ$  (c 1,  $CHCl_3$ )

Ber.: C 58.73 H 8.21 N 3.26

Gef.: C 57.87 H 7.80 N 3.39



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 452.2 [M+Na]^+$ ,  $468.2 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 5.81$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.64$  (d, 1 H, NH),  $5.22$  (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.16$  (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $5.02$  (dd, 1 H, H-3),  $4.76$  (d, 1 H, H-1),  $4.37$  (dd, 1 H, H-6a),  $4.23$  (dd, 1 H, H-6b),  $4.21$  (ddd, 1 H, H-2),  $4.12$  (dddd, 1 H, All-1a),  $3.92$  (dddd, 1 H,

All-1b), 3.77 (ddd, 1 H, H-5), 3.47 (vt, 1 H, H-4), 1.87 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 1.18, 1.13 (2 s, 18 H, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 12.7, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.1, J<sub>All-1b,2</sub> = 6.1, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.3, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.2, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 1.5, J<sub>1,2</sub> = 4.1, J<sub>2,NH</sub> = 9.7, J<sub>2,3</sub> = 10.7, J<sub>3,4</sub> = 9.7, J<sub>4,5</sub> = 9.7, J<sub>5,6a</sub> = 4.6, J<sub>5,6b</sub> = 2.0, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 12.2 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 178.89, 178.20 (2 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 168.71 (COCH<sub>3</sub>), 132.20 (All-2), 117.11 (All-3), 95.52 (C-1), 72.41 (C-3), 69.56 (C-5), 68.13 (C-4), 67.31 (All-1), 61.99 (C-6), 50.36 (C-2), 37.99, 37.97 (2 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.23, 26.01 (6 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 22.22 (COCH<sub>3</sub>) ppm.

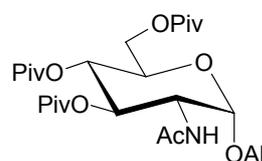
### Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-O-pivaloyl-α-D-glucopyranosid (13)

C<sub>26</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>9</sub> (513.63)

Ausbeute: 2.06 g (4.01 mmol, 6 %)

amorpher Feststoff

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +93° (c 1, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 536.3 [M+Na]<sup>+</sup>, 552.2 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5.84 (dddd, 1 H, All-2), 5.68 (d, 1 H, NH), 5.27 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.23 (vt, 1 H, H-3), 5.20 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 5.11 (vt, 1 H, H-4), 4.82 (d, 1 H, H-1), 4.35 (ddd, 1 H, H-2), 4.15 (dddd, 1 H, All-1a), 4.10 (dd, 1 H, H-6a), 4.03 (dd, 1 H, H-6b), 3.98-3.92 (m, 2 H, All-1b, H-5), 1.88 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>) 1.18, 1.10, 1.07 (3 s, 27 H, 3 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 12.7, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.3, J<sub>All-1b,2</sub> = 6.1, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.3, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.7, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 1.3, J<sub>1,2</sub> = 3.6, J<sub>2,NH</sub> = 9.7, J<sub>2,3</sub> = 10.4, J<sub>3,4</sub> = 9.7, J<sub>4,5</sub> = 9.7, J<sub>5,6a</sub> = 1.8, J<sub>5,6b</sub> = 5.1, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 12.2 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 179.13, 178.49, 176.70 (3 C, 3 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 170.11 (COCH<sub>3</sub>), 133.52 (All-2), 118.68 (All-3), 96.87 (C-1), 71.01 (C-3), 68.95 (All-1), 68.77 (C-5), 67.86 (C-4), 62.33 (C-6), 52.23 (C-2), 39.27, 39.19, 39.12 (3 C, 3 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.54, 27.49, 27.45 (9 C, 3 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23.54 (COCH<sub>3</sub>) ppm.

### **Allyl-2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-O-pivaloyl-α-D-galactopyranosid (14) und Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-O-pivaloyl-α-D-galactopyranosid (15)**

Die Reaktion wird unter strengen Schlenck-Bedingungen durchgeführt, Dichlormethan und Pyridin werden frisch vor der Umsetzung absolutiert und unter Schutzgas in die mehrmals gründlich ausgeheizte Apparatur überführt. Trifluormethansulfonsäureanhydrid wird unter Argon entnommen.

12.9 g (30.0 mmol) **12** werden in 250 ml absolutem Dichlormethan gelöst, mit 12.9 ml wasserfreiem Pyridin versetzt und auf -35 °C abgekühlt. 6.0 ml (36 mmol, 1.2 eq.) Trifluormethan-

sulfonsäureanhydrid werden sehr langsam über ein Septum zugetropft und die Reaktion wird allmählich auf 0 °C erwärmt. Nach acht Stunden bei dieser Temperatur werden 13 ml Wasser zugegeben und es wird unter Rückfluss weiter gerührt. Nach 9, 15 und 17 Stunden werden jeweils weitere 5 ml Wasser zugegeben. Nach insgesamt 54 Stunden wird zur Aufarbeitung mit 450 ml Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wird nacheinander mit verdünnter Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und mit Toluol codestilliert. Der verbleibende Rückstand wird an Kieselgel mit Petrolether (50-70) / Ethylacetat erst 2:3, dann 1:3 chromatographiert.

#### Allyl-2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-O-pivaloyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (14)

C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>8</sub> (429.51)

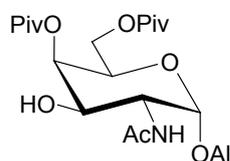
Ausbeute: 7.63 g (17.8 mmol, 59 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +71^\circ$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>)

Ber.: C 58.73 H 8.21 N 3.26

Gef.: C 58.52 H 8.26 N 3.04



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 430.5 [M+H]^+$ ,  $452.4 [M+Na]^+$ ,  $468.3 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 5.93$ - $5.83$  (m, 2 H, All-2, NH),  $5.29$  (bd, 1 H, H-4),  $5.27$ - $5.20$  (m, 2 H, All-3<sub>cis/trans</sub>),  $4.91$  (d, 1 H, H-1),  $4.34$  (ddd, 1 H, H-2),  $4.18$  (dddd, 1 H, All-1a),  $4.10$  (vt, 1 H, H-5),  $4.06$  (m<sub>c</sub>, 2 H, H-6a/b),  $3.98$  (dddd, 1 H, All-1b),  $3.93$  (ddd, 1 H, H-3),  $3.17$  (bd, 1 H, OH-3),  $2.02$  (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>)  $1.25$ ,  $1.17$  (2 s, 18 H, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 12.7, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.1, J<sub>All-1b,2</sub> = 6.6, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.3, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.4, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 1.3, J<sub>1,2</sub> = 3.6, J<sub>2,NH</sub> = 8.4, J<sub>2,3</sub> = 10.9, J<sub>3,4</sub> = 3.8, J<sub>3,OH</sub> = 3.3 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 178.35$ ,  $178.33$  (2 C, 2 CO<sub>C</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $172.82$  (COCH<sub>3</sub>),  $133.55$  (All-2),  $118.67$  (All-3),  $96.86$  (C-1),  $70.19$  (C-3),  $69.73$  (C-4),  $68.70$  (All-1),  $68.08$  (C-5),  $63.00$  (C-6),  $51.24$  (C-2),  $39.71$ ,  $39.14$  (2 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $27.65$ ,  $27.54$  (6 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $23.60$  (COCH<sub>3</sub>) ppm.

#### Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-O-pivaloyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (15)

C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>8</sub> (429.51)

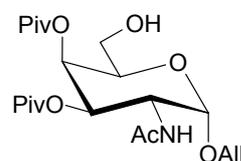
Ausbeute: 4.41 g (10.3 mmol, 34 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +105^\circ$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>)

Ber.: C 58.73 H 8.21 N 3.26

Gef.: C 58.86 H 8.38 N 3.21



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 430.5 [M+H]^+$ ,  $452.5 [M+Na]^+$ ,  $468.4 [M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.86$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.62$  (d, 1 H, NH),  $5.29$  (bd, 1 H, H-4),  $5.27$  (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.25$  (dd, 1 H, H-3),  $5.21$  (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $4.90$  (d, 1 H, H-1),  $4.67$  (ddd, 1 H, H-2),  $4.17$  (dddd, 1 H, All-1a),  $4.04$  (vt, 1 H, H-5),  $3.98$  (dddd, 1 H, All-1b),  $3.60$  (ddd, 1 H, H-6a),  $3.41$  (ddd, 1 H, H-6b),  $2.33$  (vt, 1 H, OH-6),  $1.91$  (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ )  $1.26$ ,  $1.10$  (2 s, 18 H, 2  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

$^2\text{J}_{\text{All-1a/b}} = 12.7$ ,  $\text{J}_{\text{All-1a,2}} = 5.3$ ,  $\text{J}_{\text{All-1b,2}} = 6.1$ ,  $\text{J}_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $\text{J}_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2\text{J}_{\text{All-3cis/trans}} = 1.3$ ,  $\text{J}_{1,2} = 3.6$ ,  $\text{J}_{2,\text{NH}} = 9.9$ ,  $\text{J}_{2,3} = 11.2$ ,  $\text{J}_{3,4} = 3.6$ ,  $\text{J}_{4,5} = 1.0$ ,  $\text{J}_{5,6a} = 6.9$ ,  $\text{J}_{5,6b} = 6.6$ ,  $^2\text{J}_{6a/b} = 11.7$ ,  $\text{J}_{6a,\text{OH}} = 7.1$ ,  $\text{J}_{6b,\text{OH}} = 6.9$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 179.09$ ,  $178.83$  (2 C, 2  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ),  $170.14$  ( $\text{COCH}_3$ ),  $133.71$  (All-2),  $118.56$  (All-3),  $97.54$  (C-1),  $70.30$  (C-5),  $69.11$  (All-1),  $68.89$  (C-3),  $68.57$  (C-4),  $61.22$  (C-6),  $48.63$  (C-2),  $39.65$ ,  $39.28$  (2 C, 2  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ),  $27.68$ ,  $27.40$  (6 C, 2  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ),  $23.65$  ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### **Methyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (16) und Methyl-2-acetamido-3,5,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-galactofuranosid (17)**

#### a) Durch Fischer-Glycosylierung aus *N*-Acetyl-D-galactosamin

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von **1** durch Fischer-Glycosylierung:

1.43 g (6.46 mmol) *N*-Acetyl-D-galactosamin, 15 ml absoluter Methanol, 50  $\mu\text{l}$  Acetylchlorid, 5 Stunden unter Rückfluss erhitzen. Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 5:1.

Der Rückstand wird nach **AAV 1** acetyliert:

7 ml Pyridin, 3.4 ml Essigsäureanhydrid. Laufmittel: Chloroform / Methanol 100:1. Ausbeute: 607 mg (1.68 mmol, 26 %) **16** und 960 mg (2.66 mmol, 41 %) **17**.

#### b) Aus **5** nach Azidonitratisierung

Die Glycosylierung erfolgt analog zur Darstellung von **6**:

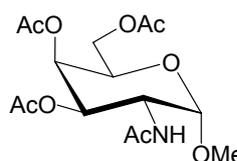
1.15 g (2.42 mmol) **5**, 150  $\mu\text{l}$  (3.70 mmol, 1.5 eq.) absoluter Methanol, 20 ml wasserfreier Diethylether, 1.2 ml (0.24 mmol) Trimethylsilyltrifluormethansulfonat-Lösung. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigungsschritte weiter verwendet.

Azid-Reduktion und *N*-Acetylierung analog zur Darstellung von **7**:

Rückstand in 40 ml absolutem Toluol lösen und mit 790 mg (3.01 mmol, 1.25 eq.) Triphenylphosphin und 275  $\mu\text{l}$  (3.85 mmol, 1.6 eq.) Acetylchlorid versetzen. Laufmittel: Chloroform / Methanol 100:1. Ausbeute: 699 mg (1.93 mmol, 80 %) **16**

Methyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (16)C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>9</sub> (361.35)

amorpher Feststoff

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +77° (c 1.2, CHCl<sub>3</sub>)MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 384.2 [M+Na]<sup>+</sup>, 400.2 [M+K]<sup>+</sup>

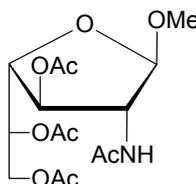
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 5.60 (d, 1 H, NH), 5.33 (bd, 1 H, H-4), 5.12 (dd, 1 H, H-3), 4.74 (d, 1 H, H-1), 4.55 (ddd, 1 H, H-2), 4.12-4.06 (m, 3 H, H-5, H-6a/b), 3.36 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.12, 2.02, 1.96, 1.93 (4 s, 12 H, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

J<sub>1,2</sub> = 3.6, J<sub>2,NH</sub> = 9.7, J<sub>2,3</sub> = 11.2, J<sub>3,4</sub> = 3.3 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 171.33, 171.12, 170.84, 170.39 (4 C, 4 C=O), 99.13 (C-1), 68.85 (C-3), 67.85 (C-4), 67.04 (C-5), 62.25 (C-6), 55.85 (OCH<sub>3</sub>), 48.21 (C-2), 23.73, 21.22, 21.14, 21.05 (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

Methyl-2-acetamido-3,5,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-galactofuranosid (17)C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>9</sub> (361.35)

weiße Kristalle, Smp.: 131 °C

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -50° (c 1, CHCl<sub>3</sub>)Lit.:<sup>273</sup> Smp.: 129 °C[ $\alpha$ ] = -47° (CHCl<sub>3</sub>)MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 384.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 400.1 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 5.97 (d, 1 H, NH), 5.33 (ddd, 1 H, H-5), 4.81 (s, 1 H, H-1), 4.74 (dd, 1 H, H-3), 4.36-4.31 (m, 2 H, H-2, H-6a), 4.22 (dd, 1 H, H-6b), 4.16 (dd, 1 H, H-4), 3.35 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.12, 2.06, 2.03, 1.98 (4 s, 12 H, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

J<sub>2,NH</sub> = 7.6, J<sub>2,3</sub> = 2.5, J<sub>3,4</sub> = 5.1, J<sub>4,5</sub> = 4.1, J<sub>5,6a</sub> = 4.3, J<sub>5,6b</sub> = 6.9, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 12.0 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 171.07, 170.92, 170.43, 169.92 (4 C, 4 C=O), 108.32 (C-1), 80.21 (C-4), 78.34 (C-3), 70.39 (C-5), 62.99 (C-6), 60.76 (C-2), 55.54 (OCH<sub>3</sub>), 23.06, 21.32, 21.15, 21.12 (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

**Methyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (18)****a) Aus 16**

Die Deacetylierung von **16** erfolgt gemäß **AAV 2a**:

513 mg (1.42 mmol) **16**, 30 ml abs. Methanol, 0.5 ml Natriummethanolat-Lösung, 22 Stunden. Ausbeute: 333 mg (1.42 mmol, quant.)

**b) Aus 28 oder 29 (nach Epimerisierung an Position 4)**

Die Entschützung erfolgt nach **AAV 2a**:

900 mg (2.23 mmol) **28** oder **29**, 50 ml abs. Methanol, 3.0 ml Natriummethanolat-Lösung, 4 Tage. Ausbeute: 514 mg (2.19 mmol, 98 %).

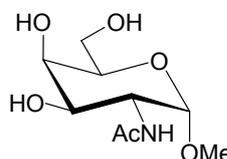
$C_9H_{17}NO_6$  (235.24)

weißes Pulver, Smp.: 215 °C

$[\alpha]_D^{20} = +123^\circ$  (c 1, DMSO)

Lit.:<sup>366</sup> Smp.: 212-213 °C

$[\alpha]_D^{28} = +166^\circ$  (MeOH)



$^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO+D<sub>2</sub>O):  $\delta = 4.56$  (d, 1 H, H-1), 4.05 (dd, 1 H, H-2), 3.63-3.57 (m, 2 H, H-3, H-4), 3.52 (m<sub>c</sub>, 2 H, H-6a/b), 3.26 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.86 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>) ppm.

$J_{1,2} = 3.3$ ,  $J_{2,3} = 10.9$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz, DMSO+D<sub>2</sub>O):  $\delta = 169.98$  (COCH<sub>3</sub>), 98.66 (C-1), 71.52 (C-3), 68.51 (C-5), 67.93 (C-4), 61.09 (C-6), 54.73 (OCH<sub>3</sub>), 50.14 (C-2), 23.06 (COCH<sub>3</sub>) ppm.

**Methyl-2-acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-galactofuranosid (19)**

Die Deacetylierung von **17** erfolgt gemäß **AAV 2b**:

500 mg (1.38 mmol) **17**, 25 ml abs. Methanol, 500  $\mu$ l NH<sub>3</sub>-Lösung, 19 Stunden, Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 3:1.

$C_9H_{17}NO_6$  (235.24)

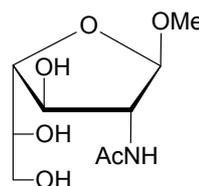
Ausbeute: 303 mg (1.29 mmol, 93 %)

weißer Feststoff, Smp.: 166 °C

$[\alpha]_D^{20} = -61^\circ$  (c 1, DMSO)

Lit.:<sup>203</sup> Smp.: 168-170 °C

$[\alpha]_D^{20} = -73^\circ$  (c 0.12, H<sub>2</sub>O)



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.01 (d, 1 H, NH), 4.58 (d, 1 H, H-1), 3.98 (ddd, 1 H, H-2), 3.91 (dd, 1 H, H-3), 3.74 (dd, 1 H, H-4), 3.52 (ddd, 1 H, H-5), 3.40 (m<sub>c</sub>, 2 H, H-6a/b), 3.22 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.82 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>) ppm.

$J_{1,2} = 2.8$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 7.9$ ,  $J_{2,3} = 5.7$ ,  $J_{3,4} = 7.6$ ,  $J_{4,5} = 2.8$ ,  $J_{5,6a} = 6.0$ ,  $J_{5,6b} = 6.6$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, DMSO):  $\delta$  = 169.44 (COCH<sub>3</sub>), 107.56 (C-1), 82.36 (C-4), 75.18 (C-3), 70.49 (C-5), 63.14 (C-6), 62.70 (C-2), 54.47 (OCH<sub>3</sub>), 23.03 (COCH<sub>3</sub>) ppm.

### Benzyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**20**)

#### a) Durch Fischer-Glycosylierung aus *N*-Acetyl-D-galactosamin

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von **1** durch Fischer-Glycosylierung:

2.0 g (9.04 mmol) *N*-Acetyl-D-galactosamin, 40 ml wasserfreier Benzylalkohol, 150  $\mu\text{l}$  Acetylchlorid, 17 Stunden auf 100 °C erhitzen. Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 8:1. Ausbeute: 1.11 g (3.56 mmol, 39 %).

#### b) Aus **22** (nach Azidonitratisierung)

Die Deacetylierung von **22** erfolgt gemäß **AAV 2a**:

1.75 g (4.0 mmol) **22**, 50 ml abs. Methanol, 0.8 ml Natriummethanolat-Lösung, 6 Stunden. Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 8:1. Ausbeute: 1.13 g (3.63 mmol, 91 %).

#### c) Aus **27** (Epimerisierung an Position 4 und Entschützung)

Die Umsetzung erfolgt in Analogie zur Darstellung von **14** und **15**:

4.3 g (8.97 mmol) **27**, 80 ml abs. Dichlormethan, 4 ml abs. Pyridin, 1.8 ml (10.7 mmol, 1.2 eq.) Trifluormethansulfonsäureanhydrid, bei 0 °C 6 Stunden Reaktionszeit. 15 ml Wasser, weitere 4 Tage Reaktionszeit. Petrolether (50-70) / Ethylacetat 3:1. Es entstehen 3.82 g (7.97 mmol, 89 %) eines Gemisches aus zwei Regioisomeren, dass nicht getrennt werden kann und für die folgende Deacylierung direkt eingesetzt wird.

Die Entschützung erfolgt nach **AAV 2a**:

3.80 g (7.92 mmol) des Rückstands in 100 ml Methanol aufnehmen. 3.5 ml Natriummethanolat-Lösung, 5 Tage. Ausbeute: 2.29 g (7.36 mmol, 93 %).

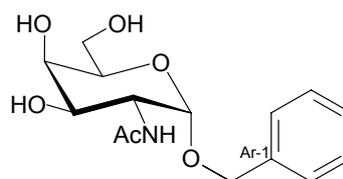
$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_6$  (311.33)

weißer Feststoff, Smp.: 196 °C

$[\alpha]_D^{20} = +187^\circ$  (c 0.5, DMSO)

Lit.:<sup>206</sup> Smp.: 202-205 °C

$[\alpha]_D^{23} = +204^\circ$  (c 1, H<sub>2</sub>O)



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta = 7.76$  (d, 1 H, NH), 7.41-7.29 (m, 5 H, Ar), 4.74 (d, 1 H, H-1), 4.68 (d, 1 H,  $\text{OCH}_2\text{Ph-a}$ ), 4.44 (d, 1 H,  $\text{OCH}_2\text{Ph-b}$ ), 4.09 ( $m_c$ , 1 H, H-2), 3.78 (bd, 1 H, H-4), 3.73-3.69 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.58 (d, 1 H, H-6a), 3.52 (d, 1 H, H-6b), 1.86 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^2J_{\text{OCH}_2\text{Ph-a/b}} = 12.2$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 7.6$ ,  $J_{3,4} = 2.5$ ,  $J_{5,6a} = 5.6$ ,  $J_{5,6b} = 6.6$ ,  $^2J_{6a/b} = 10.7$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, DMSO):  $\delta = 169.92$  ( $\underline{\text{COCH}_3}$ ), 138.43 (Ar-1), 128.53 (2 C, Ar-3/5), 127.81 (Ar-4), 127.72 (2 C, Ar-2/6), 96.65 (C-1), 71.93 (C-5), 68.55 (C-4), 68.08 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67.72 (C-3), 61.07 (C-6), 50.11 (C-2), 23.01 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

## 2-(Trimethylsilyl)-ethyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (21)

### a) Durch Fischer-Glycosylierung aus *N*-Acetyl-D-galactosamin

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von **1** durch Fischer-Glycosylierung:

1.0 g (4.52 mmol) *N*-Acetyl-D-galactosamin, 7.5 ml (52.6 mmol, 11.6 eq.) 2-Trimethylsilyl-ethanol, 1 ml Dimethylsulfoxid, 50  $\mu\text{l}$  Acetylchlorid, 5½ Stunden auf 100 °C erhitzen. Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 10:1. Ausbeute: 739 mg (2.30 mmol, 51 %).

### b) Aus **23** (nach Azidonitratisierung)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV **2a**:

534 mg (1.19 mmol) **7**, 15 ml abs. Methanol, 0.25 ml Natriummethanolat-Lösung, 18 Stunden. Ausbeute: 297 mg (924  $\mu\text{mol}$ , 77 %).

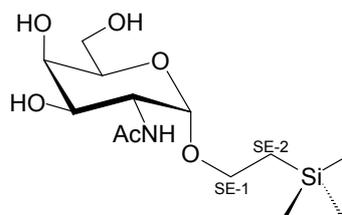
$\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{NO}_6\text{Si}$  (321.45)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +152^\circ$  (c 1.1, MeOH)

Ber.: C 48.58 H 8.47 N 4.36

Gef.: C 48.48 H 8.58 N 4.37



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 322.5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 344.4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 360.3  $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 4.84$  (d, 1 H, H-1), 4.24 (dd, 1 H, H-2), 3.88 (bd, 1 H, H-4), 3.84-3.79 (m, 2 H, SE-1a, H-5), 3.76 (dd, 1 H, H-3), 3.73-3.88 (m, 2 H, H-6a/b), 3.49 (ddd, 1 H, SE-1b), 1.99 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.02 (ddd, 1 H, SE-2a), 0.93 (ddd, 1 H, SE-2b), 0.04 (s, 9 H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

$^2J_{\text{SE-1a/b}} = 10.4$ ,  $J_{\text{SE-1a,2a}} = 10.9$ ,  $J_{\text{SE-1a,2b}} = 5.8$ ,  $J_{\text{SE-1b,2a}} = 6.1$ ,  $J_{\text{SE-1b,2b}} = 10.1$ ,  $^2J_{\text{SE-2a/b}} = 14.2$ ,  $J_{1,2} = 3.8$ ,  $J_{2,3} = 10.9$ ,  $J_{3,4} = 2.8$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 173.28$  ( $\text{C}=\text{OCH}_3$ ), 97.62 (C-1), 71.83 (C-5), 69.77 (C-4), 69.21 (C-3), 65.60 (SE-1), 62.18 (C-6), 51.07 (C-2), 22.06 ( $\text{COCH}_3$ ), 18.10 (SE-2), -1.83 (3 C,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

### Benzyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (22)

Die Glycosylierung erfolgt analog zur Darstellung von 6:

2.86 g (6.01 mmol) **5**, 950  $\mu\text{l}$  (9.22 mmol, 1.5 eq.) Benzylalkohol, 50 ml absoluter Diethylether, 3.0 ml (0.6 mmol) Trimethylsilyltrifluormethansulfonat-Lösung. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigungsschritte weiter verwendet.

Azid-Reduktion und *N*-Acetylierung analog zur Darstellung von 7:

Rückstand in 80 ml absolutem Toluol lösen und mit 1.97 g (7.51 mmol, 1.25 eq.) Triphenylphosphin und 650  $\mu\text{l}$  (9.11 mmol, 1.5 eq.) Acetylchlorid versetzen. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:5.

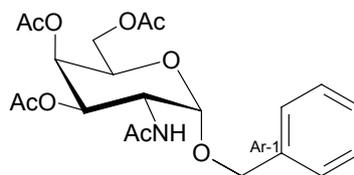
$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_9$  (437.45)

Ausbeute: 2.0 g (4.57 mmol, 76 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +217^\circ$  (c 0.5,  $\text{CHCl}_3$ )

Lit.:<sup>253</sup>  $[\alpha]_D^{20} = +206^\circ$  (c 2,  $\text{CHCl}_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 438.2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 460.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.55$ -7.41 (m, 5 H, Ar), 5.53 (d, 1 H, NH), 5.37 (bd, 1 H, H-4), 5.16 (dd, 1 H, H-3), 4.96 (d, 1 H, H-1), 4.70 (d, 1 H,  $\text{OCH}_2\text{Ph-a}$ ), 4.57 (ddd, 1 H, H-2), 4.48 (d, 1 H,  $\text{OCH}_2\text{Ph-b}$ ), 4.20 (vt, 1 H, H-5), 4.10 (d, 1 H, H-6a), 4.05 (d, 1 H, H-6b), 2.14, 2.04, 1.96, 1.89 (4 s, 12 H, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^2J_{\text{OCH}_2\text{Ph-a/b}} = 11.7$ ,  $J_{1,2} = 3.8$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 9.8$ ,  $J_{2,3} = 11.3$ ,  $J_{3,4} = 3.2$ ,  $J_{5,6a} = 6.0$ ,  $J_{5,6b} = 6.9$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.4$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 169.72$ , 169.54, 169.09, 168.95 (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ), 139.02 (Ar-1), 131.06 (2 C, Ar-3/5), 127.69 (Ar-4), 127.22 (2 C, Ar-2/6), 95.99 (C-1), 69.13 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67.43 (C-3), 66.36 (C-4), 65.94 (C-3), 60.89 (C-6), 46.73 (C-2), 22.26, 20.01, 19.74, 19.70 (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### 2-(Trimethylsilyl)-ethyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (23)

Die Glycosylierung erfolgt entsprechend der Synthese von 6:

1.15 g (2.42 mmol) **5**, 550  $\mu\text{l}$  (3.84 mmol, 1.6 eq.) 2-(Trimethylsilyl)-ethanol, 20 ml absoluter Diethylether, 1.2 ml (0.24 mmol) Trimethylsilyltrifluormethansulfonat-Lösung. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigungsschritte weiter verwendet.

Azid-Reduktion und *N*-Acetylierung analog zur Darstellung von **7**:

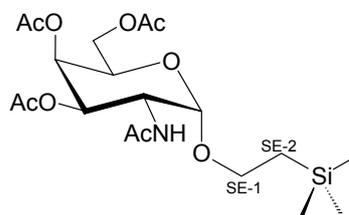
Rückstand in 40 ml absolutem Toluol lösen und mit 790 mg (3.01 mmol, 1.25 eq.) Triphenylphosphin und 275  $\mu$ l (3.85 mmol, 1.6 eq.) Acetylchlorid versetzen. Laufmittel: Petrol-ether (50-70) / Ethylacetat 1:2.

$C_{19}H_{33}NO_9Si$  (447.56)

Ausbeute: 824 mg (1.84 mmol, 76 %)

farbloses Öl

$[\alpha]_D^{20} = +169^\circ$  (c 1,  $CHCl_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 448.3 [M+H]^+$ ,  $470.3 [M+Na]^+$ ,  $486.3 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 5.53$  (d, 1 H, NH),  $5.35$  (bd, 1 H, H-4),  $5.15$  (dd, 1 H, H-3),  $4.87$  (d, 1 H, H-1),  $4.55$  (ddd, 1 H, H-2),  $4.17$ - $4.08$  (m, 2 H, H-5, H-6a),  $4.04$  (dd, 1 H, H-6b),  $3.76$  (ddd, 1 H, SE-1a),  $3.49$  (ddd, 1 H, SE-1b),  $2.14$ ,  $2.02$ ,  $1.97$ ,  $1.94$  (4 s, 12 H, 4  $COCH_3$ ),  $0.98$  (ddd, 1 H, SE-2a),  $0.89$  (ddd, 1 H, SE-2b),  $0.03$  (s, 9 H,  $Si(CH_3)_3$ ) ppm.

$^2J_{SE-1a/b} = 9.9$ ,  $J_{SE-1a,2a} = 11.2$ ,  $J_{SE-1a,2b} = 5.6$ ,  $J_{SE-1b,2a} = 6.1$ ,  $J_{SE-1b,2b} = 10.9$ ,  $^2J_{SE-2a/b} = 13.7$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,NH} = 9.9$ ,  $J_{2,3} = 11.2$ ,  $J_{3,4} = 3.3$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{5,6b} = 7.1$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 172.40$ ,  $170.36$ ,  $170.21$ ,  $169.96$  (4 C, 4  $COCH_3$ ),  $98.57$  (C-1),  $70.03$  (C-3),  $68.97$  (C-4),  $68.19$  (C-5),  $67.15$  (SE-1),  $63.65$  (C-6),  $49.24$  (C-2),  $24.77$ ,  $22.16$ ,  $22.09$ ,  $21.78$  (4 C, 4  $COCH_3$ ),  $19.40$  (SE-2),  $-0.65$  (3 C,  $Si(CH_3)_3$ ) ppm.

### Methyl-2-acetamido-2-desoxy-3,6-di-*O*-pivaloyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid (**26**)

Die Glycosylierung erfolgt entsprechend der Synthese von **12**:

4.70 g (20.0 mmol) Methyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosid<sup>207</sup> (**24**), 20 ml abs. Dichlormethan, 40 ml abs. Pyridin, 7.50 ml (60.3 mmol, 3.0 eq.) Pivalinsäurechlorid, 4½ Stunden bei 0 °C. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:1.

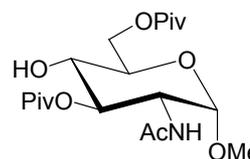
$C_{19}H_{33}NO_8$  (403.47)

Ausbeute: 5.88 g (14.6 mmol, 73 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +58^\circ$  (c 1,  $CHCl_3$ )

Lit.:<sup>193</sup>  $[\alpha]_D^{20} = +52^\circ$  (c 1,  $CHCl_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 426.2 [M+Na]^+$ ,  $442.2 [M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.76$  (d, 1 H, NH), 5.02 (dd, 1 H, H-3), 4.65 (d, 1 H, H-1), 4.38 (dd, 1 H, H-6a), 4.31 (dd, 1 H, H-6b), 4.25 (ddd, 1 H, H-2), 3.77 (ddd, 1 H, H-5), 3.50 (vt, 1 H, H-4), 3.36 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 1.90 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.21, 1.16 (2 s, 18 H, 2  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.  
 $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 9.9$ ,  $J_{2,3} = 10.7$ ,  $J_{3,4} = 9.4$ ,  $J_{4,5} = 9.9$ ,  $J_{5,6a} = 4.8$ ,  $J_{5,6b} = 2.3$ ,  $^2J_{6a/b} = 12.2$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 180.33$ , 179.47 (2 C, 2  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ), 170.20 ( $\text{COCH}_3$ ), 98.86 (C-1), 73.93 (C-3), 70.68 (C-5), 69.60 (C-4), 63.50 (C-6), 55.57 ( $\text{OCH}_3$ ), 51.85 (C-2), 39.42, 39.37 (2 C, 2  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ), 27.65, 27.43 (6 C, 2  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ), 23.59 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### Benzyl-2-acetamido-2-desoxy-3,6-di-O-pivaloyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid (27)

Die Pivaloylierung erfolgt analog der Darstellung von **12**:

4.67 g (15.0 mmol) Benzyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosid<sup>208</sup> (**25**), 15 ml abs. Dichlormethan, 30 ml abs. Pyridin, 5.70 ml (46.3 mmol, 3.1 eq.) Pivalinsäurechlorid, 9 Stunden im Eisbad. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 4:1.

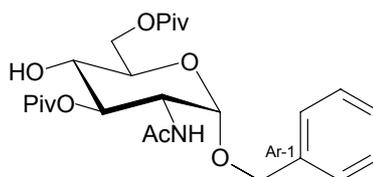
$\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{NO}_8$  (479.51)

Ausbeute: 6.03 g (12.6 mmol, 84 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +78^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )

Lit.:<sup>193</sup>  $[\alpha]_D^{20} = +81^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 502.2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 518.2  $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.61$ -7.42 (m, 5 H, Ar), 5.76 (d, 1 H, NH), 5.02 (dd, 1 H, H-3), 4.65 (d, 1 H, H-1), 4.60 (d, 1 H,  $\text{OCH}_2\text{Ph-a}$ ), 4.46 (d, 1 H,  $\text{OCH}_2\text{Ph-b}$ ), 4.38 (dd, 1 H, H-6a), 4.31 (dd, 1 H, H-6b), 4.25 (ddd, 1 H, H-2), 3.77 (ddd, 1 H, H-5), 3.50 (vt, 1 H, H-4), 1.90 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.21, 1.16 (2 s, 18 H, 2  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

$^2J_{\text{OCH}_2\text{Ph-a/b}} = 11.7$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 9.8$ ,  $J_{2,3} = 10.4$ ,  $J_{3,4} = 9.7$ ,  $J_{4,5} = 9.5$ ,  $J_{5,6a} = 4.3$ ,  $J_{5,6b} = 2.5$ ,  $^2J_{6a/b} = 12.2$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 179.72$ , 178.91 (2 C, 2  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ), 169.71 ( $\text{COCH}_3$ ), 138.71 (Ar-1), 128.16 (2 C, Ar-3/5), 127.73 (Ar-4), 127.33 (2 C, Ar-2/6), 98.26 (C-1), 73.35 (C-3), 70.07 (C-5), 69.11 (C-4), 68.75 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 62.94 (C-6), 51.39 (C-2), 38.90, 38.71 (2 C, 2  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ), 27.11, 26.95 (6 C, 2  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ), 22.99 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### Methyl-2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-pivaloyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (28) und Methyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-*O*-pivaloyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (29)

Die Umsetzung erfolgt in Analogie zur Darstellung von **14** und **15**:

4.04 g (10.0 mmol) **26**, 85 ml abs. Dichlormethan, 4.3 ml abs. Pyridin, 2.0 ml (12 mmol, 1.2 eq.) Trifluormethansulfonsäureanhydrid, bei 0 °C 4 Stunden Reaktionszeit. 6.3 ml Wasser, weitere 22 Stunden Reaktionszeit. Petrolether (50-70) / Ethylacetat 2:3.

#### Methyl-2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-pivaloyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (28)

C<sub>19</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>8</sub> (403.47)

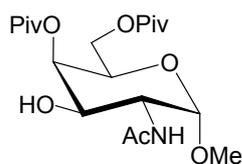
Ausbeute: 1.83 g (4.54 mmol, 45 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +78^\circ$  (c 1.1, CHCl<sub>3</sub>)

Ber.: C 56.56 H 8.24 N 3.47

Gef.: C 55.34 H 8.06 N 3.49



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 426.3 [M+Na]^+$ ,  $442.3 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 5.90$  (d, 1 H, NH),  $5.28$  (bd, 1 H, H-4),  $4.76$  (d, 1 H, H-1),  $4.32$  (ddd, 1 H, H-2),  $4.08$ - $4.04$  (m, 3 H, H-5, H-6a/b),  $3.91$  (dd, 1 H, H-3),  $3.38$  (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>),  $2.80$  (bs, 1 H, OH-3),  $2.03$  (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>)  $1.26$ ,  $1.17$  (2 s, 18 H, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

$J_{1,2} = 3.8$ ,  $J_{2,NH} = 8.4$ ,  $J_{2,3} = 10.7$ ,  $J_{3,4} = 3.1$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 178.39$ ,  $178.28$  (2 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $172.97$  (COCH<sub>3</sub>),  $98.81$  (C-1),  $70.41$  (C-3),  $69.63$  (C-4),  $67.82$  (C-5),  $62.97$  (C-6),  $55.68$  (OCH<sub>3</sub>),  $51.37$  (C-2),  $39.71$ ,  $39.15$  (2 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $27.66$ ,  $27.55$  (6 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $23.60$  (COCH<sub>3</sub>) ppm.

#### Methyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-*O*-pivaloyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (29)

C<sub>19</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>8</sub> (403.47)

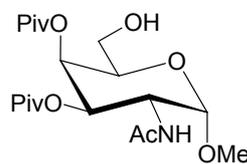
Ausbeute: 1.75 g (4.34 mmol, 43 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +108^\circ$  (c 0.3, CHCl<sub>3</sub>)

Ber.: C 56.56 H 8.24 N 3.47

Gef.: C 56.00 H 8.13 N 3.27



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 426.2 [M+Na]^+$ ,  $442.2 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 5.63$  (d, 1 H, NH),  $5.28$  (bd, 1 H, H-4),  $5.21$  (dd, 1 H, H-3),  $4.74$  (d, 1 H, H-1),  $4.66$  (ddd, 1 H, H-2),  $3.99$  (vt, 1 H, H-5),  $3.61$  (dd, 1 H, H-6a),  $3.42$  (dd, 1 H,

H-6b), 3.38 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.16 (bs, 1 H, OH-6), 1.91 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>) 1.27, 1.10 (2 s, 18 H, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

$J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,NH} = 9.9$ ,  $J_{2,3} = 11.2$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{5,6a} = 6.9$ ,  $J_{5,6b} = 6.6$ ,  ${}^2J_{6a/b} = 11.7$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 179.06$ , 178.79 (2 C, 2 CO C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 170.11 (COCH<sub>3</sub>), 99.37 (C-1), 70.09 (C-5), 68.88 (C-3), 68.55 (C-4), 61.27 (C-6), 55.85 (OCH<sub>3</sub>), 48.61 (C-2), 39.65, 39.27 (2 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.68, 27.40 (6 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23.68 (COCH<sub>3</sub>) ppm.

### Ethyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid (**32**)

#### a) Darstellung aus dem $\beta$ -Peracetat **30**

4.59 g (11.8 mmol) 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-galactopyranose<sup>367</sup> (**30**) werden in 150 ml 1,2-Dichlorethan über 8 g aktiviertem Molekularsieb 4 Å gelöst und bei -30 °C mit 1.7 ml (23.0 mmol, 2 eq.) Ethanthiol versetzt. Nach einer Stunde bei dieser Temperatur werden 1.6 ml (13.7 mmol, 1.2 eq.) Zinntetrachlorid zugegeben. Die Reaktion wird 2 Stunden stehen gelassen und dann durch Zugabe von 120 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung beendet. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Anschluss gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand chromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Toluol / Ethylacetat 1:2) gereinigt. Ausbeute: 1.75 g (4.47 mmol, 38 %).

#### b) $\alpha$ -Peracetat **31** als Glycosyldonor

Zu einer Lösung von 1.13 g (2.90 mmol) 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranose<sup>367</sup> (**31**) in 17 ml 1,2-Dichlorethan werden bei 50 °C zuerst 6.4 g (20.0 mmol, 6.9 eq.) Zinkiodid und anschließend 1.8 ml (11.1 mmol, 3.8 eq.) Ethylthiotrimethylsilan zugegeben. Nach 8 Stunden bei 50 °C wird mit Dichlormethan verdünnt und durch Celite filtriert und danach mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel abgedampft. Säulenchromatographische Reinigung mit Laufmittel: Toluol / Ethylacetat 1:2 ergibt 857 mg (2.19 mmol, 75 %) **32**.

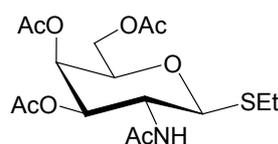
C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>8</sub>S (391.44)

gelblicher Feststoff, Smp.: 183 °C

$[\alpha]_D^{20} = -57^\circ$  (c 0.5, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>)

Lit.:<sup>213</sup> Smp.: 191-194 °C

$[\alpha]_D^{20} = -34^\circ$  (c 1, MeOH)



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>):  $\delta = 5.85$  (d, 1 H, NH), 5.71 (d, 1 H, H-1), 5.53 (dd, 1 H, H-4), 5.26 (dd, 1 H, H-3), 5.17 (ddd, 1 H, H-2), 4.54 (dt, 1 H, H-5), 4.24 (dd, 1 H, H-6a), 4.17 (dd, 1 H,

H-6b), 2.36-2.24 (m, 2 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.73, 1.66, 1.65, 1.62 (4 s, 12 H, 4 COCH<sub>3</sub>), 1.03 (t, 3 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

$J_{\text{SCH}_2\text{CH}_3, \text{SCH}_2\text{CH}_3} = 7.4$ ,  $J_{1,2} = 10.2$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 8.4$ ,  $J_{2,3} = 11.7$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{4,5} = 1.3$ ,  $J_{5,6a} = 6.4$ ,  $J_{5,6b} = 6.9$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>):  $\delta = 171.01$ , 170.41, 169.95, 169.80 (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>), 85.65 (C-1), 69.49 (C-3), 68.05 (C-5), 67.96 (C-4), 62.19 (C-6), 49.11 (C-2), 25.54 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.86, 20.68, 20.43, 20.32 (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>), 15.43 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

### Ethyl-2-acetamido-2-desoxy-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid (33)

Die Entschützung erfolgt gemäß AAV 2a:

360 mg (920  $\mu$ mol) **32**, 25 ml Methanol, 0.1 ml Natriummethanolat-Lösung, 5 Stunden.

Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 7:1

C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>S (265.32)

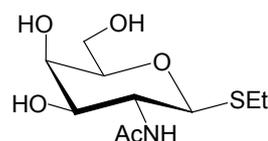
Ausbeute: 211 mg (795  $\mu$ mol, 86 %)

gelblicher Feststoff, Smp.: 217 °C

$[\alpha]_D^{20} = -5^\circ$  (c 0.7, DMSO)

Lit.:<sup>368</sup> Smp.: 231-231.5 °C

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



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD / DMSO):  $\delta = 5.57$  (d, 1 H, H-1), 4.38 (dd, 1 H, H-2), 4.13 (vt, 1 H, H-5), 3.92 (d, 1 H, H-4), 3.76-3.66 (m, 3 H, H-3, H-6a/b), 2.63-2.55 (m, 2 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 1.29 (t, 3 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

$J_{\text{SCH}_2\text{CH}_3, \text{SCH}_2\text{CH}_3} = 7.4$ ,  $J_{1,2} = 10.7$ ,  $J_{2,3} = 11.4$ ,  $J_{3,4} = 1.9$ ,  $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 6.0$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, MeOD / DMSO):  $\delta = 173.41$ , (COCH<sub>3</sub>), 85.49 (C-1), 73.70 (C-5), 70.52 (C-4), 69.93 (C-3), 63.01 (C-6), 52.48 (C-2), 25.77 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23.86 (COCH<sub>3</sub>), 13.39 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

### 5-Acetamido-6,7,9-tri-O-acetyl-4,8-anhydro-1,2,3,5-tetradesoxy-D-glycero-L-gluco-nona-1-enitol (35)

Die Reaktion wird unter strengen Schlenck-Bedingungen durchgeführt, Toluol wird frisch vor der Umsetzung absolutiert, unter Schutzgas in die ausgeheizte Apparatur überführt und mit Argon gründlich entgast.

Eine Lösung von 400 mg (1.09 mmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosylchlorid<sup>223</sup> in 5 ml trockenem Toluol wird für 10 Minuten entgast, mit 3.4 ml (11 mmol, 10 eq.) Allyltributylzinn und 40 mg (0.24 mmol, 0.2 eq.) AIBN versetzt und weitere 30 Minuten entgast. Anschließend wird die Reaktion 7 Stunden unter einer Argonatmosphäre auf 85 °C

erhitzt. Das Toluol wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Acetonitril aufgenommen und die Lösung mehrmals mit Pentan gewaschen. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Laufmittel Ethylacetat / Hexan von 1:1 über 2:1 bis 4:1) ergibt 19.9 mg (53.6  $\mu\text{mol}$ , 4.9 %) **35** und 256 mg (0.78 mmol, 71 %) 4,5-Dihydro-2-methyl-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-1,2-didesoxy- $\alpha$ -D-galactopyranoso)-[2,1-d]-1,3-oxazolin (**34**).

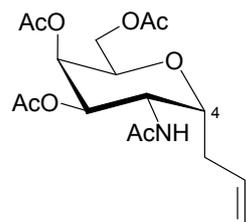
$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_8$  (371.39)

weißer Feststoff, Smp.: 117 °C

$[\alpha]_D^{20} = +75^\circ$  (c 0.2,  $\text{CHCl}_3$ )

Lit.:<sup>222</sup> Smp.: 129-130 °C

$[\alpha]_D^{20} = +81^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 394.1$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $410.1$   $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.65$  (ddt, 1 H, H-2), 5.48 (d, 1 H, NH), 5.40 (dd, 1 H, H-7), 5.17 (dd, 1 H, H-6), 5.07-4.95 (m, 2 H, H-1a/b), 4.79 (ddd, 1 H, H-5), 4.40-4.34 (m, 2 H, H-4, H-9a), 4.29 (dd, 1 H, H-9b), 4.00 ( $m_c$ , 1 H, H-8), 2.22 ( $m_c$ , 1 H, H-3a), 2.02 ( $m_c$ , 1 H, H-3b), 1.71, 1.65, 1.63, 1.51 (4 s, 12 H, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$J_{1a,2} = 10.3$ ,  $J_{1b,2} = 17.2$ ,  $J_{2,3a} = 6.7$ ,  $J_{2,3b} = 6.9$ ,  $J_{4,5} = 4.8$ ,  $J_{5,\text{NH}} = 8.6$ ,  $J_{5,6} = 9.4$ ,  $J_{6,7} = 3.0$ ,  $J_{7,8} = 2.5$ ,  $J_{8,9b} = 5.7$ ,  $^2J_{9a/b} = 11.8$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.32$ , 170.14, 169.65, 169.56 (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ), 134.20 (C-2), 117.54 (C-1), 71.32 (C-4), 68.77 (C-8), 67.99 (C-6), 65.18 (C-7), 60.92 (C-9), 49.34 (C-5), 33.05 (C-3), 23.17, 20.31, 20.24, 20.08 (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### 5-Acetamido-4,8-anhydro-1,2,3,5-tetradesoxy-D-glycero-L-gluco-nona-1-enitol (**36**)

Die Entschützung erfolgt gemäß **AAV 2a**:

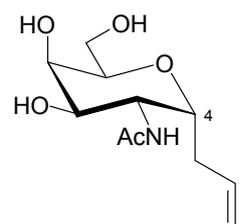
18.6 mg (50.1  $\mu\text{mol}$ ) **35**, 2 ml Methanol, 10  $\mu\text{l}$  Natriummethanolat-Lösung, 12 Stunden.  
Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 10:1

$\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_5$  (245.28)

Ausbeute: 9.0 mg (37  $\mu\text{mol}$ , 73 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +63^\circ$  (c 0.04, DMSO)



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD / DMSO):  $\delta = 5.61$  (ddt, 1 H, H-2), 5.12-5.01 (m, 2 H, H-1a/b), 4.64 (d, 1 H, H-4), 4.43-4.35 (m, 2 H, H-9a/b), 4.15-4.01 (m, 3 H, H-5, H-7, H-8), 3.71 (dd, 1 H, H-6), 2.19 (mc, 1 H, H-3a), 2.07 (mc, 1 H, H-3b), 1.68 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$J_{1a,2} = 10.1$ ,  $J_{1b,2} = 17.4$ ,  $J_{2,3a} = 6.9$ ,  $J_{2,3b} = 6.6$ ,  $J_{4,5} = 4.7$ ,  $J_{5,6} = 10.2$ ,  $J_{6,7} = 3.5$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD / DMSO):  $\delta = 168.93$  ( $\underline{\text{COCH}_3}$ ), 135.33 (C-2), 116.97 (C-1), 71.21 (C-4), 69.12 (C-8), 68.84 (C-6), 66.93 (C-7), 62.13 (C-9), 51.79 (C-5), 32.87 (C-3), 22.91 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### 6,7,9-Tri-*O*-acetyl-4,8-anhydro-1,2,3,5-tetradesoxy-5-tetrachlorophthalimido-*D*-glycero-*D*-gulo-nona-1-enitol (38)

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von **35**:

809.6 mg (1.27 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-tetrachlorophthalimido- $\alpha,\beta$ -*D*-galactopyranosylbromid,<sup>369</sup> 6 ml Benzol, 4.6 ml (15 mmol, 12 eq.) Allyltributylzinn, 60.6 mg (369  $\mu\text{mol}$ , 0.3 eq.) AIBN, 14 Stunden Reaktionszeit.

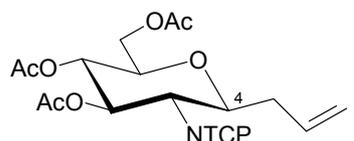
Zur Aufarbeitung werden 24 ml Diethylether zur abgekühlten Reaktionslösung gegeben und mit 39 ml einer 10%igen Kaliumfluorid-Lösung versetzt. Ein weißer Feststoff fällt aus und wird abfiltriert. Das Filtrat wird mit Diethylether verdünnt und anschließend mit Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand mit Petrolether (50-70) / Ethylacetat an Kieselgel gereinigt.

$\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{Cl}_4\text{NO}_9$  (597.23)

Ausbeute: 362 mg (606  $\mu\text{mol}$ , 48 %)

gelblicher amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +79^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 618.0$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 633.9  $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.78$ -5.65 (m, 2 H, H-2, H-6), 5.12 (dd, 1 H, H-7), 4.98-4.91 (m, 2 H, H-1a/b), 4.41 (ddd, 1 H, H-4), 4.27 (dd, 1 H, H-9a), 4.21 (vt, 1 H, H-5), 4.11 (dd, 1 H, H-9b), 3.75 (ddd, 1 H, H-8), 2.28-2.24 (m, 2 H, H-3a/b), 2.09, 2.01, 1.86 (3 s, 9 H, 3  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$J_{3a,4} = 4.8$ ,  $J_{3b,4} = 5.6$ ,  $J_{4,5} = 10.2$ ,  $J_{5,6} = 10.2$ ,  $J_{6,7} = 9.2$ ,  $J_{7,8} = 10.2$ ,  $J_{8,9a} = 5.1$ ,  $J_{8,9b} = 2.3$ ,  $^2J_{9a/b} = 12.2$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 171.17$ , 171.12, 169.89 (3 C, 3  $\underline{\text{COCH}_3}$ ), 168.71, 163.15 (2 C,  $\text{N}(\text{CO})_2$ ), 141.20, 140.95 (2 C, Ar), 132.77 (C-2), 130.50, 130.32, 127.51, 127.24 (4 C, Ar), 118.44 (C-1), 76.14 (C-8), 74.41 (C-4), 72.30 (C-6), 69.37 (C-7), 62.75 (C-9), 55.72 (C-5), 37.10 (C-3), 21.20, 21.04, 20.92 (3 C, 3  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### 5-Acetamido-6,7,9-tri-*O*-acetyl-4,8-anhydro-1,2,3,5-tetradesoxy-D-glycero-D-gulo-nona-1-enitol (39)

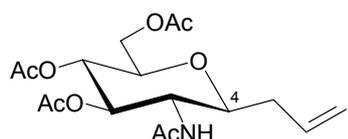
Es werden 258 mg (532  $\mu\text{mol}$ ) **38** in 5.1 ml *iso*-Propanol / Wasser (6:1) suspendiert und mit 82.5 mg (2.18 mmol) Natriumborhydrid versetzt. Nach 6 Stunden wird mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 4 angesäuert und über Nacht weitergerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und dann mehrmals mit Toluol codestilliert. Zu dem Rückstand in 8.1 ml abs. Pyridin werden 4.8 ml Essigsäureanhydrid und eine katalytische Menge Dimethylaminopyridin gegeben. Nach 18 Stunden wird mit 16 ml Wasser hydrolysiert und mit 16 ml Ethylacetat verdünnt. Die organische Phase wird zweimal mit verdünnter Salzsäure gewaschen, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (Petrolether (50-70) / Ethylacetat 2:1, dann 1:2) gereinigt.

$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_8$  (371.39)

Ausbeute: 98.3 mg (265  $\mu\text{mol}$ , 61 %)

weißer Feststoff, Smp.: 182 °C

$[\alpha]_D^{20} = +103^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 394.1$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $410.1$   $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.80$  (m<sub>c</sub>, 1 H, H-2), 5.35 (d, 1 H, NH), 5.08-5.02 (m, 3 H, H-1a/b, H-7), 4.98 (vt, 1 H, H-6), 4.21 (dd, 1 H, H-9a), 4.08 (dd, 1 H, H-9b), 4.04 (dvt, 1 H, H-5), 3.56 (ddd, 1 H, H-8), 3.31 (ddd, 1 H, H-4), 2.38-2.25 (m, 2 H, H-3a/b), 2.05, 2.01, 2.00, 1.92 (4 s, 12 H, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$J_{3a,4} = 3.6$ ,  $J_{3b,4} = 7.6$ ,  $J_{4,5} = 10.2$ ,  $J_{5,\text{NH}} = 9.7$ ,  $J_{5,6} = 9.9$ ,  $J_{6,7} = 9.7$ ,  $J_{7,8} = 9.7$ ,  $J_{8,9a} = 5.1$ ,  $J_{8,9b} = 2.5$ ,  $^2J_{9a/b} = 12.2$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 172.05$ , 171.11, 170.43, 169.69 (4 C, 4  $\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$ ), 134.23 (C-2), 117.68 (C-1), 79.48 (C-4), 76.13 (C-8), 74.91 (C-6), 68.98 (C-7), 62.87 (C-9), 54.19 (C-5), 36.43 (C-3), 23.67, 21.18, 21.12, 21.04 (4 C, 4  $\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ) ppm.

### 5-Acetamido-4,8-anhydro-1,2,3,5-tetradesoxy-D-glycero-D-gulo-nona-1-enitol (40)

Die Entschützung erfolgt gemäß **AAV 2a**:

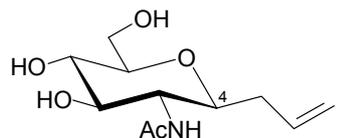
93.4 mg (251  $\mu\text{mol}$ ) **39**, 7 ml Methanol, 0.7 ml Natriummethanolat-Lösung, 24 Stunden.  
Laufmittel: Dichlormethan / Methanol 6:1

$C_{11}H_{19}NO_5$  (245.28)

Ausbeute: 53.4 mg (218  $\mu$ mol, 87 %)

weißer Feststoff, Smp.: 186 °C

$[\alpha]_D^{20} = +9^\circ$  (c 0.05, DMSO)



$^1H$ -NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta = 7.62$  (d, 1 H, NH), 5.82 (dddd, 1 H, H-2), 5.00 (dd, 1 H, H-1<sub>cis</sub>), 4.96 (dd, 1 H, H-1<sub>trans</sub>), 4.92, 4.80, 4.37 (3 bs, 3 H, 3 OH), 3.64 (dd, 1 H, H-9a), 3.43-3.36 (m, 2 H, H-5, H-9b), 3.22 (vt, 1 H, H-6), 3.15 (ddd, 1 H, H-4), 3.06-3.04 (m, 2 H, H-7, H-8), 2.18 (ddd, 1 H, H-3a), 2.03 (ddd, 1 H, H-3b), 1.82 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>) ppm.

$^2J_{1cis/trans} = 1.9$ ,  $J_{1cis,2} = 17.3$ ,  $J_{1trans,2} = 10.1$ ,  $J_{2,3a} = 7.3$ ,  $J_{2,3b} = 6.3$ ,  $^2J_{3a/b} = 14.8$ ,  $J_{3a,4} = 2.8$ ,  $J_{3b,4} = 7.9$ ,  $J_{4,5} = 10.4$ ,  $J_{5,6} = 9.2$ ,  $J_{6,7} = 9.8$ ,  $J_{8,9a} = 0.9$ ,  $J_{8,9b} = 5.7$ ,  $^2J_{9a/b} = 12.0$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz, DMSO):  $\delta = 169.61$  (COCH<sub>3</sub>), 136.04 (C-2), 116.49 (C-1), 81.10 (C-8), 78.35 (C-4), 75.80 (C-6), 71.43 (C-7), 61.74 (C-9), 55.33 (C-5), 36.55 (C-3), 23.67 (COCH<sub>3</sub>) ppm.

## 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-1,5-anhydro-2-desoxy-D-galactitol (41)

Die Reaktion wird unter strengen Schlenck-Bedingungen durchgeführt, Toluol wird frisch vor der Umsetzung absolutiert, unter Schutzgas in die ausgeheizte Apparatur überführt und mit Argon gründlich entgast.

Eine Lösung von 1.25 g (3.42 mmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosylchlorid<sup>223</sup> in 35 ml trockenem Toluol wird 10 Minuten entgast, mit 1.1 ml (4.1 mmol, 1.2 eq.) Tributylzinnhydrid und 129 mg (786  $\mu$ mol, 0.2 eq.) AIBN versetzt und für weitere 30 Minuten entgast. Anschließend wird die Reaktion 3¼ Stunden unter einer Argonatmosphäre auf 100 °C erhitzt. Das Toluol wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Acetonitril aufgenommen und die Lösung mehrmals mit Hexan gewaschen. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und über Natriumsulfat getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat von 3:1 über 1:1 bis 1:3) ergibt 303 mg (915  $\mu$ mol, 27 %) **41** und 583 mg (1.77 mmol, 52 %) 4,5-Dihydro-2-methyl-(3,4,6-tri-O-acetyl-1,2-didesoxy- $\alpha$ -D-galactopyranoso)-[2,1-d]-1,3-oxazolin (**34**).

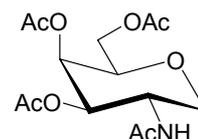
$C_{14}H_{21}NO_8$  (331.32)

weißer Feststoff, Smp.: 164 °C

$[\alpha]_D^{20} = +6^\circ$  (c 0.6, CHCl<sub>3</sub>)

Ber.: C 50.75 H 6.39 N 4.23

Gef.: C 51.08 H 6.53 N 3.89



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 354.3$  [M+Na]<sup>+</sup>, 370.2 [M+K]<sup>+</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.55$  (d, 1 H, NH), 5.35 (dd, 1 H, H-4), 4.92 (dd, 1 H, H-3), 4.39 (dddd, 1 H, H-2), 4.19 (dd, 1 H, H-1<sub>eq</sub>), 4.09 (dd, 1 H, H-6a), 4.03 (dd, 1 H, H-6b), 3.75 (ddd, 1 H, H-5), 3.13 (vt, 1 H, H-1<sub>ax</sub>), 2.13, 2.03, 2.01, 1.92 (4 s, 12 H, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^2\text{J}_{1\text{ax}/\text{eq}} = 11.2$ ,  $\text{J}_{1\text{ax},2} = 10.7$ ,  $\text{J}_{1\text{eq},2} = 5.1$ ,  $\text{J}_{2,\text{NH}} = 7.6$ ,  $\text{J}_{2,3} = 11.2$ ,  $\text{J}_{3,4} = 3.3$ ,  $\text{J}_{4,5} = 0.8$ ,  $\text{J}_{5,6\text{a}} = 6.1$ ,  $\text{J}_{5,6\text{b}} = 6.6$ ,  $^2\text{J}_{6\text{a}/\text{b}} = 11.4$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 171.87$ , 170.93, 170.70, 170.68 (4 C, 4  $\text{C}=\text{O}$ ), 75.51 (C-5), 72.04 (C-3), 69.06 (C-1), 67.60 (C-4), 62.61 (C-6), 47.09 (C-2), 23.68, 21.22, 21.13, 21.09 (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

## 2-Acetamido-1,5-anhydro-2-desoxy-D-galactitol (42)

### a) Durch Deacetylierung von 41

Die Entschützung erfolgt gemäß **AAV 2a**:

200 mg (60.4  $\mu\text{mol}$ ) **41**, 4 ml Methanol, 15  $\mu\text{l}$  Natriummethanolat-Lösung, 11 Stunden. Umkristallisiert aus Methanol. Ausbeute: 303 mg (915  $\mu\text{mol}$ , 92 %).

### b) Durch Depivaloylierung eines Gemischs aus 47 und 48

Die Entschützung erfolgt gemäß **AAV 2a**:

1.68 g (4.50 mmol) **47** und **48**, 40 ml Methanol, 40 mg festes Natriummethanolat, 30 Stunden. Umkristallisiert aus Methanol. Ausbeute: 855 mg (4.17 mmol, 93 %).

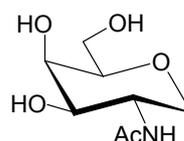
$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_5$  (205.21)

weiße Kristalle, Smp.: 117 °C

$[\alpha]_D^{20} = +49^\circ$  (c 1, MeOH)

Ber.: C 46.82 H 7.37 N 6.83

Gef.: C 45.98 H 7.63 N 6.34



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 4.13$  (ddd, 1 H, H-2), 3.94 (dd, 1 H, H-1<sub>eq</sub>), 3.86 (bd, 1 H, H-4), 3.73 (dd, 1 H, H-6a), 3.66 (dd, 1 H, H-6b), 3.50 (dd, 1 H, H-3), 3.49 (vt, 1 H, H-5), 3.07 (vt, 1 H, H-1<sub>ax</sub>), 1.96 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^2\text{J}_{1\text{ax}/\text{eq}} = 10.9$ ,  $\text{J}_{1\text{ax},2} = 10.7$ ,  $\text{J}_{1\text{eq},2} = 5.3$ ,  $\text{J}_{2,3} = 10.4$ ,  $\text{J}_{3,4} = 3.1$ ,  $\text{J}_{5,6\text{a}} = 6.9$ ,  $\text{J}_{5,6\text{b}} = 5.1$ ,  $^2\text{J}_{6\text{a}/\text{b}} = 11.4$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 172.94$  ( $\text{C}=\text{O}$ ), 80.13 (C-5), 72.78 (C-3), 69.13 (C-4), 68.26 (C-1), 61.90 (C-6), 48.45 (C-2), 21.65 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

**2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-1,5-anhydro-2-desoxy-D-glucitol (44)**

Die Reaktion erfolgt analog der Darstellung von **41**:

9.1 g (25 mmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosylchlorid<sup>228</sup> (**43**), 150 ml abs. Toluol, 7.9 ml (30 mmol, 1.2 eq.) Tributylzinnhydrid und 815 mg (5.0 mmol) AIBN. 90 Minuten unter Rückfluss erhitzen. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat, Gradient von 5:1 bis 1:3).

C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>8</sub> (331.32)

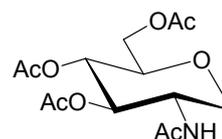
Ausbeute: 6.71 g (20.3 mmol, 81 %)

weißer Schaum, Smp.: 157 °C

$[\alpha]_D^{20} = +4.5^\circ$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>)

Lit.:<sup>227</sup> Smp.: 158-160 °C

$[\alpha]_D^{21} = +4.9^\circ$  (c 1.03, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 354.2 [M+Na]^+$ ,  $370.2 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 5.64$  (d, 1 H, NH),  $5.06$  (dd, 1 H, H-4),  $4.92$  (dd, 1 H, H-3),  $4.21$ - $4.13$  (m, 3 H, H-1<sub>eq</sub>, H-2, H-6a),  $4.10$  (dd, 1 H, H-6b),  $3.52$  (ddd, 1 H, H-5),  $3.13$  (vt, 1 H, H-1<sub>ax</sub>),  $2.08$ ,  $2.05$ ,  $2.03$ ,  $1.92$  (4 s, 12 H, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>1ax/eq</sub> = 12.7, J<sub>1ax,2</sub> = 12.2, J<sub>2,NH</sub> = 7.1, J<sub>2,3</sub> = 10.2, J<sub>3,4</sub> = 9.2, J<sub>4,5</sub> = 9.7, J<sub>5,6a</sub> = 5.1, J<sub>5,6b</sub> = 2.5, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 12.2 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 169.74$ ,  $169.14$ ,  $168.74$ ,  $168.28$  (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>),  $75.60$  (C-5),  $73.21$  (C-3),  $67.24$  (C-1),  $67.03$  (C-4),  $61.32$  (C-6),  $49.61$  (C-2),  $22.20$ ,  $19.78$ ,  $19.75$ ,  $19.61$  (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

**2-Acetamido-1,5-anhydro-2-desoxy-D-glucitol (45)**

Die Entschützung erfolgt gemäß **AAV 2a**:

6.1 g (18 mmol) **44**, 50 ml Methanol, 3.6 ml Natriummethanolat-Lösung, 60 Minuten. Umkristallisiert aus Methanol.

C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub> (205.21)

Ausbeute: 3.38 g (16.5 mmol, 89 %)

weiße Kristalle, Smp.: 205 °C (Zers.)

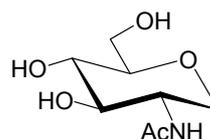
$[\alpha]_D^{20} = +24^\circ$  (c 1, MeOH)

Lit.:<sup>227</sup> Smp.: 206.3 °C

$[\alpha]_D^{21} = +10.3^\circ$  (c 0.58, H<sub>2</sub>O)

Ber.: C 46.82 H 7.37 N 6.83

Gef.: C 46.93 H 6.79 N 7.10



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 3.81$  (dd, 1 H, H-1<sub>eq</sub>), 3.76-3.68 (m, 2 H, H-2, H-6a), 3.53 (dd, 1 H, H-6b), 3.28 (dd, 1 H, H-3), 3.18 (dd, 1 H, H-4), 3.07 (ddd, 1 H, H-5), 3.01 (vt, 1 H, H-1<sub>ax</sub>), 1.86 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>) ppm.

$^2\text{J}_{1\text{ax}/\text{eq}} = 11.2$ ,  $\text{J}_{1\text{ax},2} = 10.2$ ,  $\text{J}_{1\text{eq},2} = 5.1$ ,  $\text{J}_{2,3} = 11.1$ ,  $\text{J}_{3,4} = 9.8$ ,  $\text{J}_{4,5} = 9.2$ ,  $\text{J}_{5,6\text{a}} = 2.0$ ,  $\text{J}_{5,6\text{b}} = 6.1$ ,  $^2\text{J}_{6\text{a}/\text{b}} = 11.2$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 172.66$  (COCH<sub>3</sub>), 81.48 (C-5), 75.81 (C-3), 71.34 (C-4), 67.90 (C-1), 61.99 (C-6), 51.96 (C-2), 21.54 (COCH<sub>3</sub>) ppm.

### 2-Acetamido-1,5-anhydro-2-desoxy-3,6-di-O-pivaloyl-D-glucitol (46)

Die Acylierung erfolgt entsprechend der Synthese von **12**:

1.60 g (7.80 mmol) **45**, 8 ml abs. Dichlormethan, 16 ml abs. Pyridin, 2.88 ml (23.4 mmol, 3.0 eq.) Pivalinsäurechlorid, 5½ Stunden bei 0 °C. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:1.

C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>7</sub> (373.45)

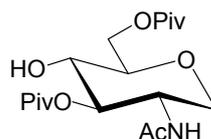
Ausbeute: 2.38 g (6.37 mmol, 82 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -24^\circ$  (c 0.6, CHCl<sub>3</sub>)

Ber.: C 57.89 H 8.37 N 3.75

Gef.: C 57.96 H 8.40 N 3.79



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 396.3$  [M+Na]<sup>+</sup>, 412.3 [M+K]<sup>+</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 5.89$  (d, 1 H, NH), 4.84 (dd, 1 H, H-3), 4.44 (dd, 1 H, H-6a), 4.26 (dd, 1 H, H-6b), 4.11 (dddd, 1 H, H-2), 4.06 (dd, 1 H, H-1<sub>eq</sub>), 3.46 (vt, 1 H, H-4), 3.36 (ddd, 1 H, H-5), 3.12 (vt, 1 H, H-1<sub>ax</sub>), 2.89 (bs, 1 H, OH-4), 1.89 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 1.21, 1.19 (2 s, 18 H, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

$^2\text{J}_{1\text{ax}/\text{eq}} = 10.7$ ,  $\text{J}_{1\text{ax},2} = 10.5$ ,  $\text{J}_{1\text{eq},2} = 5.3$ ,  $\text{J}_{2,\text{NH}} = 7.9$ ,  $\text{J}_{2,3} = 10.2$ ,  $\text{J}_{3,4} = 8.9$ ,  $\text{J}_{4,5} = 9.7$ ,  $\text{J}_{5,6\text{a}} = 3.8$ ,  $\text{J}_{5,6\text{b}} = 2.3$ ,  $^2\text{J}_{6\text{a}/\text{b}} = 12.2$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 180.76$ , 179.98 (2 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 170.70 (COCH<sub>3</sub>), 79.40 (C-5), 76.62 (C-3), 69.15 (C-4), 68.73 (C-1), 63.60 (C-6), 50.57 (C-2), 39.48, 39.42 (2 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.61, 27.45 (6 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23.44 (COCH<sub>3</sub>) ppm.

## 2-Acetamido-1,5-anhydro-2-desoxy-4,6-di-*O*-pivaloyl-D-galactitol (**47**) und 2-Acetamido-1,5-anhydro-2-desoxy-3,4-di-*O*-pivaloyl-D-galactitol (**48**)

Die Umsetzung erfolgt in Analogie zur Darstellung von **14** und **15**:

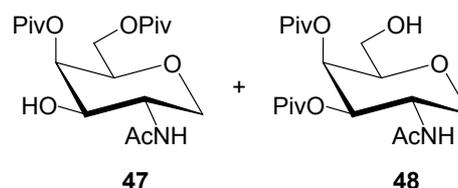
2.09 g (5.60 mmol) **46**, 45 ml abs. Dichlormethan, 2.4 ml abs. Pyridin, 1.2 ml (7.1 mmol, 1.3 eq.) Trifluormethansulfonsäureanhydrid, bei 0 °C 9 Stunden Reaktionszeit. 6.0 ml Wasser, weitere 42 Stunden Reaktionszeit. Toluol / Aceton 5:2.

C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>7</sub> (373.45)

Ausbeute: 1.81 g (4.85 mmol, 87 %)

amorpher Feststoff

**47** / **48** ≈ 9:1 (nach <sup>1</sup>H-NMR)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 396.3 [M+Na]^+$ ,  $412.2 [M+K]^+$

Die NMR-Spektren werden zur besseren Übersichtlichkeit getrennt aufgeführt.

### 2-Acetamido-1,5-anhydro-2-desoxy-4,6-di-*O*-pivaloyl-D-galactitol (**47**)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 6.05$  (d, 1 H, NH),  $5.26$  (bd, 1 H, H-4),  $4.15$  (dd, 1 H, H-1<sub>eq</sub>),  $4.11$ - $4.05$  (m, 2 H, H-2, H-6a),  $4.00$  (dd, 1 H, H-6b),  $3.80$ - $3.73$  (m, 2 H, H-3, H-5),  $3.19$  (m<sub>c</sub>, 1 H, H-1<sub>ax</sub>),  $2.00$  (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>),  $1.24$ ,  $1.16$  (2 s, 18 H, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>1ax/eq</sub> = 10.7, J<sub>1ax,2</sub> = 10.7, J<sub>1eq,2</sub> = 5.1, J<sub>2,NH</sub> = 5.1, J<sub>3,4</sub> = 2.3, J<sub>5,6b</sub> = 6.4, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 11.2 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 179.07$ ,  $178.49$  (2 C, 2 CO<sub>C</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $172.86$  (COCH<sub>3</sub>),  $75.59$  (C-5),  $73.01$  (C-3),  $69.60$  (C-4),  $68.40$  (C-1),  $62.50$  (C-6),  $49.95$  (C-2),  $39.71$ ,  $39.14$  (2 C, 2 CO<sub>C</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $27.62$ ,  $27.50$  (6 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $23.44$  (COCH<sub>3</sub>) ppm.

### 2-Acetamido-1,5-anhydro-2-desoxy-3,4-di-*O*-pivaloyl-D-galactitol (**48**)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 5.69$  (d, 1 H, NH),  $5.29$  (dd, 1 H, H-4),  $4.96$  (dd, 1 H, H-3),  $4.17$  (m<sub>c</sub>, 1 H, H-1<sub>eq</sub>),  $4.11$ - $4.05$  (m, 2 H, H-2, H-5),  $3.61$  (dd, 1 H, H-6a),  $3.39$  (dd, 1 H, H-6b),  $3.19$  (m<sub>c</sub>, 1 H, H-1<sub>ax</sub>),  $1.89$  (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>),  $1.26$ ,  $1.13$  (2 s, 18 H, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

J<sub>2,NH</sub> = 7.9, J<sub>2,3</sub> = 11.2, J<sub>3,4</sub> = 3.3, J<sub>5,6a</sub> = 3.8, J<sub>5,6b</sub> = 2.3, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 12.2 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 179.07$ ,  $178.49$  (2 C, 2 CO<sub>C</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $172.86$  (COCH<sub>3</sub>),  $78.65$  (C-3),  $72.29$  (C-4),  $69.19$  (C-1),  $68.11$  (C-5),  $61.40$  (C-6),  $47.65$  (C-2),  $39.71$ ,  $39.14$  (2 C, 2 CO<sub>C</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $27.67$ ,  $27.40$  (6 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $23.56$  (COCH<sub>3</sub>) ppm.

### Methyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-*lyxo*-hexopyranosid (**49**) und Methyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-*lyxo*-hexopyranosid (**50**)

#### a) Mittels der NBS-Methode

1.96 g (7.2 mmol) Tri-*O*-acetyl-D-galactal<sup>370</sup> (**2**) werden in 15 ml wasserfreiem Acetonitril gelöst und im Eisbad mit 450  $\mu$ l (11 mmol, 1.5 eq.) Methanol und 1.54 g (8.7 mmol) *N*-Bromsuccinimid (NBS) versetzt. Es wird eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 3:1) gereinigt. Das Rohprodukt aus  $\alpha$ -*talo* und  $\beta$ -*galacto*-konfigurierten 2-Bromo-Glycosid wird als Gemisch für die Dehalogenierung eingesetzt, indem es in 40 ml abs. Toluol unter einer Argonatmosphäre gelöst wird und mit 2.3 ml (8.7 mmol) Tributylzinnhydrid und 70 mg (0.4 mmol) AIBN 2 Stunden bei 85 °C gerührt wird. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Acetonitril aufgenommen und die Lösung mehrmals mit Hexan gewaschen. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und über Natriumsulfat getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 5:2) ergibt 929 mg (3.05 mmol, 42 %) **49** und 231 mg (759  $\mu$ mol, 11 %) **50**.

#### b) Mittels der NIS-Methode

Die Durchführung erfolgt analog der unter a) beschriebenen NBS-Methode unter Verwendung von 2.47 g (11 mmol) *N*-Iodsuccinimid (NIS) anstelle des NBS. 1.21 g (3.98 mmol, 55 %) **49** und 210 mg (690  $\mu$ mol, 9.6 %) **50** können erhalten werden.

#### c) Nach Sabesan

Zu einer Lösung von 2.7 g (10 mmol) Tri-*O*-acetyl-D-galactal<sup>370</sup> (**2**) in 35 ml trockenem Acetonitril über 2.5 g Molekularsieb 3 Å werden 3.5 g wasserfreies Lithiumbromid, 7 ml absolutes Methanol und 4 g Dowex 50W-X8 (H<sup>+</sup>) Ionenaustauscher gegeben. Die Lösung wird 21 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend filtriert und mit Triethylamin neutralisiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit verdünnter Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Säulenchromatographie (Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 5:2) gibt 1.95 g (6.4 mmol, 65 %) **49** und 635 mg (2.09 mmol, 21 %) **50**.

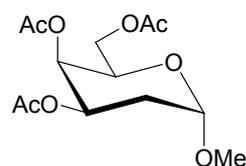
### Methyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-*lyxo*-hexopyranosid (**49**)

C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub> (304.30)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +147^\circ$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>)

Lit.:<sup>371</sup>  $[\alpha]_D^{20} = +132^\circ$  (c 1, DCM)



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.30$  (bd, 1 H, H-4), 5.25 (ddd, 1 H, H-3), 4.88 (bd, 1 H, H-1), 4.12-4.06 (m, 3 H, H-5, H-6a/b), 3.33 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.11 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.06 (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 2.03, 1.96 (2 s, 6 H, 2  $\text{COCH}_3$ ), 1.84 (ddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>) ppm.

$J_{1,2\text{ax}} = 3.6$ ,  $J_{1,2\text{eq}} = 1.0$ ,  $^2J_{2\text{ax},2\text{eq}} = 12.7$ ,  $J_{2\text{ax},3} = 12.2$ ,  $J_{2\text{eq},3} = 5.1$ ,  $J_{3,4} = 3.1$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 169.50$ , 169.30, 168.97 (3 C, 3  $\text{COCH}_3$ ), 97.51 (C-1), 65.69 (C-4), 65.58 (C-5), 65.15 (C-3), 61.51 (C-6), 53.95 ( $\text{OCH}_3$ ), 29.11 (C-2), 19.84, 19.79, 19.70 (3 C, 3  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### Methyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-lyxo-hexopyranosid (50)

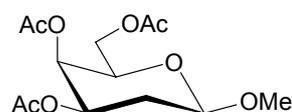
$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_8$  (304.30)

weißer Feststoff, Smp.: 78 °C

$[\alpha]_D^{20} = -2^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )

Lit.:<sup>371</sup> Smp.: 80 °C

$[\alpha]_D^{20} = -9^\circ$  (c 1, DCM)



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.24$  (bd, 1 H, H-4), 4.98 (ddd, 1 H, H-3), 4.46 (dd, 1 H, H-1), 4.18 (dd, 1 H, H-6a), 4.12 (dd, 1 H, H-6b), 3.78 (dt, 1 H, H-5), 3.52 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.12, 2.03, 1.99 (3 s, 9 H, 3  $\text{COCH}_3$ ), 1.98-1.89 (m, 2 H, H-2<sub>ax/2eq</sub>) ppm.

$J_{1,2\text{ax}} = 9.2$ ,  $J_{1,2\text{eq}} = 3.1$ ,  $J_{2\text{ax},3} = 9.2$ ,  $J_{2\text{eq},3} = 5.6$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{5,6a} = 6.6$ ,  $J_{5,6b} = 6.6$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.86$ , 170.73, 170.45 (3 C, 3  $\text{COCH}_3$ ), 101.42 (C-1), 71.34 (C-5), 68.83 (C-3), 65.82 (C-4), 62.18 (C-6), 57.19 ( $\text{OCH}_3$ ), 32.27 (C-2), 21.19, 21.09, 20.84 (3 C, 3  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### Methyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (51)

Die Deacetylierung erfolgt gemäß AAV 2a:

1.7 g (5.59 mmol) **49**, 70 ml Methanol, 0.5 ml Natriummethanolat-Lösung, 5 Stunden.

$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_5$  (178.18)

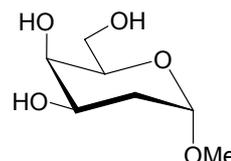
Ausbeute: 974 mg (5.47 mmol, 98 %)

weißes Pulver, Smp.: 117 °C

$[\alpha]_D^{20} = +174^\circ$  (c 1, MeOH)

Lit.:<sup>371</sup> Smp.: 115 °C

$[\alpha]_D^{20} = +171^\circ$  (c 1, MeOH)



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 4.98$  (bd, 1 H, H-1), 4.04 (ddd, 1 H, H-3), 3.90-3.85 (m, 2 H, H-4, H-5), 3.80-3.76 (m, 2 H, H-6a/b), 3.40 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 1.97 (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 1.90 (ddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>) ppm.

$J_{1,2\text{ax}} = 3.6$ ,  $J_{1,2\text{eq}} = 1.0$ ,  $^2J_{2\text{ax},2\text{eq}} = 13.7$ ,  $J_{2\text{ax},3} = 11.7$ ,  $J_{2\text{eq},3} = 5.6$ ,  $J_{3,4} = 3.1$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 98.77$  (C-1), 71.26 (C-5), 67.96 (C-4), 65.14 (C-3), 62.09 (C-6), 54.77 ( $\text{OCH}_3$ ), 31.70 (C-2) ppm.

### Methyl-2-desoxy- $\beta$ -D-lyxo-hexopyranosid (52)

Die Entschützung erfolgt gemäß **AAV 2a**:

211 mg (0.69 mmol) **50**, 10 ml Methanol, 0.1 ml Natriummethanolat-Lösung, 5 Stunden.

$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_5$  (178.18)

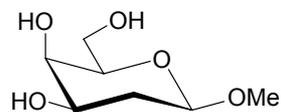
Ausbeute: 123 mg (0.69 mmol, quant.)

weißer Feststoff, Smp.: 123 °C

$[\alpha]_D^{20} = -9^\circ$  (c 1, MeOH)

Lit.:<sup>372</sup> Smp.: 125-126 °C

$[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$  (c 0.5,  $\text{H}_2\text{O}$ )



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 4.38$  (dd, 1 H, H-1), 3.71 (ddd, 1 H, H-3), 3.65-3.57 (m, 3 H, H-4, H-6a/b), 3.50 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.40 (dt, 1 H, H-5), 1.82 (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 1.47 (ddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>) ppm.

$J_{1,2\text{ax}} = 9.7$ ,  $J_{1,2\text{eq}} = 2.0$ ,  $^2J_{2\text{ax},2\text{eq}} = 12.2$ ,  $J_{2\text{ax},3} = 12.2$ ,  $J_{2\text{eq},3} = 5.1$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{4,5} = 1.0$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 101.58$  (C-1), 75.69 (C-5), 68.14 (C-3), 67.18 (C-4), 61.76 (C-6), 56.32 ( $\text{OCH}_3$ ), 33.70 (C-2) ppm.

### Allyl-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (53)

12.9 g (47.5 mmol) Tri-O-acetyl-D-galactal<sup>370</sup> (**2**) werden in 350 ml trockenem Dichlormethan gelöst und mit 0.93 g Triphenylphosphoniumbromid und 15 ml frisch destilliertem Allylkohol versetzt. Die Lösung wird 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und mit Petrolether (50-70) / Ethylacetat 4:1 an Kieselgel gereinigt.

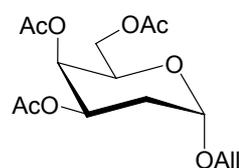
$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_8$  (330.33)

Ausbeute: 13.3 g (40.3 mmol, 85 %)

gelblicher Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +106^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )

Lit.:<sup>373</sup>  $[\alpha]_D^{20} = +126^\circ$



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.87$  (dddd, 1 H, All-2), 5.30-5.22 (m, 3 H, All-3<sub>cis</sub>, H-3, H-4), 5.17 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 5.02 (bd, 1 H, H-1), 4.15-4.09 (m, 2 H, All-1a, H-5), 4.05 (m<sub>c</sub>, 2 H, H-6a/b), 3.94 (dddd, 1 H, All-1b), 2.06 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.02 (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 1.98, 1.91 (2 s, 6 H, 2  $\text{COCH}_3$ ), 1.82 (ddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>) ppm.

$^2\text{J}_{\text{All-1a/b}} = 12.7$ ,  $\text{J}_{\text{All-1a,2}} = 4.8$ ,  $\text{J}_{\text{All-1b,2}} = 6.1$ ,  $\text{J}_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $\text{J}_{\text{All-2,3trans}} = 10.7$ ,  $^2\text{J}_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $\text{J}_{1,2\text{ax}} = 3.1$ ,  $\text{J}_{1,2\text{eq}} = 1.5$ ,  $^2\text{J}_{2\text{ax},2\text{eq}} = 12.7$ ,  $\text{J}_{2\text{ax},3} = 9.2$ ,  $\text{J}_{2\text{eq},3} = 6.1$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 169.48$ , 169.30, 169.00 (3 C, 3  $\text{COCH}_3$ ), 132.71 (All-2), 116.50 (All-3), 95.63 (C-1), 67.18 (All-1), 65.74 (C-5), 65.67 (C-4), 65.19 (C-3), 61.42 (C-6), 29.12 (C-2), 19.85, 19.77, 19.71 (3 C, 3  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### Allyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (54)

Die Deacetylierung erfolgt nach **AAV 2a**:

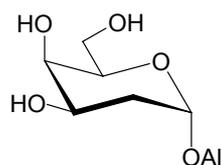
13.3 g (40.3 mmol) **53**, 500 ml Methanol, 8 ml Natriummethanolat-Lösung, 15 Stunden.  
Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 6:1.

$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_5$  (204.22)

Ausbeute: 7.99 g (39.1 mmol, 97 %)

farbloses Öl

$[\alpha]_D^{20} = +134^\circ$  (c 1,  $\text{H}_2\text{O}$ )



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 5.94$  (dddd, 1 H, All-2), 5.28 (dd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.15 (dd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.96 (bd, 1 H, H-1), 4.17 (dd, 1 H, All-1a), 3.99-3.92 (m, 2 H, All-1b, H-3), 3.77 (bd, 1 H, H-4), 3.76-3.70 (m, 2 H, H-5, H-6a), 3.67 (dd, 1 H, H-6b), 1.96 (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 1.77 (ddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>) ppm.

$^2\text{J}_{\text{All-1a/b}} = 13.2$ ,  $\text{J}_{\text{All-1a,2}} = 5.1$ ,  $\text{J}_{\text{All-1b,2}} = 6.1$ ,  $\text{J}_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $\text{J}_{\text{All-2,3trans}} = 10.7$ ,  $^2\text{J}_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $\text{J}_{1,2\text{ax}} = 4.1$ ,  $\text{J}_{1,2\text{eq}} = 1.0$ ,  $^2\text{J}_{2\text{ax},2\text{eq}} = 12.7$ ,  $\text{J}_{2\text{ax},3} = 12.2$ ,  $\text{J}_{2\text{eq},3} = 4.6$ ,  $\text{J}_{3,4} = 3.1$ ,  $\text{J}_{5,6b} = 5.1$ ,  $^2\text{J}_{6a/b} = 10.7$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 134.78$  (All-2), 115.81 (All-3), 97.01 (C-1), 71.45 (C-5), 68.51 (C-4), 67.69 (All-1), 65.57 (C-3), 62.12 (C-6), 32.53 (C-2) ppm.

### 6-O-Acetyl-1,5-anhydro-2-desoxy-D-arabino-hex-1-enitol (6-Acetyl-D-glucal) (63)

500 mg (3.42 mmol) D-Glucal<sup>374</sup> (**61**) werden in 1 ml Wasser aufgenommen und mit 25 ml Vinylacetat versetzt. Nach Zugabe von 1 g gepulvertem Molekularsieb 4 Å und 0.4 g Lipase S-VII aus *Candida rugosa* wird 2¼ Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abfiltriert, im Hochvakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: Chloroform / Methanol 10:1).

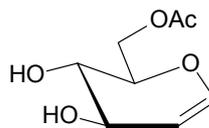
$C_8H_{12}O_5$  (188.18)

Ausbeute: 467 mg (2.48 mmol, 73 %)

gelbliches Öl

$[\alpha]_D^{20} = -31^\circ$  (c 1,  $H_2O$ )

Lit.:<sup>244</sup>  $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$  (c 0.33,  $H_2O$ )



$^1H$ -NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta = 6.35$  (dd, 1 H, H-1), 4.71 (dd, 1 H, H-2), 4.52 (dd, 1 H, H-6a), 4.29 (dd, 1 H, H-6b), 4.25 (ddd, 1 H, H-3), 3.97 (ddd, 1 H, H-5), 3.51 (ddd, 1 H, H-4), 2.12 (s, 3 H,  $COCH_3$ ) ppm.

$J_{1,2} = 6.0$ ,  $^4J_{1,3} = 1.7$ ,  $J_{2,3} = 2.1$ ,  $J_{3,4} = 7.9$ ,  $J_{4,5} = 10.4$ ,  $J_{5,6a} = 4.3$ ,  $J_{5,6b} = 2.4$ ,  $^2J_{6a/b} = 12.2$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 171.53$  ( $\underline{COCH_3}$ ), 144.14 (C-1), 101.97 (C-2), 75.23 (C-5), 69.27 (C-3), 69.17 (C-4), 62.43 (C-6), 21.03 ( $\underline{COCH_3}$ ) ppm.

### 6-O-Acetyl-1,5-anhydro-2-desoxy-D-lyxo-hex-1-enitol (6-Acetyl-D-galactal) (64)

Die Synthese erfolgt ausgehend von D-Galactal<sup>370</sup> (62) analog zum *gluco*-konfigurierten 63. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 3:10.

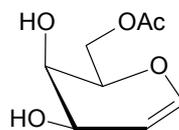
$C_8H_{12}O_5$  (188.18)

Ausbeute: 551 mg (2.93 mmol, 86 %)

farbloser Sirup

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

Lit.:<sup>244</sup>  $[\alpha]_D^{20} = -3^\circ$  (c 3.1,  $CHCl_3$ )



$^1H$ -NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta = 6.26$  (dd, 1 H, H-1), 4.59 (dt, 1 H, H-2), 4.31 (dd, 1 H, H-6a), 4.26 (m, 1 H, H-3), 4.19 (dd, 1 H, H-6b), 4.05 (ddd, 1 H, H-5), 3.80 (ddd, 1 H, H-4), 2.00 (s, 3 H,  $COCH_3$ ) ppm.

$J_{1,2} = 6.1$ ,  $^4J_{1,3} = 2.0$ ,  $J_{2,3} = 2.0$ ,  $^4J_{2,4} = 1.5$ ,  $J_{3,4} = 4.6$ ,  $J_{4,5} = 1.5$ ,  $J_{5,6a} = 8.1$ ,  $J_{5,6b} = 4.6$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.7$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 173.02$  ( $\underline{COCH_3}$ ), 145.17 (C-1), 104.47 (C-2), 76.39 (C-5), 66.97 (C-4), 65.32 (C-3), 65.16 (C-6), 21.10 ( $\underline{COCH_3}$ ) ppm.

### 3,4,6-Tri-O-acetyl-1,5-anhydro-2-desoxy-D-lyxo-hexitol (65)

983 mg (3.61 mmol) Tri-O-acetyl-D-galactal<sup>370</sup> (2) in 50 ml Ethylacetat werden für 15 Minuten im Ultraschallbad entgast, mit 40 mg Palladium auf Aktivkohle (5 %) versetzt und 17 Stunden bei Raumtemperatur unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Lösung wird durch Celite filtriert und das Ethylacetat entfernt.

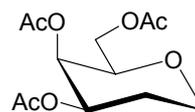
$C_{12}H_{18}O_7$  (274.27)

Ausbeute: 976 mg (3.56 mmol, 99 %)

farbloses Öl

$[\alpha]_D^{20} = +45^\circ$  (c 1,  $CHCl_3$ )

Lit.:<sup>375</sup>  $[\alpha]_D^{30} = +50^\circ$  (c 1,  $CHCl_3$ )



$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 5.28$  (dd, 1 H, H-4), 4.96 (ddd, 1 H, H-3), 4.09 (ddd, 1 H, H-1<sub>eq</sub>), 4.07-4.04 (m, 2 H, H-6a/b), 3.72 (dt, 1 H, H-5), 3.55 (dt, 1 H, H-1<sub>ax</sub>), 2.12 (s, 3 H,  $COCH_3$ ), 2.07 (dddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 2.03, 1.98 (2 s, 6 H, 2  $COCH_3$ ), 1.69 (dddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>) ppm.

$^2J_{1ax/eq} = 12.2$ ,  $J_{1ax,2ax} = 12.2$ ,  $J_{1ax,2eq} = 2.0$ ,  $J_{1eq,2ax} = 5.1$ ,  $J_{1eq,2eq} = 1.5$ ,  $^2J_{2ax/eq} = 12.7$ ,  $J_{2eq,3} = 5.1$ ,  $J_{2ax,3} = 12.2$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 6.6$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 169.59$ , 169.31, 169.14 (3 C, 3  $COCH_3$ ), 73.90 (C-5), 68.63 (C-3), 65.85 (C-4), 64.90 (C-1), 61.75 (C-6), 25.34 (C-2), 19.88, 19.76, 19.73 (3 C, 3  $COCH_3$ ) ppm.

### 1,5-Anhydro-2-desoxy-D-lyxo-hexitol (66)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2a:

938 mg (3.42 mmol) **65**, 20 ml Methanol, 250  $\mu$ l Natriummethanolat-Lösung, 44 Stunden.

$C_6H_{12}O_4$  (148.16)

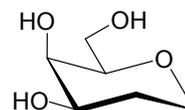
Ausbeute: 507 mg (3.42 mmol, quant.)

weißer Feststoff, Smp.: 122 °C

$[\alpha]_D^{20} = +51^\circ$  (c 1, MeOH)

Lit.:<sup>375</sup> Smp.: 124-125 °C

$[\alpha]_D^{30} = +49^\circ$  (c 0.8,  $H_2O$ )



$^1H$ -NMR (500 MHz, MeOD):  $\delta = 3.98$  (dd, 1 H, H-1<sub>eq</sub>), 3.76-3.66 (m, 3 H, H-3, H-5, H-6a), 3.64 (dd, 1 H, H-6b), 3.46 (vt, 1 H, H-1<sub>ax</sub>), 3.34 (m<sub>c</sub>, 1 H, H-4), 1.93 (dddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 1.61 (dddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>) ppm.

$^2J_{1ax/eq} = 11.7$ ,  $J_{1ax,2ax} = 11.7$ ,  $J_{1eq,2ax} = 5.1$ ,  $^2J_{2ax/eq} = 12.7$ ,  $J_{2ax,3} = 12.2$ ,  $J_{2eq,3} = 4.1$ ,  $J_{5,6b} = 5.1$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 79.77$  (C-4), 69.63 (C-3), 68.67 (C-5), 65.88 (C-1), 62.30 (C-6), 28.93 (C-2) ppm.

### Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3,6-di-O-pivaloyl-4-O-thiocarbonylimidazolyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (67)

2.24 g (5.22 mmol) **12** und 2.20 g (12.3 mmol, 2.4 eq.) 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol (TCDI) werden in 40 ml Tetrahydrofuran 7 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird abgedampft, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit verdünnter Salzsäure ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert und mit Wasser gewaschen. Es wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt.

C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S (539.64)

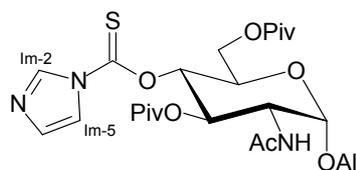
Ausbeute: 2.72 g (5.04 mmol, 97 %)

gelblicher Feststoff, Smp.: 107 °C (Zers.)

$[\alpha]_D^{20} = +64^\circ$  (c 0.55, CHCl<sub>3</sub>)

Ber.: C 55.64 H 6.91 N 7.79 S 5.94

Gef.: C 55.75 H 6.85 N 7.55 S 5.52



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 562.2 [M+Na]^+$ ,  $578.2 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.34$  (bs, 1 H, Im-2),  $7.56$  (bs, 1 H, Im-4),  $7.06$  (bs, 1 H, Im-5),  $5.94$ - $5.86$  (m, 2 H, All-2, H-4),  $5.69$  (d, 1 H, NH),  $5.47$  (dd, 1 H, H-3),  $5.32$  (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.27$  (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $4.90$  (d, 1 H, H-1),  $4.49$  (ddd, 1 H, H-2),  $4.30$  (dd, 1 H, H-6a),  $4.24$  (dddd, 1 H, All-1a),  $4.19$  (ddd, 1 H, H-5),  $4.08$  (dd, 1 H, H-6b),  $4.02$  (dddd, 1 H, All-1b),  $1.92$  (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>),  $1.18$ ,  $0.97$  (2 s, 18 H, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 12.9, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.4, J<sub>All-1b,2</sub> = 6.6, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.0, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.4, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 1.3, J<sub>1,2</sub> = 3.5, J<sub>2,NH</sub> = 9.8, J<sub>2,3</sub> = 10.4, J<sub>3,4</sub> = 9.8, J<sub>4,5</sub> = 10.1, J<sub>5,6a</sub> = 2.5, J<sub>5,6b</sub> = 6.6, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 12.9 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 182.50$  (C<sub>S</sub>Im),  $178.82$ ,  $178.14$  (2 C, 2 C<sub>O</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $169.82$  (C<sub>O</sub>CH<sub>3</sub>),  $136.86$  (Im-2),  $132.92$  (All-2),  $130.33$  (Im-5),  $119.02$  (All-3),  $118.30$  (Im-4),  $96.46$  (C-1),  $77.59$  (C-4),  $70.49$  (C-3),  $68.96$  (All-1),  $67.93$  (C-5),  $62.23$  (C-6),  $51.50$  (C-2),  $38.98$ ,  $38.93$  (2 C, 2 C<sub>O</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $27.31$ ,  $26.90$  (6 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $23.31$  (C<sub>O</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

### Allyl-2-acetamido-2,4-didesoxy-3,6-di-O-pivaloyl- $\alpha$ -D-xyllo-hexopyranosid (68)

#### a) Durch Reduktion eines intermediären Triflats

1.09 g (2.54 mmol) **12** in 10 ml trockenem Dichlormethan und 0.4 ml abs. Pyridin werden bei -25 °C tropfenweise mit 0.69 ml (3.8 mmol) Trifluormethansulfonsäure in 10 ml abs. Dichlormethan versetzt. Nach einer Stunde wird mit Chloroform verdünnt und auf Eiswasser gegossen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Sie wird in 10 ml trockenem Acetonitril aufgenommen und mit 131 mg (3.45 mmol) Natriumborhydrid 12 Stunden

bei Raumtemperatur behandelt. Das Lösungsmittel wird abgedampft, der Rückstand in etwas Wasser aufgenommen und mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum eingengt und säulenchromatographisch mit Petrol-ether (50-70) / Ethylacetat 3:2 gereinigt. Ausbeute: 502 mg (1.21 mmol, 48 %).

### b) Durch Barton-McCombie-Desoxygenierung

Die Reaktion wird in einer ausgeheizten Apparatur unter Schlenck-Bedingungen durchgeführt, alle Lösungsmittel werden mit Argon entgast. 3.30 ml (12.5 mmol, 2.5 eq.) Tributylzinnhydrid werden in 375 ml trockenem Toluol zum Sieden erhitzt. 2.65 g (4.91 mmol) **67** in 90 ml absolutem Toluol werden über einen Zeitraum von 2 Stunden zugegeben. Nach weiteren 15 Stunden unter Rückfluss wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbleibende Rückstand wird dreimal mit jeweils 100 ml heißem Acetonitril extrahiert. Die vereinigten Acetonitrilextrakte werden viermal mit Hexan gewaschen und anschließend zur Trockne eingedampft. Säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 3:2) gibt 1.90 g (4.59 mmol, 94 %) **68**.

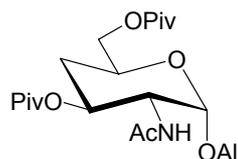
$C_{21}H_{35}NO_7$  (413.51)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +82^\circ$  (c 0.5,  $CHCl_3$ )

Ber.: C 61.00 H 8.53 N 3.39

Gef.: C 60.69 H 8.51 N 3.34



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 436.1 [M+Na]^+$ ,  $452.1 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 5.86$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.63$  (d, 1 H, NH),  $5.26$  (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.19$  (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $5.12$  (ddd, 1 H, H-3),  $4.85$  (d, 1 H, H-1),  $4.21$  (ddd, 1 H, H-2),  $4.16$  (dddd, 1 H, All-1a),  $4.11$ - $4.03$  (m, 3 H, H-5, H-6a/b),  $3.94$  (dddd, 1 H, All-1b),  $1.97$  (ddd, 1 H, H-4<sub>eq</sub>),  $1.91$  (s, 3 H,  $COCH_3$ ),  $1.60$  (ddd, 1 H, H-4<sub>ax</sub>),  $1.20$ ,  $1.13$  (2 s, 18 H, 2  $COC(CH_3)_3$ ) ppm.

$^2J_{All-1a/b} = 12.9$ ,  $J_{All-1a,2} = 5.4$ ,  $J_{All-1b,2} = 6.0$ ,  $J_{All-2,3cis} = 17.0$ ,  $J_{All-2,3trans} = 10.4$ ,  $^2J_{All-3cis/trans} = 1.3$ ,  $J_{1,2} = 3.5$ ,  $J_{2,NH} = 9.8$ ,  $J_{2,3} = 10.4$ ,  $J_{3,4ax} = 11.4$ ,  $J_{3,4eq} = 5.0$ ,  $^2J_{4ax/eq} = 12.3$ ,  $J_{4ax,5} = 11.7$ ,  $J_{4eq,5} = 1.6$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 179.16$ ,  $178.59$  (2 C, 2  $COC(CH_3)_3$ ),  $170.16$  ( $COCH_3$ ),  $133.90$  (All-2),  $118.21$  (All-3),  $97.66$  (C-1),  $68.56$  (C-3),  $68.53$  (All-1),  $66.53$  (C-5),  $66.17$  (C-6),  $52.60$  (C-2),  $39.21$ ,  $39.19$  (2 C, 2  $COC(CH_3)_3$ ),  $33.25$  (C-4),  $27.61$ ,  $27.42$  (6 C, 2  $COC(CH_3)_3$ ),  $23.71$  ( $COCH_3$ ) ppm.

**Allyl-2-acetamido-2,4-dideoxy- $\alpha$ -D-xylo-hexopyranosid (69)**

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 2a**:

1.76 g (4.26 mmol) **68**, 100 ml Methanol, 7.5 ml Natriummethanolat-Lösung, 30 °C, 8 Tage.  
Filtration durch kurze Säule mit Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>).

C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub> (245.28)

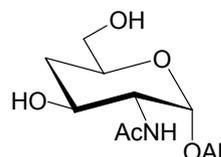
Ausbeute: 989 mg (4.03 mmol, 95 %)

weißes Pulver, Smp.: 153 °C (Zers.)

$[\alpha]_D^{20} = +239^\circ$  (c 0.8, MeOH)

Ber.: C 53.87 H 7.81 N 5.71

Gef.: C 53.77 H 7.55 N 5.82



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta = 5.94$  (dddd, 1 H, All-2), 5.31 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.17 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.87 (d, 1 H, H-1), 4.19 (dddd, 1 H, All-1a), 3.98 (dddd, 1 H, All-1b), 3.92-3.84 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.80 (dd, 1 H, H-2), 3.54 (m<sub>c</sub>, 2 H, H-6a/b), 2.02 (ddd, 1 H, H-4<sub>eq</sub>), 1.99 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 1.44 (ddd, 1 H, H-4<sub>ax</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 13.0, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.1, J<sub>All-1b,2</sub> = 6.1, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.3, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.4, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 1.5, J<sub>1,2</sub> = 3.6, J<sub>2,3</sub> = 10.4, J<sub>3,4ax</sub> = 11.7, J<sub>3,4eq</sub> = 4.8, <sup>2</sup>J<sub>4ax/eq</sub> = 12.2, J<sub>4ax,5</sub> = 11.7, J<sub>4eq,5</sub> = 2.3 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 172.61$  (COCH<sub>3</sub>), 134.56 (All-2), 116.28 (All-3), 97.26 (C-1), 69.12 (C-3), 68.00 (All-1), 65.80 (C-5), 64.67 (C-6), 55.94 (C-2), 36.22 (C-4), 21.52 (COCH<sub>3</sub>) ppm.

**Allyl-2-desoxy-3,6-di-O-pivaloyl- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (70)**

Die Acylierung erfolgt entsprechend der Synthese von **12**:

2.4 g (11.8 mmol) **54**, 12 ml abs. Dichlormethan, 24 ml abs. Pyridin, 4.33 ml (35.4 mmol, 3.0 eq.) Pivalinsäurechlorid, 4 Stunden bei 0 °C. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 4:1.

C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>7</sub> (372.46)

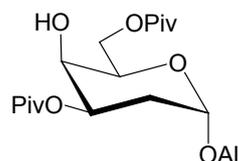
Ausbeute: 3.14 g (8.43 mmol, 72 %)

farbloses Öl

$[\alpha]_D^{20} = +93^\circ$  (c 1.1, CHCl<sub>3</sub>)

Ber.: C 61.27 H 8.66

Gef.: C 59.64 H 8.47



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 5.87$  (dddd, 1 H, All-2), 5.26 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.19 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 5.14 (ddd, 1 H, H-3), 5.01 (bd, 1 H, H-1), 4.28 (dd, 1 H, H-6a), 4.21 (dd, 1 H,

H-6b), 4.44 (dddd, 1 H, All-1a), 4.01 (dt, 1 H, H-5), 3.97-3.91 (m, 2 H, All-1b, H-4), 2.07 (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 1.88 (ddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>), 1.19, 1.18 (2 s, 18 H, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 13.0$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.1$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 6.1$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $J_{1,2ax} = 3.8$ ,  $J_{1,2eq} = 1.0$ ,  $^2J_{2ax,2eq} = 12.7$ ,  $J_{2ax,3} = 12.5$ ,  $J_{2eq,3} = 5.3$ ,  $J_{3,4} = 2.8$ ,  $J_{5,6a} = 5.3$ ,  $J_{5,6b} = 7.1$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.7$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 178.78$ , 177.82 (2 C, 2 CO C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 134.25 (All-2), 117.66 (All-3), 96.82 (C-1), 68.82 (C-3), 68.59 (C-5), 68.23 (All-1), 66.78 (C-4), 64.17 (C-6), 39.24, 39.20 (2 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.75 (C-2), 27.61, 27.45 (6 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

### Allyl-2-desoxy-3,6-di-O-pivaloyl-4-O-thiocarbonylimidazolyl- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (71)

Die Umsetzung erfolgt analog der Darstellung von **67**:

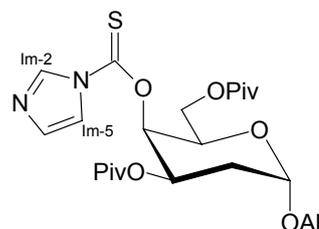
1.86 g (4.99 mmol) **70**, 40 ml abs. THF, 2.2 g (12.3 mmol, 2.5 eq.) TCDI 5 Stunden, Laufmittel: Chloroform / Methanol 500:1.

C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S (482.59)

Ausbeute: 2.14 g (4.43 mmol, 89 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +174^\circ$  (c 0.4, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 505.2$  [M+Na]<sup>+</sup>, 521.2 [M+K]<sup>+</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.33$  (bs, 1 H, Im-2), 7.62 (bs, 1 H, Im-4), 7.04 (bs, 1 H, Im-5), 6.22 (bd, 1 H, H-4), 5.89 (dddd, 1 H, All-2), 5.42 (ddd, 1 H, H-3), 5.30 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.21 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 5.13 (m<sub>c</sub>, 1 H, H-1), 4.33 (vt, 1 H, H-5), 4.18 (dddd, 1 H, All-1a), 4.12 (dd, 1 H, H-6a), 4.06 (dd, 1 H, H-6b), 3.99 (dddd, 1 H, All-1b), 2.08-2.03 (m, 2 H, H-4<sub>ax/eq</sub>), 1.17, 1.03 (2 s, 18 H, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 13.0$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.3$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 6.1$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.0$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.3$ ,  $J_{1,2ax} = 2.3$ ,  $J_{2ax,3} = 10.2$ ,  $J_{2eq,3} = 7.9$ ,  $J_{3,4} = 3.0$ ,  $J_{5,6a} = 7.1$ ,  $J_{5,6b} = 6.1$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.4$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 184.31$  (CSI<sub>m</sub>), 178.32, 177.53 (2 C, 2 CO C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 137.27 (Im-2), 133.87 (All-2), 131.64 (Im-5), 118.37 (Im-4), 118.19 (All-3), 96.78 (C-1), 76.70 (C-4), 68.65 (All-1), 67.57 (C-5), 65.89 (C-3), 62.79 (C-6), 39.11, 39.02 (2 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.50 (C-2), 27.58, 27.35 (6 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

### Allyl-2,4-didesoxy-3,6-di-O-pivaloyl- $\alpha$ -D-threo-hexopyranosid (72)

Die Darstellung erfolgt durch Barton-McCombie-Desoxygenierung analog **68**:

Zu 4.8 ml (18 mmol, 4.4 eq.) Tributylzinnhydrid in 300 ml siedendem Toluol werden 1.98 g (4.10 mmol) **71** in 75 ml Toluol zugetropft. 51 Stunden unter Rückfluss erhitzen. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 20:1.

C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub> (356.46)

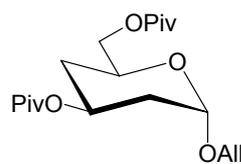
Ausbeute: 1.26 g (3.53 mmol, 86 %)

klarer Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +97^\circ$  (c 2.1, DCM)

Ber.: C 64.02 H 9.05

Gef.: C 63.81 H 8.98



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 379.5 [M+Na]^+$ ,  $395.4 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 5.88$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.26$  (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.20$ - $5.13$  (m, 2 H, All-3<sub>trans</sub>, H-3),  $5.02$  (bd, 1 H, H-1),  $4.14$  (dddd, 1 H, All-1a),  $4.08$ - $4.02$  (m, 3 H, H-5, H-6a/b),  $3.92$  (dddd, 1 H, All-1b),  $2.08$  (dddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>),  $2.01$  (dddd, 1 H, H-4<sub>eq</sub>),  $1.62$  (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>),  $1.33$  (ddd, 1 H, H-4<sub>ax</sub>),  $1.20$ ,  $1.15$  (2 s, 18 H, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 13.0, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.1, J<sub>All-1b,2</sub> = 6.1, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.3, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.4, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 1.5, J<sub>1,2ax</sub> = 3.6, J<sub>1,2eq</sub> = 1.5, <sup>2</sup>J<sub>2ax,2eq</sub> = 12.7, J<sub>2ax,3</sub> = 11.7, J<sub>2eq,3</sub> = 5.1, <sup>4</sup>J<sub>2eq,4eq</sub> = 1.5, J<sub>3,4ax</sub> = 11.4, J<sub>3,4eq</sub> = 4.8, <sup>2</sup>J<sub>4ax/eq</sub> = 12.2, J<sub>4ax,5</sub> = 11.7, J<sub>4eq,5</sub> = 1.3 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 178.62$ ,  $178.11$  (2 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $134.50$  (All-2),  $117.40$  (All-3),  $97.26$  (C-1),  $67.99$  (C-5),  $66.83$  (C-6),  $66.64$  (C-3),  $66.40$  (All-1),  $39.23$ ,  $39.02$  (2 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $35.78$  (C-2),  $33.66$  (C-4),  $27.62$ ,  $27.50$  (6 C, 2 COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

### Allyl-2,4-dideoxy- $\alpha$ -D-threo-hexopyranosid (73)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2a:

803 mg (2.25 mmol) **72**, 25 ml Methanol, 60 mg (1.1 mmol, 0.5 eq.) Natriummethanolat, 40 °C, 12 Tage. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:3.

C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub> (188.22)

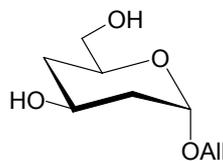
Ausbeute: 380 mg (2.02 mmol, 90 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +153^\circ$  (c 0.9, MeOH)

Ber.: C 57.43 H 8.57

Gef.: C 57.24 H 8.60



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, MeOD):  $\delta = 5.93$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.27$  (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.14$  (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $5.00$  (bd, 1 H, H-1),  $4.16$  (dddd, 1 H, All-1a),  $4.05$  (dddd, 1 H, H-3),  $3.94$  (dddd, 1 H, All-1b),  $3.79$  (m<sub>c</sub>, 1 H, H-5),  $3.53$  (m<sub>c</sub>, 2 H, H-6a/b),  $2.03$  (dddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>),  $1.90$  (dddd, 1 H, H-4<sub>eq</sub>),  $1.46$  (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>),  $1.24$  (ddd, 1 H, H-4<sub>ax</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 13.2, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.1, J<sub>All-1b,2</sub> = 5.9, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.3, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.4, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 1.3, J<sub>1,2ax</sub> = 3.6, J<sub>1,2eq</sub> = 1.5, <sup>2</sup>J<sub>2ax,2eq</sub> = 12.7, J<sub>2ax,3</sub> = 11.4, J<sub>2eq,3</sub> = 4.6, <sup>4</sup>J<sub>2eq,4eq</sub> = 1.7, J<sub>3,4ax</sub> = 11.7, J<sub>3,4eq</sub> = 4.8, <sup>2</sup>J<sub>4ax/eq</sub> = 12.2, J<sub>4ax,5</sub> = 11.7, J<sub>4eq,5</sub> = 2.0 Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta$  = 136.35 (All-2), 117.21 (All-3), 99.01 (C-1), 70.70 (C-5), 69.03 (All-1), 66.60 (C-6), 64.71 (C-3), 40.56 (C-2), 38.28 (C-4) ppm.

### Methyl-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2,4-dideoxy-4-fluoro- $\alpha$ -D-galactopyranosid (76)

Unter Schlenck-Bedingungen werden 1.11 g (2.67 mmol) Methyl-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid<sup>376</sup> in 25 ml trockenem Dichlormethan und 1.1 ml abs. Pyridin gelöst. Bei -35 °C werden 700  $\mu\text{l}$  (4.2 mmol, 1.6 eq.) Trifluormethansulfonsäureanhydrid zugegeben. Nach 3½ Stunden wird mit 50 ml Chloroform verdünnt, auf Eiswasser gegossen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand ohne Aufreinigung in trockenem Acetonitril aufgenommen und mit 8.65 g (16 mmol, 6 eq.) Tetrabutylammonium(triphenylsilyl)difluorosilicat (TBAT) versetzt. Es wird 3 Tage unter Rückfluss erhitzt und dann das Lösungsmittel größtenteils abdestilliert. Es wird mit Ethylacetat verdünnt, die Salze werden abfiltriert und das Filtrat eingengt. Der verbleibende Rückstand wird mehrmals mit Diethylether extrahiert. Der Extrakt wird im Vakuum eingengt und der Rückstand an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:1) gereinigt.

$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{FNO}_5$  (417.48)

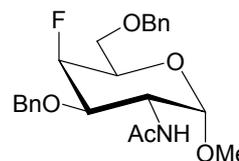
Ausbeute: 411 mg (0.98 mmol, 37 %)

weißer Feststoff, Smp.: 199 °C

$[\alpha]_D^{20} = +128^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )

Lit.:<sup>262</sup> Smp.: 203-204 °C

$[\alpha]_D^{20} = +132$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )



$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.41-7.35 (m, 10 H, Ar), 5.39 (d, 1 H, NH), 4.97 (dd, 1 H, H-4), 4.80-4.72 (m, 2 H, H-1, 1  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.60 (m<sub>c</sub>, 2 H, 2  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.51 (d, 1 H, 1  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 3.89 (dt, 1 H, H-5), 3.74 (m<sub>c</sub>, 1 H, H-2), 3.63-3.67 (m, 2 H, H-6a/b), 3.57 (ddd, 1 H, H-3), 3.32 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 1.93 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$J_{2,\text{NH}} = 9.1$ ,  $J_{2,3} = 11.0$ ,  $J_{3,4} = 2.4$ ,  $J_{3,\text{F}} = 28.0$ ,  $J_{4,\text{F}} = 50.7$ ,  $J_{5,\text{F}} = 29.0$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170.02 ( $\text{COCH}_3$ ), 138.24, 137.31, 128.6-128.0 (12 C, Ar), 99.09 (C-1), 85.61 (d, C-4), 74.21 (d, C-3), 73.90, 70.93 (2 C,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 68.47 (d, C-5), 68.17 (d, C-6), 55.45 ( $\text{OCH}_3$ ), 48.39 (C-2), 23.63 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$J_{3,\text{F}} = 19.1$ ,  $J_{4,\text{F}} = 185.2$ ,  $J_{5,\text{F}} = 18.0$ ,  $J_{6,\text{F}} = 5.9$  Hz.

### Methyl-2-acetamido-2,4-dideoxy-4-fluoro- $\alpha$ -D-galactopyranosid (77)

390 mg (934  $\mu\text{mol}$ ) **76** und 600 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %) in 12 ml Eisessig werden unter Wasserstoffüberdruck gerührt. Nach 4 Tagen wird mit Methanol verdünnt, mit basischen Ionenaustauscher neutralisiert und durch Celite filtriert. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der Rückstand mit Chloroform / Methanol 8:1 an Kieselgel chromatographiert.

$C_9H_{16}FNO_5$  (237.23)

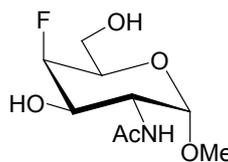
Ausbeute: 161 mg (679  $\mu$ mol, 73 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +168^\circ$  (c 1, MeOH)

Lit.:<sup>262</sup> Smp.: 227-228 °C

$[\alpha]_D^{20} = +173$  (c 1, MeOH)



$^1H$ -NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta = 4.73$  (dd, 1 H, H-4), 4.65 (d, 1 H, H-1), 4.21 (dd, 1 H, H-2), 3.85-3.77 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.69-3.64 (m, 2 H, H-6a/b), 3.33 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 1.95 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>) ppm.

$J_{1,2} = 3.8$ ,  $J_{2,3} = 10.9$ ,  $J_{3,4} = 2.5$ ,  $J_{4,F} = 48.1$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 173.65$  (COCH<sub>3</sub>), 99.97 (C-1), 90.68 (d, C-4), 71.28 (d, C-5), 68.39 (d, C-3), 62.84 (d, C-6), 55.63 (OCH<sub>3</sub>), 52.10 (C-2), 21.82 (COCH<sub>3</sub>) ppm.

$J_{3,F} = 19.2$ ,  $J_{4,F} = 181.1$ ,  $J_{5,F} = 18.4$ ,  $J_{6,F} = 4.9$  Hz.

### Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranosid (78)

2.5 g (9.57 mmol) **1** werden in 100 ml 2,2-Dimethoxypropan gelöst, mit 200 mg Campher-10-sulfonsäure versetzt und 2 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von 0.7 ml Triethylamin wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 80 ml Methanol/Wasser (10:1) aufgenommen und 2 Stunden auf 65 °C erhitzt. Nachdem das Lösungsmittel abgedampft wurde, kann das Produkt säulenchromatographisch (Laufmittel: Petrolether (50-70) / Aceton 3:2, 0.1 % Et<sub>3</sub>N) gereinigt werden. Als Nebenprodukt können 521 mg (1.73 mmol, 18 %) des entsprechenden Allyl-2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranosids<sup>377</sup> erhalten werden.

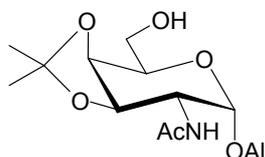
$C_{14}H_{23}NO_6$  (301.34)

Ausbeute: 1.63 g (5.41 mmol, 57 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +159^\circ$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>)

Lit.:<sup>253</sup>  $[\alpha]_D^{20} = +151$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>)



$^1H$ -NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 5.84$  (dddd, 1 H, All-2), 5.62 (d, 1 H, NH), 5.24 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.18 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.82 (d, 1 H, H-1), 4.25 (dt, 1 H, H-2), 4.17-4.11 (m, 2 H, All-1a, H-4), 4.07 (dd, 1 H, H-3), 4.02 (m<sub>c</sub>, 1 H, H-5), 3.97-3.90 (m, 2 H, All-1b, H-6a), 3.81 (ddd, 1 H, H-6b), 2.34 (dd, 1 H, OH-6), 1.99 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 1.54, 1.30 (2 s, 6 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

$J_{\text{All-1a,2}} = 5.3$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 6.1$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.0$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  ${}^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.3$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 9.4$ ,  $J_{2,3} = 9.2$ ,  $J_{3,4} = 5.1$ ,  $J_{5,6b} = 4.3$ ,  $J_{6a/b} = 11.7$ ,  $J_{6a,\text{OH}} = 3.3$ ,  $J_{6b,\text{OH}} = 9.2$  Hz.

${}^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.50$  ( $\text{COCH}_3$ ), 133.82 (All-2), 118.35 (All-3), 110.38 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 97.46 (C-1), 75.09 (C-3), 73.95 (C-4), 68.92 (All-1), 68.19 (C-5), 63.14 (C-6), 50.87 (C-2), 28.38, 27.03 (2 C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 23.85 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-fucopyranosid (79)

Die Darstellung erfolgt durch Reduktion eines intermediären Triflats analog **68**:

912 mg (3.03 mol) **78** in 20 ml abs. Dichlormethan und 0.5 ml abs. Pyridin wird bei  $-25\text{ }^\circ\text{C}$  für 3 Stunden mit 0.85 ml (5.1 mmol, 1.7 eq) Trifluormethansulfonsäureanhydrid behandelt. Der aufgearbeitete Rückstand wird in 25 ml trockenem Acetonitril 24 Stunden mit 200 mg Natriumborhydrid behandelt. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:1.

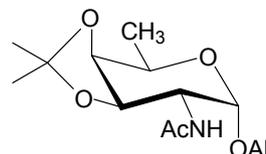
$\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_5$  (285.34)

Ausbeute: 547 mg (1.92 mmol, 63 %)

gelblicher Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +173^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )

Lit.:<sup>253</sup>  $[\alpha]_D^{20} = +187$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )



${}^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta = 5.69$  (dddd, 1 H, All-2), 5.12-5.04 (m, 2 H, All-3<sub>cis</sub>, NH), 4.99 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.78 (d, 1 H, H-1), 4.68 (ddd, 1 H, H-2), 3.96 (dd, 1 H, H-3), 3.93-3.87 (m, 2 H, All-1a, H-5), 3.72 (dd, 1 H, H-4), 3.60 (dddd, 1 H, All-1b), 1.65, 1.26 (2 s, 6 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.49 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.41 (d, 3 H,  $\text{CH}_3$ -6) ppm.

${}^2J_{\text{All-1a/b}} = 13.2$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.3$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 5.8$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.0$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  ${}^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $J_{1,2} = 3.3$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 9.2$ ,  $J_{2,3} = 9.4$ ,  $J_{3,4} = 5.1$ ,  $J_{4,5} = 2.8$ ,  $J_{5,6} = 6.6$  Hz.

${}^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta = 171.35$  ( $\text{COCH}_3$ ), 134.66 (All-2), 117.03 (All-3), 111.14 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 98.13 (C-1), 76.13 (C-4), 75.23 (C-3), 68.50 (All-1), 64.16 (C-5), 50.90 (C-2), 28.66, 27.16 (2 C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 23.12 ( $\text{COCH}_3$ ), 17.10 (C-6) ppm.

### Allyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-fucopyranosid (80)

In 15 ml 80%iger Essigsäure werden 500 mg (1.75 mmol) **79** für 2 Stunden auf  $40\text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt. Die Lösung wird im Vakuum eingedunstet und mehrmals mit Toluol codestilliert. Chromatographische Reinigung an Kieselgel (Laufmittel: Chloroform / Aceton 1:1) gibt **80**.

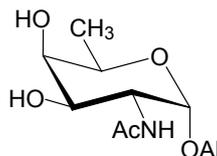
$C_{11}H_{19}NO_5$  (245.28)

Ausbeute: 381 mg (1.55 mmol, 98 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +72^\circ$  (c 1,  $CHCl_3$ )

Lit.:<sup>253</sup>  $[\alpha]_D^{20} = +59$  (c 0.5,  $CHCl_3$ )



$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CHCl_3$ ):  $\delta = 6.02$  (d, 1 H, NH), 5.84 (dddd, 1 H, All-2), 5.33 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.25 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.84 (d, 1 H, H-1), 4.31 (ddd, 1 H, H-2), 4.18 (dddd, 1 H, All-1a), 4.01 (dddd, 1 H, All-1b), 3.95 (q, 1 H, H-5), 3.86 (dd, 1 H, H-3), 3.70 (bd, 1 H, H-4), 1.99 (s, 3 H,  $COCH_3$ ), 1.35 (d, 3 H,  $CH_3$ -6) ppm.

$^2J_{All-1a/b} = 13.4$ ,  $J_{All-1a,2} = 6.1$ ,  $J_{All-1b,2} = 5.2$ ,  $J_{All-2,3cis} = 17.0$ ,  $J_{All-2,3trans} = 10.4$ ,  $^2J_{All-3cis/trans} = 1.3$ ,  $J_{1,2} = 3.8$ ,  $J_{2,NH} = 8.9$ ,  $J_{2,3} = 10.4$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{5,6} = 6.4$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $CHCl_3$ ):  $\delta = 169.78$  ( $\underline{COCH_3}$ ), 133.22 (All-2), 117.72 (All-3), 97.76 (C-1), 69.54 (C-3), 68.32 (C-4), 67.37 (All-1), 65.67 (C-5), 51.08 (C-2), 23.05 ( $CO\underline{CH_3}$ ), 16.96 (C-6) ppm.

### Allyl-2-desoxy-3,4,6-tri-O-methansulfonyl- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (81)

Zu einer Lösung von 730 mg (357 mmol) **54** in 30 ml trockenem Pyridin werden im Eisbad 4.1 ml (53 mmol, 4.9 eq.) Methansulfonsäurechlorid zugetropft. Nach 4 Stunden wird die Reaktionslösung auf Eiswasser gegossen, mit verdünnter Salzsäure angesäuert und mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutral gewaschen, einmal mit Wasser ausgeschüttelt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Es wird mehrmals mit Toluol codestilliert und Lösungsmittelreste im Hochvakuum entfernt.

$C_{12}H_{22}O_{11}S_3$  (438.48)

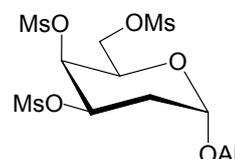
Ausbeute: 1.47 g (3.35 mmol, 94 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +16^\circ$  (c 1,  $CHCl_3$ )

Ber.: C 32.87 H 5.06 S 21.93

Gef.: C 33.10 H 5.03 S 21.85



$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 5.87$  (dddd, 1 H, All-2), 5.29 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.23 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 5.15 (ddd, 1 H, H-3), 5.11 (bd, 1 H, H-4), 5.06 (bd, 1 H, H-1), 4.34 (dd, 1 H, H-6a), 4.29 (dd, 1 H, H-6b), 4.24 (vt, 1 H, H-5), 4.15 (dddd, 1 H, All-1a), 3.98 (dddd, 1 H, All-1b), 3.18, 3.10, 3.06 (3 s, 9 H, 3  $OSO_2CH_3$ ), 2.22 (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 2.12 (ddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 12.7$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.6$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 6.4$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.0$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.3$ ,  $J_{1,2\text{ax}} = 3.6$ ,  $J_{1,2\text{eq}} = 1.3$ ,  $^2J_{2\text{ax},2\text{eq}} = 12.7$ ,  $J_{2\text{ax},3} = 12.0$ ,  $J_{2\text{eq},3} = 5.3$ ,  $J_{3,4} = 2.8$ ,  $J_{5,6\text{a}} = 6.6$ ,  $J_{5,6\text{b}} = 6.1$ ,  $^2J_{6\text{a/b}} = 10.4$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 133.47$  (All-2), 118.86 (All-3), 96.55 (C-1), 75.22 (C-4), 72.63 (C-3), 69.11 (All-1), 67.37 (C-5), 67.32 (C-6), 39.41, 39.14, 38.08 (3 C, 3  $\text{OSO}_2\text{CH}_3$ ), 31.91 (C-2) ppm.

### Allyl-2-desoxy-3,4-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (82)

4.55 ml (37.1 mmol, 1.5 eq.) 2,2-Dimethoxypropan und 135 mg *p*-Toluolsulfonsäure werden zu einer Lösung von 5.0 g (24.5 mmol) **54** in 100 ml trockenem *N,N*-Dimethylformamid gegeben. Nach 4 Stunden Reaktionszeit bei 60 °C wird mit Triethylamin neutralisiert und im Vakuum zur Trockne eingengt. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgt mit Chloroform / Methanol 150:1 an Kieselgel.

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_5$  (244.29)

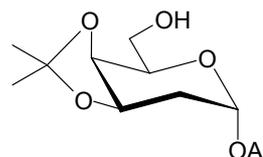
Ausbeute: 3.9 g (16.0 mmol, 65 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$  (c 0.5,  $\text{CHCl}_3$ )

Ber.: C 59.00 H 8.25

Gef.: C 58.84 H 8.20



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta = 5.82$  (dddd, 1 H, All-2), 5.19 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.01 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.95 (d, 1 H, H-1), 4.13 (dddd, 1 H, All-1a), 4.00 (ddd, 1 H, H-3), 3.93 (m<sub>c</sub>, 1 H, H-6a), 3.82 (dddd, 1 H, All-1b), 3.76 (m<sub>c</sub>, 1 H, H-6b), 3.67-3.62 (m, 2 H, H-4, H-5), 2.07 (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 1.55 (ddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>), 1.45, 1.17 (2 s, 6 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 13.2$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.1$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 5.6$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.3$ ,  $J_{1,2\text{ax}} = 5.1$ ,  $J_{1,2\text{eq}} = 6.4$ ,  $^2J_{2\text{ax},2\text{eq}} = 14.8$ ,  $J_{2\text{ax},3} = 6.9$ ,  $J_{2\text{eq},3} = 3.8$ ,  $J_{3,4} = 4.3$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta = 135.61$  (All-2), 116.35 (All-3), 109.21 ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_2$ ), 96.21 (C-1), 73.53 (C-5), 71.05 (C-3), 69.91 (C-4), 68.45 (All-1), 62.98 (C-6), 31.36 (C-2), 27.24, 25.61 (2 C,  $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

### Allyl-2-desoxy-3,4-O-isopropyliden-6-O-thiocarbonylimidazolyl- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (83)

Die Umsetzung erfolgt analog der Darstellung von **67**:

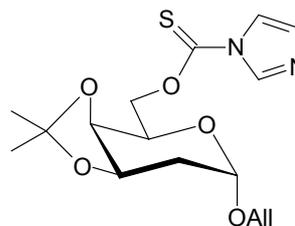
2.01 g (8.23 mmol) **82**, 30 ml abs. THF, 2.85 g (16.0 mmol, 1.9 eq.) TCDI 3 Stunden, Laufmittel: Chloroform / Methanol 250:1.

C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S (354.42)

Ausbeute: 2.18 g (6.15 mmol, 75 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = -130^\circ$  (c 0.27, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 377.1$  [M+Na]<sup>+</sup>,  $393.1$  [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>):  $\delta = 8.33$  (bs, 1 H, Im-2),  $7.46$  (bd, 1 H, Im-4),  $6.94$  (bd, 1 H, Im-5),  $5.76$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.18$  (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.00$  (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $4.87$  (vt, 1 H, H-1),  $4.73$  (dd, 1 H, H-6a),  $4.65$  (dd, 1 H, H-6b),  $4.09$  (dddd, 1 H, All-1a),  $4.01$  (ddd, 1 H, H-3),  $3.79$ - $3.70$  (m, 2 H, All-1b, H-5),  $3.52$  (dd, 1 H, H-4),  $2.08$  (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>),  $1.41$  (ddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>),  $1.45$ ,  $1.16$  (2 s, 6 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 13.5, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.1, J<sub>All-1b,2</sub> = 5.3, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.3, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.4, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 1.5, J<sub>1,2ax</sub> = 5.6, J<sub>1,2eq</sub> = 6.4, <sup>2</sup>J<sub>2ax,2eq</sub> = 15.0, J<sub>2ax,3</sub> = 4.3, J<sub>2eq,3</sub> = 3.6, J<sub>3,4</sub> = 7.4, J<sub>4,5</sub> = 2.0, J<sub>5,6a</sub> = 8.1, J<sub>5,6b</sub> = 3.8, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 11.5, J<sub>Im-4,5</sub> = 1.2 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>):  $\delta = 184.71$  (C=SI<sub>m</sub>),  $136.89$  (Im-2),  $135.07$  (All-2),  $131.76$  (Im-5),  $118.60$  (Im-4),  $116.48$  (All-3),  $109.75$  (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>),  $95.85$  (C-1),  $73.08$  (C-4),  $72.68$  (C-6),  $71.03$  (C-3),  $68.35$  (All-1),  $67.00$  (C-5),  $30.64$  (C-2),  $26.97$ ,  $25.48$  (2 C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

#### Allyl-2,6-dideoxy-3,4-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (**84**)

Die Darstellung erfolgt durch Barton-McCombie-Desoxygenierung analog **68**:

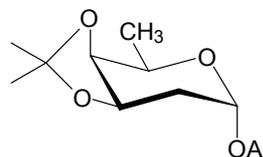
Zu 1.7 ml (6.4 mmol, 3.0 eq.) Tributylzinnhydrid in 200 ml siedendem Toluol werden 769 mg (2.17 mmol) **83** in 50 ml Toluol zugetropft. 2 Tage unter Rückfluss erhitzen. Laufmittel: Chloroform / Methanol 500:1. Es können 143 mg (585  $\mu$ mol, 27 %) **82** zurückgewonnen werden.

C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub> (228.29)

Ausbeute: 284 mg (1.24 mmol, 57 %)

farbloses Öl

$[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$  (c 0.15, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>)



FAB-MS (*m*-Nitrobenzylalkohol):  $m/z = 229$  [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>):  $\delta = 5.84$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.22$  (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.02$  (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $4.97$  (dd, 1 H, H-1),  $4.21$  (dddd, 1 H, All-1a),  $4.12$  (ddd, 1 H, H-3),  $3.86$  (dddd, 1 H, All-1b),  $3.66$  (dq, 1 H, H-5),  $3.51$  (dd, 1 H, H-4),  $2.12$  (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>),  $1.60$  (ddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>),  $1.31$  (d, 3 H, CH<sub>3</sub>-6),  $1.53$ ,  $1.25$  (2 s, 6 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 13.2$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 4.8$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 5.6$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $J_{1,2ax} = 5.1$ ,  $J_{1,2eq} = 6.4$ ,  $^2J_{2ax,2eq} = 14.8$ ,  $J_{2ax,3} = 4.6$ ,  $J_{2eq,3} = 3.8$ ,  $J_{3,4} = 7.1$ ,  $J_{4,5} = 2.0$ ,  $J_{5,6} = 6.6$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta = 135.77$  (All-2), 116.12 (All-3), 96.24 (C-1), 75.75 (C-4), 71.27 (C-3), 68.28 (All-1), 65.14 (C-5), 31.20 (C-2), 27.42, 25.82 (2 C,  $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$ ), 16.74 (C-6) ppm.

### Allyl-2,6-dideoxy- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (**85**)

#### a) Aus **84** mit 80%iger Essigsäure

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von **80**:

a) 110 mg (482  $\mu\text{mol}$ ) **84**, 5 ml 80%ige Essigsäure, 40 °C, 2 Stunden erhitzen. Laufmittel: Chloroform / Aceton 3:1. Ausbeute: 10.7 mg (57  $\mu\text{mol}$ , 12 %) **85** und 54.7 mg (369  $\mu\text{mol}$ , 77 %) 2-Desoxy-D-fucose (**86**).

#### b) Aus **84** mit 40%iger Essigsäure

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von **80**:

a) 110 mg (482  $\mu\text{mol}$ ) **84**, 5 ml 40%ige Essigsäure, 6 Stunden bei Raumtemperatur. Laufmittel: Chloroform / Aceton 3:1. Ausbeute: 62.2 mg (330  $\mu\text{mol}$ , 69 %) **85** und 3.8 mg (26  $\mu\text{mol}$ , 5 %) 2-Desoxy-D-fucose (**86**).

#### c) Durch Reduktion von **87**

100 mg (279  $\mu\text{mol}$ ) **87** in 3 ml trockenem Acetonitril werden für 24 Stunden mit 48 mg (1.3 mmol) Natriumborhydrid bei 40 °C behandelt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in etwas Wasser aufgenommen und mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 2:5) können 19.0 mg (101  $\mu\text{mol}$ , 36 %) **85** erhalten werden.

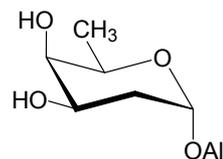
$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$  (188.22)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +87^\circ$  (c 0.5, MeOH)

Ber.: C 57.43 H 8.57

Gef.: C 57.24 H 8.60



FAB-MS (*m*-Nitrobenzylalkohol):  $m/z = 189$   $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 5.92$  (dddd, 1 H, All-2), 5.27 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.14 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.89 (bd, 1 H, H-1), 4.10 (dd, 1 H, All-1a), 3.99-3.91 (m, 2 H, All-1b, H-3), 3.87

(dq, 1 H, H-5), 3.54 (dd, 1 H, H-4), 1.90 (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 1.75 (ddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>), 1.21 (d, 3 H, CH<sub>3</sub>-6) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 13.2$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.1$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 5.8$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.7$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $J_{1,2ax} = 3.8$ ,  $J_{1,2eq} = 1.0$ ,  $^2J_{2ax,2eq} = 12.7$ ,  $J_{2ax,3} = 12.2$ ,  $J_{2eq,3} = 5.1$ ,  $J_{3,4} = 2.8$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{5,6} = 6.6$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 136.32$  (All-2), 117.24 (All-3), 98.72 (C-1), 72.67 (C-4), 69.27 (All-1), 68.04 (C-5), 67.30 (C-3), 33.67 (C-2), 17.60 (C-6) ppm.

### Allyl-2-desoxy-6-*O-p*-toluolsulfonyl- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (87) und Allyl-2-desoxy-3,6-di-*O-p*-toluolsulfonyl- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (88)

Zu einer Lösung von 3.0 g (14.7 mmol) **54** in 90 ml trockenem Pyridin wird unter Eiskühlung eine Lösung von 3.1 g (16.3 mmol, 1.1 eq.) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in 9 ml Pyridin zuge-  
tropft. Nach 2 Tagen bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Zugabe von 250 ml Wasser  
abgebrochen und dreimal mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen  
Phasen werden mit verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat ge-  
trocknet und bis zur Trockne eingedampft. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch mit  
Petrolether / Ethylacetat 1:3.

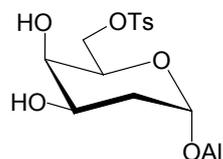
#### Allyl-2-desoxy-6-*O-p*-toluolsulfonyl- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (87)

C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>S (358.41)

Ausbeute: 2.01 g (5.61 mmol, 38 %)

weißer Feststoff, Smp.: 58 °C (Zers.)

$[\alpha]_D^{20} = +139^\circ$  (c 0.2, Aceton)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 381.1$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 397.1  $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta = 7.84$ -7.80 (m, 2 H, Ar-2/6), 7.50-7.46 (m, 2 H, Ar-3/5), 5.90 (dddd, 1 H, All-2), 5.24 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.11 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.86 (bd, 1 H, H-1), 4.23-4.19 (m, 2 H, H-6a/b), 4.04 (dd, 1 H, All-1a), 3.97-3.90 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.86 (dddd, 1 H, All-1b), 3.75 (bd, 1 H, H-4), 2.46 (s, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>), 1.87 (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 1.70 (dd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>) ppm.

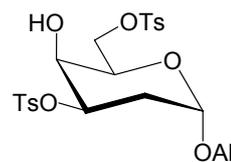
$^2J_{\text{All-1a/b}} = 13.2$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.1$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 5.9$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.7$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $J_{1,2ax} = 3.5$ ,  $^2J_{2ax,2eq} = 12.7$ ,  $J_{2ax,3} = 12.0$ ,  $J_{2eq,3} = 5.1$ ,  $J_{3,4} = 2.4$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta = 146.22$  (Ar-1), 141.95 (Ar-4), 136.11 (All-2), 131.24 (2 C, Ar-3/5), 129.20 (2 C, Ar-2/6), 116.93 (All-3), 98.12 (C-1), 71.96 (C-6), 69.84 (C-5), 69.11 (C-3), 68.67 (C-4), 65.83 (All-1), 33.77 (C-2), 21.91 (Ar-CH<sub>3</sub>) ppm.

Allyl-2-desoxy-3,6-di-*O*-*p*-toluolsulfonyl- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (**88**)C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub> (512.59)

Ausbeute: 732 mg (1.43 mmol, 10 %)

weißer Feststoff, Smp.: 126 °C (Zers.)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +87° (c 0.9, DCM)MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 535.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 551.1 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 7.82-7.78 (m, 4 H, Ar-2/6), 7.50-7.46 (m, 4 H, Ar-3/5), 5.87 (dddd, 1 H, All-2), 5.19 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.12 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.87 (bd, 1 H, H-1), 4.76 (ddd, 1 H, H-3), 4.19 (dd, 1 H, H-6a), 4.15 (dd, 1 H, H-6b), 4.01 (dd, 1 H, All-1a), 3.94-3.89 (m, 2 H, H-4, H-5), 3.85 (dddd, 1 H, All-1b), 2.46 (s, 6 H, 2 Ar-CH<sub>3</sub>), 2.16 (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 1.67 (ddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 13.2, J<sub>All-1a,2</sub> = 4.8, J<sub>All-1b,2</sub> = 5.9, J<sub>All-2,3<sub>cis</sub></sub> = 17.3, J<sub>All-2,3<sub>trans</sub></sub> = 10.7, <sup>2</sup>J<sub>All-3<sub>cis</sub>/trans</sub> = 1.5, J<sub>1,2<sub>ax</sub></sub> = 3.6, J<sub>1,2<sub>eq</sub></sub> = 1.0, <sup>2</sup>J<sub>2<sub>ax</sub>,2<sub>eq</sub></sub> = 12.5, J<sub>2<sub>ax</sub>,3</sub> = 12.2, J<sub>2<sub>eq</sub>,3</sub> = 4.8, <sup>4</sup>J<sub>2<sub>eq</sub>,4</sub> = 1.0, J<sub>3,4</sub> = 3.0, J<sub>5,6a</sub> = 4.6, J<sub>5,6b</sub> = 7.1, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 10.4 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 146.34, 146.31 (2 C, 2 Ar-1), 140.03, 139.98 (2 C, 2 Ar-4), 135.66 (All-2), 131.30, 131.27 (4 C, Ar-3/5), 129.11, 128.91 (4 C, Ar-2/6), 117.19 (All-3), 97.59 (C-1), 77.73 (C-3), 71.09 (C-6), 69.95 (C-5), 68.74 (All-1), 67.04 (C-4), 31.51 (C-2), 21.92, 21.90 (2 C, 2 Ar-CH<sub>3</sub>) ppm.

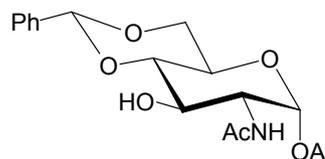
Allyl-2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-dexoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**89**)

9.15 g (35.0 mmol) **8** werden in 300 ml trockenem Acetonitril gelöst und mit 10.5 ml (70.0 mmol, 2 eq.) Benzaldehyddimethylacetal und 500 mg *p*-Toluolsulfonsäurechlorid versetzt. Nach 3¼ Stunden wird die Reaktion durch Zugabe von 4.7 ml Triethylamin beendet und am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel.

C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>6</sub> (349.38)

Ausbeute: 9.66 g (27.6 mmol, 79 %)

weißer Feststoff, Smp.: 235 °C

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +89° (c 1, MeOH)Lit.:<sup>200</sup> Smp.: 234-237 °C[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +99 (c 1, DMF)MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 372.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 388.1 [M+K]<sup>+</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta = 7.92$  (d, 1 H, NH), 7.47-7.44 (m, 2 H, Ar-2/6), 7.39-7.36 (m, 2 H, Ar-3/5), 5.90 (dddd, 1 H, All-2), 5.61 (s, 1 H,  $\underline{\text{CHPh}}$ ), 5.34 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.20-5.14 (m, 2 H, All-3<sub>trans</sub>, OH-3), 4.76 (d, 1 H, H-1), 4.19-4.11 (m, 2 H, All-1a, H-6a), 3.96 (dddd, 1 H, All-1b), 3.84 (ddd, 1 H, H-2), 3.75-3.62 (m, 3 H, H-3, H-5, H-6b), 3.49 (vt, 1 H, H-4), 1.85 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^2\text{J}_{\text{All-1a/b}} = 13.7$ ,  $\text{J}_{\text{All-1a,2}} = 4.8$ ,  $\text{J}_{\text{All-1b,2}} = 5.6$ ,  $\text{J}_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $\text{J}_{\text{All-2,3trans}} = 10.7$ ,  $^2\text{J}_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $\text{J}_{1,2} = 3.6$ ,  $\text{J}_{2,\text{NH}} = 8.1$ ,  $\text{J}_{2,3} = 10.2$ ,  $\text{J}_{3,4} = 9.2$ ,  $\text{J}_{4,5} = 8.9$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, DMSO):  $\delta = 169.83$  ( $\underline{\text{COCH}_3}$ ), 138.12 (Ar-1), 134.81 (All-2), 129.23 (Ar-4), 128.38 (2 C, Ar-3/5), 126.76 (2 C, Ar-2/6), 117.21 (All-3), 101.26 ( $\underline{\text{CHPh}}$ ), 97.25 (C-1), 82.46 (C-4), 68.36 (C-6), 67.95 (All-1), 67.64 (C-3), 63.09 (C-5), 54.55 (C-2), 22.93 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### Allyl-2-acetamido-4,6-O-benzyliden-2-dexoxy-3-O-pivaloyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (90)

Zu einer eingekühlten Lösung von 4.90 g (14.0 mmol) **89** in 60 ml absolutem Pyridin werden 4.3 ml (35 mmol, 2.5 eq.) Pivalinsäurechlorid zugetropft. Der Reaktionsansatz wird 8 Stunden im Eisbad gerührt, bevor die Reaktion durch Zugabe von 1.5 ml Methanol abgebrochen wird. Es wird mit 200 ml Dichlormethan verdünnt und mit verdünnter Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

$\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_7$  (433.50)

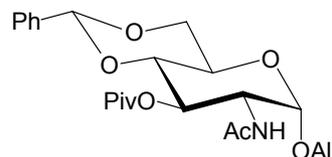
Ausbeute: 5.95 g (13.7 mmol, 98 %)

weißer Feststoff, Smp.: 217 °C

$[\alpha]_D^{20} = +22^\circ$  (c 0.5,  $\text{CHCl}_3$ )

Ber.: C 63.73 H 7.21 N 3.23

Gef.: C 63.39 H 7.17 N 3.37



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 456.2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $472.2$   $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.42$ -7.39 (m, 2 H, Ar-2/6), 7.35-7.30 (m, 2 H, Ar-3/5), 5.86 (dddd, 1 H, All-2), 5.78 (d, 1 H, NH), 5.53 (s, 1 H,  $\underline{\text{CHPh}}$ ), 5.35-5.20 (m, 3 H, All-3<sub>cis/trans</sub>, H-3), 4.84 (d, 1 H, H-1), 4.38 (ddd, 1 H, H-2), 4.28 (dd, 1 H, H-6a), 4.18 (dddd, 1 H, All-1a), 3.97 (dddd, 1 H, All-1b), 3.90 (dt, 1 H, H-5), 3.79-3.71 (m, 2 H, H-4, H-6b), 1.92 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.16 (s, 9 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

$^2\text{J}_{\text{All-1a/b}} = 12.7$ ,  $\text{J}_{\text{All-1a,2}} = 5.3$ ,  $\text{J}_{\text{All-1b,2}} = 6.4$ ,  $\text{J}_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $\text{J}_{\text{All-2,3trans}} = 10.2$ ,  $\text{J}_{1,2} = 3.6$ ,  $\text{J}_{2,\text{NH}} = 9.4$ ,  $\text{J}_{2,3} = 10.4$ ,  $\text{J}_{4,5} = 9.9$ ,  $\text{J}_{5,6a} = 4.8$ ,  $\text{J}_{5,6b} = 9.6$ ,  $^2\text{J}_{6a/b} = 10.2$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 179.29$  ( $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ), 170.21 ( $\text{COCH}_3$ ), 137.49 (Ar-1), 133.64 (All-2), 129.30 (Ar-4), 128.58 (2 C, Ar-3/5), 126.27 (2 C, Ar-2/6), 118.56 (All-3), 101.53 ( $\text{CHPh}$ ), 97.75 (C-1), 79.71 (C-4), 70.19 (C-3), 69.27 (C-6), 69.03 (All-1), 63.51 (C-5), 52.80 (C-2), 39.37 ( $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ), 27.45 (3 C,  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ), 23.58 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3-O-pivaloyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (91)

5.39 g (12.4 mmol) **90** werden in 150 ml 60%iger Essigsäure suspendiert und 90 Minuten auf 60 °C erhitzt. Es wird mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, mehrmals mit Toluol codestilliert und anschließend Lösungsmittelreste im Hochvakuum entfernt.

$\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_7$  (345.39)

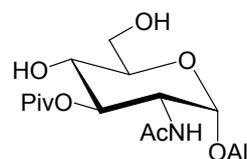
Ausbeute: 4.28 g (12.4 mmol, quant.)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +84^\circ$  (c 0.5, MeOH)

Ber.: C 55.64 H 7.88 N 4.06

Gef.: C 55.61 H 7.68 N 4.17



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 368.2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 384.1  $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, MeOH):  $\delta = 5.99$  (dddd, 1 H, All-2), 5.35 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.21 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 5.15 (dd, 1 H, H-3), 4.80 (d, 1 H, H-1), 4.25 (dddd, 1 H, All-1a), 4.18 (dd, 1 H, H-2), 4.05 (dddd, 1 H, All-1b), 3.83 (d, 1 H, H-6a), 3.74-3.65 (m, 2 H, H-5, H-6b), 3.56 (vt, 1 H, H-4), 1.91 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.18 (s, 9 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 13.0$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.1$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 6.4$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.2$ ,  $^2J_{\text{All-2cis/trans}} = 1.3$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,3} = 10.9$ ,  $J_{3,4} = 9.4$ ,  $J_{4,5} = 9.1$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz, MeOH):  $\delta = 178.88$  ( $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ), 172.11 ( $\text{COCH}_3$ ), 134.23 (All-2), 116.92 (All-3), 96.77 (C-1), 73.39 (C-3), 73.03 (C-5), 68.83 (C-4), 68.25 (All-1), 61.28 (C-6), 52.08 (C-2), 38.80 ( $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.44 (3 C,  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ), 21.41 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3-O-pivaloyl-4,6-di-O-thiocarbonylimidazolyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (92)

Die Umsetzung erfolgt analog der Darstellung von **67**:

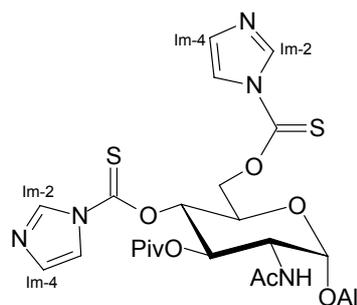
2.94 g (8.51 mmol) **91**, 80 ml abs. THF, 6.07 g (34.1 mmol, 2 eq.) TCDI 14½ Stunden, Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:10.

$C_{24}H_{31}N_5O_7S_2$  (565.66)

Ausbeute: 3.01 g (5.32 mmol, 63 %)

bräunlicher Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +77^\circ$  (c 0.3,  $CHCl_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 588.2 [M+Na]^+$ ,  $604.1 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 8.42, 8.27$  (2 bs, 2 H, 2 Im-2),  $7.63, 7.52$  (2 bs, 2 H, 2 Im-4),  $7.07, 7.03$  (2 bs, 2 H, 2 Im-5),  $5.97$  (vt, 1 H, H-4),  $5.89$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.74$  (d, 1 H, NH),  $5.52$  (dd, 1 H, H-3),  $5.31$  (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.26$  (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $4.94$  (d, 1 H, H-1),  $4.86$  (dd, 1 H, H-6a),  $4.69$  (dd, 1 H, H-6b),  $4.54$  (ddd, 1 H, H-2),  $4.42$  (ddd, 1 H, H-5),  $4.23$  (dddd, 1 H, All-1a),  $4.07$  (dddd, 1 H, All-1b),  $1.93$  (s, 3 H,  $COCH_3$ ),  $0.97$  (s, 9 H,  $C(CH_3)_3$ ) ppm.  
 $^2J_{All-1a/b} = 12.7$ ,  $J_{All-1a,2} = 5.3$ ,  $J_{All-1b,2} = 6.4$ ,  $J_{All-2,3cis} = 17.3$ ,  $J_{All-2,3trans} = 10.4$ ,  $^2J_{All-3cis/trans} = 1.3$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,NH} = 9.9$ ,  $J_{2,3} = 10.7$ ,  $J_{3,4} = 9.7$ ,  $J_{4,5} = 10.1$ ,  $J_{5,6a} = 2.8$ ,  $J_{5,6b} = 4.8$ ,  $^2J_{6a/b} = 12.2$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 183.79, 183.33$  (2 C, 2  $C_{SI}Im$ ),  $179.04$  ( $COC(CH_3)_3$ ),  $170.15$  ( $COC(CH_3)$ ),  $137.45, 137.42$  (2 C, 2 Im-2),  $133.00$  (All-2),  $131.82, 131.36$  (2 C, 2 Im-5),  $119.53$  (All-3),  $118.44, 118.23$  (2 C, 2 Im-4),  $97.09$  (C-1),  $77.76$  (C-4),  $70.63$  (C-6),  $70.38$  (C-3),  $69.77$  (All-1),  $67.60$  (C-5),  $51.81$  (C-2),  $39.28$  ( $COC(CH_3)_3$ ),  $27.14$  (3 C,  $COC(CH_3)_3$ ),  $23.52$  ( $COC(CH_3)$ ) ppm.

### Allyl-2-acetamido-2,4,6-tridesoxy-3-O-pivaloyl- $\alpha$ -D-xylo-hexopyranosid (93)

#### a) Durch Barton-McCombie-Desoxygenierung aus **92** analog der Darstellung von **68**:

Zu 3.4 ml (12.8 mmol, 1.9 eq.) Tributylzinnhydrid und einer Spatelspitze AIBN in 250 ml siedendem Toluol werden 1.89 g (3.34 mmol) **92** in 60 ml Toluol zugetropft. 27 Stunden unter Rückfluss erhitzen. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:5. Ausbeute: 41 mg (131  $\mu$ mol, 4 %).

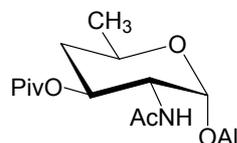
#### b) Durch Reduktion eines intermediären Triflats aus **91** analog der Darstellung von **79**

1.0 g (2.9 mol) **91**, 20 ml abs. Dichlormethan, 0.5 ml abs. Pyridin, 1.7 ml (10.2 mmol, 1.8 eq) Trifluormethansulfonsäureanhydrid,  $-25^\circ C$ , 8 Stunden. Der aufgearbeitete Rückstand wird in 25 ml trockenem Acetonitril 24 Stunden mit 400 mg Natriumborhydrid behandelt. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:5. Ausbeute: 172 mg (549  $\mu$ mol, 19 %).

$C_{16}H_{27}NO_5$  (313.39)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +63^\circ$  (c 0.12,  $CHCl_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 336.2 [M+Na]^+$ ,  $352.2 [M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.91$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.71$  (d, 1 H, NH),  $5.32$  (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.24$  (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $5.13$  (ddd, 1 H, H-3),  $4.97$  (d, 1 H, H-1),  $4.36$  (ddd, 1 H, H-2),  $4.18$  (dddd, 1 H, All-1a),  $3.98$ - $3.89$  (m, 2 H, All-1b, H-5),  $2.09$  (ddd, 1 H, H-4<sub>eq</sub>),  $1.97$  (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ),  $1.68$  (ddd, 1 H, H-4<sub>ax</sub>),  $1.22$  (d, 3-H,  $\text{CH}_3$ -6),  $1.18$  (s, 9 H,  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 13.2$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 4.8$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 5.6$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $J_{1,2} = 3.3$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 9.7$ ,  $J_{2,3} = 10.2$ ,  $J_{3,4\text{ax}} = 10.9$ ,  $J_{3,4\text{eq}} = 4.8$ ,  $^2J_{4\text{ax/eq}} = 12.0$ ,  $J_{4\text{ax,5}} = 10.7$ ,  $J_{4\text{eq,5}} = 1.0$ ,  $J_{5,6} = 6.6$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 179.06$  ( $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ),  $171.21$  ( $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ),  $134.08$  (All-2),  $118.42$  (All-3),  $97.35$  (C-1),  $68.65$  (C-3),  $68.48$  (All-1),  $68.09$  (C-5),  $54.05$  (C-2),  $39.27$  ( $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ),  $34.08$  (C-4),  $27.57$  (3 C,  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ),  $22.69$  ( $\text{COCH}_3$ ),  $18.87$  (C-6) ppm.

### Allyl-2-acetamido-2,4,6-tridesoxy- $\alpha$ -D-xylo-hexopyranosid (94)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2a:

190 mg (606  $\mu\text{mol}$ ) **93**, 15 ml Methanol, 0.5 ml Natriummethanolat-Lösung, 30 °C, 5 Tage.

Filtration durch kurze Säule mit Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ ).

$\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_4$  (229.28)

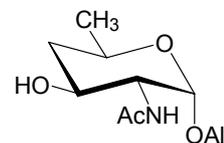
Ausbeute: 121 mg (528  $\mu\text{mol}$ , 87 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +39^\circ$  (c 0.05, MeOH)

Ber.: C 57.63 H 8.35 N 6.11

Gef.: C 56.98 H 8.32 N 5.71



FAB-MS (*m*-Nitrobenzylalkohol):  $m/z = 230 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 5.92$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.29$  (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.18$  (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $4.96$  (d, 1 H, H-1),  $4.22$  (dddd, 1 H, All-1a),  $4.07$  (dddd, 1 H, All-1b),  $3.97$ - $3.85$  (m, 2 H, H-3, H-5),  $3.70$  (dd, 1 H, H-2),  $2.11$  (ddd, 1 H, H-4<sub>eq</sub>),  $2.02$  (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ),  $1.59$  (ddd, 1 H, H-4<sub>ax</sub>),  $1.33$  (d, 3 H,  $\text{CH}_3$ -6) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 12.9$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.1$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 5.9$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.0$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.3$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,3} = 10.2$ ,  $J_{3,4\text{ax}} = 11.2$ ,  $J_{3,4\text{eq}} = 3.8$ ,  $^2J_{4\text{ax/eq}} = 12.0$ ,  $J_{4\text{ax,5}} = 10.7$ ,  $J_{4\text{eq,5}} = 1.8$ ,  $J_{5,6} = 6.4$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 133.78$  (All-2),  $117.82$  (All-3),  $96.94$  (C-1),  $68.84$  (C-3),  $68.13$  (All-1),  $65.68$  (C-5),  $52.65$  (C-2),  $36.02$  (C-4),  $19.88$  ( $\text{COCH}_3$ ),  $16.94$  (C-6) ppm.

**Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3-O-(β-D-galactopyranosyl)-α-D-galactopyranosid (95)****a) β-Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4)**

80 mg (266 μmol) *p*NP-Gal, 695 mg (2.66 mmol, 10 eq.) **1**, 3.0 ml Inkubationspuffer, 25 mg (1.25 U) β-Galactosidase aus Rinderhoden. Ausbeute: 75.1 mg (177 μmol, 67 %).

**b) β-Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5 und 8)**

28.8 mg (96.6 μmol) *p*NP-Gal, 75 mg (287 μmol, 3 eq.) **1**, 800 μl Inkubationspuffer, 40 μg BSA, 2.2 μl (22 U) β-Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Verdünnen mit 8 ml Hydrolysepuffer, 24 U β-Galactosidase aus *E. coli*. Ausbeute: 8.6 mg (20.3 μmol, 21 %).

**c) β-Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6 und 8)**

21.4 mg (71.0 μmol) *p*NP-Gal, 55.4 mg (212 μmol, 3 eq.) **1**, 1.2 ml Inkubationspuffer, 20 μl (420 mU) β-Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Verdünnen mit 12 ml Hydrolysepuffer, 18 U β-Galactosidase aus *E. coli*. Ausbeute: 10.3 mg (24.3 μmol, 34 %).

**d) Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* (AAV 7)**

14.0 mg (41.6 μmol) Gal-1-P, 13.1 mg (50.1 μmol, 1.2 eq.) **1**, 8.2 ml Inkubationspuffer, 1.2 ml Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum*. Ausbeute: 7.6 mg (17.9 μmol, 43 %).

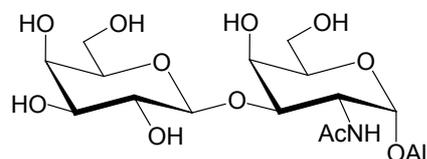
C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub> (423.42)

weißer Feststoff, Smp.: 224 °C

$[\alpha]_D^{20} = +104^\circ$  (c 0.5, H<sub>2</sub>O)

Lit.:<sup>182</sup> Smp.: 231 °C

$[\alpha]_D^{20} = +120^\circ$  (c 1, H<sub>2</sub>O)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 424.1 [M+H]^+$ ,  $446.1 [M+Na]^+$ ,  $462.0 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta = 6.16$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.53$  (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.39$  (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $5.08$  (d, 1 H, H-1),  $4.65$  (dd, 1 H, H-2),  $4.61$  (d, 1 H, H-1'),  $4.42$  (dddd, 1 H, All-1a),  $4.38$  (dd, 1 H, H-4),  $4.22$  (dddd, 1 H, All-1b),  $4.13$  (dd, 1 H, H-3),  $4.07$  (dt, 1 H, H-5),  $4.02$  (dd, 1 H, H-4'),  $3.98$ - $3.89$  (m, 4 H, H-6a/b, H-6'a/b),  $3.75$  (dd, 1 H, H-2'),  $3.72$  (dt, 1 H, H-5'),  $3.66$  (dd, 1 H, H-3'),  $2.18$  (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 13.0, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.1, J<sub>All-1b,2</sub> = 6.1, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.3, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.4, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 1.3, J<sub>1,2</sub> = 3.6, J<sub>2,3</sub> = 10.9, J<sub>3,4</sub> = 3.1, J<sub>4,5</sub> = 1.0, J<sub>5,6a</sub> = 5.6, J<sub>5,6b</sub> = 6.4, J<sub>1',2'</sub> = 7.6, J<sub>2',3'</sub> = 9.7, J<sub>3',4'</sub> = 3.3, J<sub>4',5'</sub> = 0.9, J<sub>5',6'a</sub> = 4.8, J<sub>5',6'b</sub> = 7.1 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 170.74$  (C=OCH<sub>3</sub>),  $134.10$  (All-2),  $118.27$  (All-3),  $105.10$  (C-1'),  $96.83$  (C-1),  $77.64$  (C-3),  $75.38$  (C-5'),  $72.93$  (C-3'),  $71.08$  (C-2'),  $71.02$  (C-5),  $69.14$  (C-4'),  $68.99$  (C-4),  $68.83$  (All-1),  $61.58$  (C-6),  $61.39$  (C-6'),  $49.02$  (C-2),  $22.38$  (COCH<sub>3</sub>) ppm.

**Allyl-2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosid (96) und Allyl-2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosid (97)**

Die chemoenzymatische Galactosylierung erfolgt nach **AAV 6**:

21.4 mg (71  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 55.4 mg (212  $\mu$ mol, 3 eq.) **1**, 1.2 ml Inkubationspuffer, 20  $\mu$ l (420 mU) Enzympräparation aus *Bacillus circulans*. Es werden 16.7 mg (39.4  $\mu$ mol, 56 %) eines Gemisches aus zwei Disacchariden erhalten.

Die Acetylierung des Rohprodukts erfolgt nach **AAV 1**:

Rückstand in 2 ml abs. Pyridin aufnehmen. Im Eisbad mit 1 ml Essigsäureanhydrid versetzen, 21 Stunden rühren. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:2.

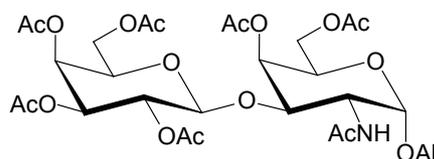
Allyl-2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosid (96)

C<sub>29</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>17</sub> (675.64)

Ausbeute: 16.0 mg (23.7  $\mu$ mol, 33 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +73^\circ$  (c 0.15, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 676.3 [M+H]^+$ ,  $698.3 [M+Na]^+$ ,  $714.3 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 5.88$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.63$  (d, 1 H, NH),  $5.35$  (bd, 1 H, H-4),  $5.33$  (bd, 1 H, H-4'),  $5.26$  (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.21$  (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $5.11$  (dd, 1 H, H-2'),  $4.94$  (d, 1 H, H-1),  $4.92$  (dd, 1 H, H-3'),  $4.58$  (d, 1 H, H-1'),  $4.50$  (ddd, 1 H, H-2),  $4.16$ - $4.10$  (m, 4 H, All-1a, H-6a, H-6'a/b),  $4.08$  (vt, 1 H, H-5),  $4.00$ - $3.95$  (m, 2 H, All-1b, H-6b),  $3.92$  (dd, 1 H, H-3),  $3.86$  (vt, 1 H, H-5'),  $2.14$ ,  $2.10$ ,  $2.05$ ,  $2.04$ ,  $2.03$ ,  $1.97$ ,  $1.94$  (7 s, 21 H, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

$J_{All-1a,2} = 5.7$ ,  $J_{All-1b,2} = 6.3$ ,  $J_{All-2,3cis} = 17.3$ ,  $J_{All-2,3trans} = 10.4$ ,  $^2J_{All-3cis/trans} = 0.9$ ,  $J_{1,2} = 3.5$ ,  $J_{2,NH} = 8.8$ ,  $J_{2,3} = 11.0$ ,  $J_{3,4} = 3.2$ ,  $J_{5,6a} = 5.7$ ,  $J_{5,6b} = 6.9$ ,  $J_{1',2'} = 7.9$ ,  $J_{2',3'} = 10.4$ ,  $J_{3',4'} = 3.5$ ,  $J_{5',6'a} = 6.3$ ,  $J_{5',6'b} = 6.9$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 171.19$ ,  $171.09$ ,  $170.97$ ,  $170.81$ ,  $170.79$ ,  $170.40$ ,  $170.32$  (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>),  $134.10$  (All-2),  $118.92$  (All-3),  $101.24$  (C-1'),  $97.69$  (C-1),  $73.46$  (C-3),  $71.59$  (C-5'),  $71.50$  (C-3'),  $69.54$  (C-4),  $69.40$  (All-1),  $69.21$  (C-2'),  $68.15$  (C-5),  $67.47$  (C-4'),  $63.32$  (C-6),  $61.82$  (C-6'),  $49.53$  (C-2),  $24.07$ ,  $21.44$ ,  $21.41$ ,  $21.39$ ,  $21.35$ ,  $21.33$ ,  $21.20$  (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

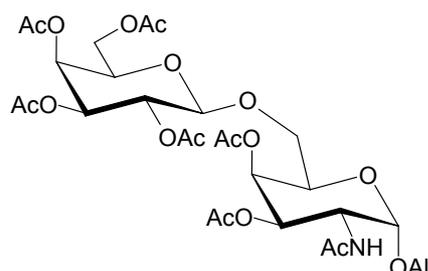
Allyl-2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-α-D-galactopyranosid (97)

C<sub>29</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>17</sub> (675.64)

Ausbeute: 10.5 mg (15.5 μmol, 22 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +57^\circ$  (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 676.5 [M+H]^+$ ,  $698.5 [M+Na]^+$ ,  $714.5 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 5.87$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.58$  (d, 1 H, NH),  $5.36$  (bd, 1 H, H-4'),  $5.33$ - $5.28$  (m, 2 H, All-3<sub>cis</sub>, H-4),  $5.23$  (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $5.17$  (dd, 1 H, H-2'),  $5.14$  (dd, 1 H, H-3),  $4.98$  (dd, 1 H, H-3'),  $4.88$  (d, 1 H, H-1),  $4.55$  (ddd, 1 H, H-2),  $4.46$  (d, 1 H, H-1'),  $4.18$  (dddd, 1 H, All-1a),  $4.15$  (dd, 1 H, H-6'a),  $4.14$  (vt, 1 H, H-5),  $4.09$  (dd, 1 H, H-6'b),  $3.94$  (dddd, 1 H, All-1b),  $3.88$  (vt, 1 H, H-5'),  $3.81$  (dd, 1 H, H-6a),  $3.57$  (dd, 1 H, H-6b),  $2.14$ ,  $2.13$ ,  $2.03$ ,  $2.01$ ,  $1.96$ ,  $1.95$ ,  $1.94$  (7 s, 21 H, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 12.9, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.4, J<sub>All-1b,2</sub> = 6.3, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.3, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.4, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 0.9, J<sub>1,2</sub> = 3.8, J<sub>2,NH</sub> = 9.8, J<sub>2,3</sub> = 11.4, J<sub>3,4</sub> = 3.2, J<sub>5,6a</sub> = 4.1, J<sub>5,6b</sub> = 7.9, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 10.4, J<sub>1',2'</sub> = 7.9, J<sub>2',3'</sub> = 10.4, J<sub>3',4'</sub> = 3.5, J<sub>5',6'a</sub> = 6.3, J<sub>5',6'b</sub> = 6.9, <sup>2</sup>J<sub>6a'/b'</sub> = 11.3 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 171.29$ ,  $170.78$ ,  $170.66$ ,  $170.62$ ,  $170.54$ ,  $170.41$ ,  $169.70$  (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>),  $133.70$  (All-2),  $118.62$  (All-3),  $101.67$  (C-1'),  $96.96$  (C-1),  $71.23$  (C-3'),  $71.15$  (C-5'),  $69.08$  (C-3),  $69.00$  (C-2'),  $68.79$  (All-1),  $68.67$  (C-6),  $68.60$  (C-5),  $68.49$  (C-4),  $67.33$  (C-4'),  $61.53$  (C-6'),  $48.31$  (C-2),  $23.76$ ,  $21.17$ ,  $21.16$ ,  $21.15$ ,  $21.06$ ,  $21.05$ ,  $20.96$  (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

**Methyl-2-acetamido-2-desoxy-3-O-(β-D-galactopyranosyl)-α-D-galactopyranosid (98)**

a) β-Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4)

57 mg (189 μmol) pNP-Gal, 444 mg (1.89 mmol, 10 eq.) **18**, 2.1 ml Inkubationspuffer, 18 mg (902 mU) β-Galactosidase aus Rinderhoden. Ausbeute: 49.5 mg (125 μmol, 66 %).

b) β-Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5 und 8)

28.8 mg (96.6 μmol) pNP-Gal, 67 mg (285 μmol, 3 eq.) **18**, 0.8 ml Inkubationspuffer, 40 μg BSA, 2.2 μl (22 U) β-Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Verdünnen mit 8 ml Hydrolysepuffer, 24 U β-Galactosidase aus *E. coli*. Ausbeute: 9.1 mg (22.9 μmol, 24 %).

c) β-Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6 und 8)

21.4 mg (71.0 μmol) pNP-Gal, 50.1 mg (213 μmol, 3 eq.) **18**, 1.2 ml Inkubationspuffer, 20 μl (420 mU) β-Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Verdünnen mit 12 ml Hydrolysepuffer, 18 U β-Galactosidase aus *E. coli*. Ausbeute: 9.3 mg (23.4 μmol, 33 %).

**d) Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* (AAV 7)**

14.0 mg (41.6  $\mu\text{mol}$ ) Gal-1-P, 11.8 mg (50.1  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) **18**, 8.2 ml Inkubationspuffer, 1.2 ml Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum*. Ausbeute: 7.3 mg (18.4  $\mu\text{mol}$ , 44 %).

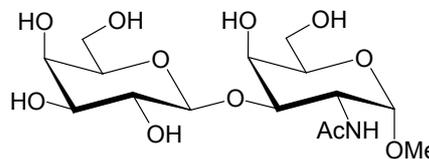
$\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}$  (397.38)

weißer Feststoff, Smp.: 231 °C

$[\alpha]_D^{20} = +117^\circ$  (c 0.5,  $\text{H}_2\text{O}$ )

Lit.:<sup>378</sup> Smp.: 235 °C (Zers.)

$[\alpha]_D^{20} = +128^\circ$  (c 0.38,  $\text{H}_2\text{O}$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 420.5$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $436.3$   $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 4.76$  (d, 1 H, H-1), 4.34 (d, 1 H, H-1'), 4.31 (dd, 1 H, H-2), 4.21 (bd, 1 H, H-4), 3.99 (dd, 1 H, H-3), 3.94 (dt, 1 H, H-5), 3.89 (bd, 1 H, H-4'), 3.79-3.68 (m, 4 H, H-6a/b, H-6'a/b), 3.63 (dt, 1 H, H-5'), 3.59 (dd, 1 H, H-3'), 3.49 (dd, 1 H, H-2'), 3.37 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 1.99 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,3} = 11.2$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{5,6a} = 5.3$ ,  $J_{5,6b} = 7.1$ ,  $J_{1',2'} = 7.9$ ,  $J_{2',3'} = 9.9$ ,  $J_{3',4'} = 3.1$ ,  $J_{5',6'a} = 4.3$ ,  $J_{5',6'b} = 5.3$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 175.00$  ( $\text{COCH}_3$ ), 105.10 (C-1'), 98.72 (C-1), 77.70 (C-3), 75.36 (C-5'), 72.94 (C-3'), 71.01 (C-2'), 70.84 (C-5), 69.15 (C-4), 68.98 (C-4'), 61.63, 61.37 (2 C, C-6, C-6'), 55.50 ( $\text{OCH}_3$ ), 48.99 (C-2), 22.41 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

**2-(Trimethylsilyl)-ethyl-2-acetamido-2-desoxy-3-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosid (100)****a)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4)**

20 mg (66.4  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 213 mg (663  $\mu\text{mol}$ , 10 eq.) **21**, 800  $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer, 6.2 mg (310 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Ausbeute: 15.0 mg (31.0  $\mu\text{mol}$ , 47 %).

**b)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5 und 8)**

14.4 mg (47.8  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 46 mg (143  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **21**, 0.4 ml Inkubationspuffer, 20  $\mu\text{g}$  BSA, 1.1  $\mu\text{l}$  (11 U)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Verdünnen mit 4 ml Hydrolysepuffer, 12 U  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*. Ausbeute: 4.4 mg (9.1  $\mu\text{mol}$ , 19 %).

**c)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6 und 8)**

14.3 mg (47.5  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 45.8 mg (142  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **21**, 0.8 ml Inkubationspuffer, 13.5  $\mu\text{l}$  (284 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Verdünnen mit 8 ml Hydrolysepuffer, 12 U  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*. Ausbeute: 8.1 mg (16.7  $\mu\text{mol}$ , 35 %).

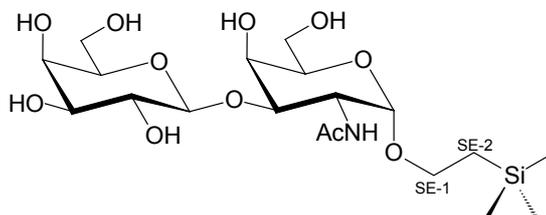
**d) Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* (AAV 7)**

14.0 mg (41.6  $\mu\text{mol}$ ) Gal-1-P, 16.0 mg (49.8  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) **21**, 8.2 ml Inkubationspuffer, 1.2 ml Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum*. Ausbeute: 4.7 mg (9.7  $\mu\text{mol}$ , 23 %).

$\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{NO}_{11}\text{Si}$  (483.59)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +79^\circ$  (c 0.13, MeOH)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 506.3$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $522.2$   $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 4.87$  (d, 1 H, H-1), 4.42-4.37 (m, 2 H, H-2, H-1'), 4.17 (bd, 1 H, H-4), 3.90 (dd, 1 H, H-3), 3.86-3.76 (m, 4 H, SE-1a, H-4', H-6a/b), 3.74-3.70 (m, 3 H, H-5, H-6'a/b), 3.57-3.48 (m, 3 H, SE-1b, H-2', H-5'), 3.45 (dd, 1 H, H-3'), 1.97 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.03 (ddd, 1 H, SE-2a), 0.93 (ddd, 1 H, SE-2b), 0.04 (s, 9 H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

$J_{\text{SE-1a,2a}} = 10.9$ ,  $J_{\text{SE-1a,2b}} = 5.6$ ,  $J_{\text{SE-1b,2a}} = 6.1$ ,  $J_{\text{SE-1b,2b}} = 10.7$ ,  $^2J_{\text{SE-2a/b}} = 13.7$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,3} = 11.2$ ,  $J_{3,4} = 2.8$ ,  $J_{1',2'} = 7.6$ ,  $J_{2',3'} = 9.9$ ,  $J_{3',4'} = 3.1$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 172.40$  ( $\text{COCH}_3$ ), 104.65 (C-1'), 96.65 (C-1), 77.41 (C-3), 75.15 (C-5), 73.13 (C-3'), 70.91 (C-2'), 70.44 (C-5'), 68.66 (C-4'), 68.44 (C-4), 64.54 (SE-1), 61.20, 60.96 (2 C, C-6, C-6'), 48.76 (C-2), 21.22 ( $\text{COCH}_3$ ), 17.14 (SE-2), -2.85 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

**Benzyl-2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosid (101)****a)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4 und 1)**

30 mg (99.6  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 310 mg (996  $\mu\text{mol}$ , 10 eq.) **20**, 2.0 ml Inkubationspuffer, 9.5 mg (0.48 U)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Der Reaktionsansatz wird ohne Gelpermeationschromatographie direkt nach **AAV 1** acetyliert: 6 ml Pyridin, 3 ml Essigsäureanhydrid. Laufmittel: Chloroform / Methanol 120:1. Ausbeute: 29.6 mg (40.8  $\mu\text{mol}$ , 41 %).

**b)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5, 8 und 1)**

28.8 mg (96.6  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 89.3 mg (287  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **20**, 800  $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer, 40  $\mu\text{g}$  BSA, 2.2  $\mu\text{l}$  (22 U)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Verdünnen mit 8 ml Hydrolysepuffer, 24 U  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*. Aufarbeitung analog zu Punkt a). Ausbeute: 11.3 mg (15.6  $\mu\text{mol}$ , 16 %).

**c)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6, 8 und 1)**

21.4 mg (71.0  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 66.3 mg (213  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **20**, 1.2 ml Inkubationspuffer, 20  $\mu\text{l}$  (420 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Verdünnen mit 12 ml Hydrolyse-

puffer, 18 U  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*. Aufarbeitung analog zu Punkt a). Ausbeute: 19.7 mg (27.1  $\mu$ mol, 38 %).

**d) Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* (AAV 7 und 1)**

14.0 mg (41.6  $\mu$ mol) Gal-1-P, 15.6 mg (50.1  $\mu$ mol, 1.2 eq.) **20**, 8.2 ml Inkubationspuffer, 1.2 ml Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum*. Aufarbeitung analog zu Punkt a). Ausbeute: 5.4 mg (7.4  $\mu$ mol, 18 %).

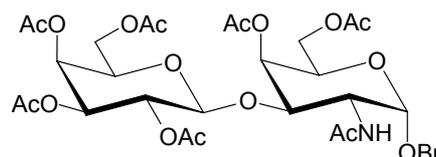
$C_{33}H_{43}NO_{17}$  (725.70)

weißer Feststoff, Smp.: 154 °C

$[\alpha]_D^{20} = +73^\circ$  (c 0.5,  $CHCl_3$ )

Lit.:<sup>206</sup> Smp.: 160-162 °C

$[\alpha]_D^{20} = +80^\circ$  (c 0.97,  $CHCl_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 748.4 [M+Na]^+$ ,  $764.3 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 7.58$ - $7.44$  (m, 5 H, Ar), 5.91 (dddd, 1 H, All-2), 5.64 (d, 1 H, NH), 5.37 (bd, 1 H, H-4), 5.35 (bd, 1 H, H-4'), 5.09 (dd, 1 H, H-2'), 4.99 (d, 1 H, H-1), 4.91 (dd, 1 H, H-3'), 4.72 (d, 1 H,  $OCH_2Ph$ -a), 4.60 (d, 1 H, H-1'), 4.51 (ddd, 1 H, H-2), 4.38 (d, 1 H,  $OCH_2Ph$ -b), 4.21-4.15 (m, 3 H, H-6a, H-6'a/b), 4.07 (vt, 1 H, H-5), 3.99 (dd, 1 H, H-6b), 3.94 (dd, 1 H, H-3), 3.84 (vt, 1 H, H-5'), 2.11, 2.10, 2.08, 2.04, 2.01, 1.96, 1.90 (7 s, 21 H, 7  $COCH_3$ ) ppm.

$^2J_{OCH_2Ph-a/b} = 11.7$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,NH} = 9.1$ ,  $J_{2,3} = 10.2$ ,  $J_{3,4} = 3.5$ ,  $J_{5,6b} = 7.1$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.4$ ,  $J_{1',2'} = 7.6$ ,  $J_{2',3'} = 10.8$ ,  $J_{3',4'} = 3.2$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 170.91$ , 170.63, 170.21, 170.16, 169.89, 169.70, 169.62 (7 C, 7  $COCH_3$ ), 139.07 (Ar-1), 131.12 (2 C, Ar-3/5), 127.73 (Ar-4), 127.18 (2 C, Ar-2/6), 101.23 (C-1'), 96.04 (C-1), 73.78 (C-3), 71.81 (C-5'), 71.44 (C-3'), 69.48 (C-4), 69.39 (C-2'), 69.15 ( $OCH_2Ph$ ), 68.61 (C-5), 67.74 (C-4'), 63.02 (C-6), 61.89 (C-6'), 47.35 (C-2), 22.51, 21.04, 20.71, 20.63, 20.12, 19.93, 19.70 (7 C, 7  $COCH_3$ ) ppm.

**2-Acetamido-1,5-anhydro-2-desoxy-3-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-D-galactitol (102)**

**a)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4)**

75.3 mg (250  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 513 mg (2.50 mmol, 10 eq.) **42**, 2.8 ml Inkubationspuffer, 23.4 mg (1.17 U)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Ausbeute: 63.9 mg (174  $\mu$ mol, 70 %).

**b)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5 und 8)**

20.0 mg (66.4  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 40.9 mg (199  $\mu$ mol, 3 eq.) **42**, 550  $\mu$ l Inkubationspuffer, 28  $\mu$ g BSA, 1.5  $\mu$ l (15 U)  $\beta$ -Galactosidase. 50 Stunden. Verdünnen mit 5.5 ml Hydrolysepuffer, 16 U  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*. Ausbeute: 4.6 mg (12.5  $\mu$ mol, 19 %).

**c)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6 und 8)**

15.1 mg (50.1  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 30.9 mg (151  $\mu$ mol, 3 eq.) **1**, 850  $\mu$ l Inkubationspuffer, 15  $\mu$ l (315 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Verdünnen mit 8.5 ml Hydrolyse-puffer, 12.5 U  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*. Ausbeute: 5.7 mg (15.5  $\mu$ mol, 31 %).

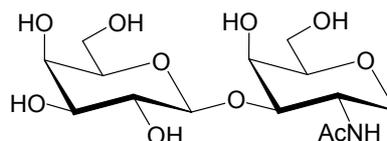
**d) Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* (AAV 7)**

14.0 mg (41.6  $\mu$ mol) Gal-1-P, 10.3 mg (50.2  $\mu$ mol, 1.2 eq.) **1**, 8.2 ml Inkubationspuffer, 1.2 ml Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum*. Ausbeute: 6.3 mg (17.1  $\mu$ mol, 41 %).

C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>10</sub> (367.35)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +63^\circ$  (c 0.2, DMSO/MeOH 1:1)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 390.1 [M+Na]^+$ ,  $406.1 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO/MeOD 1:1):  $\delta = 4.36$  (d, 1 H, H-1'),  $4.02$  (ddd, 1 H, H-2),  $3.94$  (bd, 1 H, H-4),  $3.82$  (dd, 1 H, H-1<sub>eq</sub>),  $3.67$  (dd, 1 H, H-4'),  $3.62$  (dd, 1 H, H-3),  $3.57$ - $3.49$  (m, 4 H, H-6a/b, H-6'a/b),  $3.44$ - $3.37$  (m, 2 H, H-2', H-5'),  $3.33$ - $3.28$  (m, 2 H, H-5, H-3'),  $3.01$  (vt, 1 H, H-1<sub>ax</sub>),  $1.83$  (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>1ax/eq</sub> = 10.9, J<sub>1ax,2</sub> = 10.7, J<sub>1eq,2</sub> = 5.1, J<sub>2,3</sub> = 10.7, J<sub>3,4</sub> = 2.8, J<sub>1',2'</sub> = 7.6, J<sub>3',4'</sub> = 3.3, J<sub>4',5'</sub> = 0.8 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, DMSO/MeOD 1:1):  $\delta = 170.33$  (C=O),  $104.22$  (C-1'),  $80.22$  (C-3),  $79.99$  (C-5),  $75.68$  (C-2'),  $73.51$  (C-3'),  $70.94$  (C-5'),  $68.37$  (C-4'),  $68.21$  (C-1),  $67.70$  (C-4),  $61.17$  (C-6),  $60.73$  (C-6'),  $46.70$  (C-2),  $23.04$  (COCH<sub>3</sub>) ppm.

**Methyl-2-desoxy-3-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (103)****a)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5)**

35 mg (116  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 62 mg (348  $\mu$ mol, 3 eq.) **51**, 1.0 ml Inkubationspuffer, 50  $\mu$ g BSA, 2.6  $\mu$ l (26 U)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Ausbeute: 5.1 mg (15  $\mu$ mol, 13 %).

**b)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6 und 8)**

30 mg (99.6  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 53.2 mg (299  $\mu$ mol, 3 eq.) **51**, 1.7 ml Inkubationspuffer, 28  $\mu$ l (588 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Verdünnen mit 17 ml Hydrolyse-puffer, 25 U  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*. Ausbeute: 3.7 mg (10.9  $\mu$ mol, 11 %).

**c) Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* (AAV 7)**

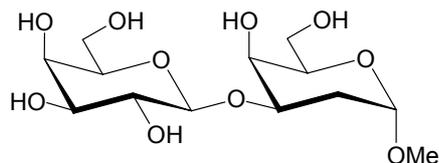
20.0 mg (59.5  $\mu$ mol) Gal-1-P, 12.7 mg (71.3  $\mu$ mol, 1.2 eq.) **51**, 11.7 ml Inkubationspuffer, 1.7 ml Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum*. Ausbeute: 2.8 mg (8.2  $\mu$ mol, 14 %).

$C_{13}H_{24}O_{10}$  (340.33)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +57^\circ$  (c 0.1,  $H_2O$ )

Lit.:<sup>298</sup>  $[\alpha]_D^{20} = +51^\circ$  (c 0.7,  $H_2O$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 363.1 [M+Na]^+$ ,  $379.1 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 5.12$  (bd, 1 H, H-1), 4.58 (d, 1 H, H-1'), 4.18 (ddd, 1 H, H-3), 4.10 (dd, 1 H, H-4), 4.02 (dt, 1 H, H-5), 3.94 (bd, 1 H, H-4'), 3.80-3.67 (m, 5 H, H-6a/b, H-5', H-6'a/b), 3.63 (dd, 1 H, H-3'), 3.59 (dd, 1 H, H-2'), 3.51 (s, 3 H,  $OCH_3$ ), 2.02-1.97 (m, 2 H, H-2<sub>ax/eq</sub>) ppm.

$J_{1,2ax} = 3.8$ ,  $J_{1,2eq} = 0.8$ ,  $^2J_{2ax,2eq} = 13.2$ ,  $J_{2ax,3} = 11.2$ ,  $J_{2eq,3} = 4.8$ ,  $J_{3,4} = 2.8$ ,  $J_{4,5} = 0.8$ ,  $J_{5,6a} = 6.1$ ,  $J_{5,6b} = 6.6$ ,  $J_{1',2'} = 7.8$ ,  $J_{2',3'} = 10.0$ ,  $J_{3',4'} = 3.4$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 105.12$  (C-1'), 98.58 (C-1), 75.93 (C-5'), 74.24 (C-3), 73.73 (C-3'), 71.80 (C-2'), 71.07 (C-5), 69.41 (C-4'), 66.29 (C-4), 62.58 (C-6), 62.19 (C-6'), 54.70 ( $OCH_3$ ), 31.62 (C-2) ppm.

### Allyl-2-desoxy-3-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-lyxo-hexopyranosid (104)

#### a) $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4)

80 mg (266  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 543 mg (2.66 mmol, 10 eq.) **54**, 3.0 ml Inkubationspuffer, 25 mg (1.25 U)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Ausbeute: 41.3 mg (113  $\mu$ mol, 42 %).

#### b) $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5)

35 mg (116  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 71 mg (348  $\mu$ mol, 3 eq.) **54**, 1.0 ml Inkubationspuffer, 50  $\mu$ g BSA, 2.6  $\mu$ l (26 U)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Ausbeute: 5.6 mg (15.3  $\mu$ mol, 13 %).

#### c) $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6 und 8)

30 mg (99.6  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 61 mg (299  $\mu$ mol, 3 eq.) **54**, 1.7 ml Inkubationspuffer, 28  $\mu$ l (588 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Verdünnen mit 17 ml Hydrolyse-puffer, 25 U  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*. Ausbeute: 2.9 mg (7.9  $\mu$ mol, 8 %).

#### d) Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* (AAV 7)

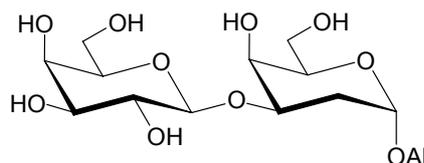
20.0 mg (59.5  $\mu$ mol) Gal-1-P, 14.6 mg (71.5  $\mu$ mol, 1.2 eq.) **54**, 11.7 ml Inkubationspuffer, 1.7 ml Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum*. Ausbeute: 3.2 mg (8.7  $\mu$ mol, 15 %).

$C_{15}H_{26}O_{10}$  (366.37)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +24^\circ$  (c 0.3,  $H_2O$ )

Lit.:<sup>280</sup>  $[\alpha]_D^{20} = +12^\circ$  (c 1,  $H_2O$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 389.6 [M+Na]^+$ ,  $405.5 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 6.03$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.40$  (dd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.33$  (dd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $5.18$  (dd, 1 H, H-1),  $4.55$  (d, 1 H, H-1'),  $4.27$ - $4.21$  (m, 2 H, All-1a, H-3),  $4.15$  (bd, 1 H, H-4),  $4.09$  (dddd, 1 H, All-1b),  $3.98$ - $3.95$  (m, 2 H, H-5, H-4'),  $3.85$ - $3.77$  (m, 4 H, H-6a/b, H-6'a/b),  $3.74$  (ddd, 1 H, H-5'),  $3.69$  (dd, 1 H, H-3'),  $3.57$  (dd, 1 H, H-2'),  $2.08$ - $2.00$  (m, 2 H, H-2<sub>ax/eq</sub>) ppm.

$^2J_{All-1a/b} = 12.7$ ,  $J_{All-1a,2} = 5.9$ ,  $J_{All-1b,2} = 6.4$ ,  $J_{All-2,3cis} = 17.3$ ,  $J_{All-2,3trans} = 10.4$ ,  $^2J_{All-3cis/trans} = 1.0$ ,  $J_{1,2ax} = 3.1$ ,  $J_{1,2eq} = 1.8$ ,  $J_{3,4} = 2.5$ ,  $J_{1',2'} = 7.6$ ,  $J_{2',3'} = 9.9$ ,  $J_{3',4'} = 3.3$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 133.90$  (All-2),  $118.78$  (All-3),  $102.20$  (C-1'),  $97.07$  (C-1),  $75.52$  (C-5'),  $73.94$  (C-3),  $73.01$  (C-3'),  $71.39$  (C-5),  $71.07$  (C-2'),  $69.01$  (C-4'),  $68.37$  (All-1),  $67.71$  (C-4),  $61.98$  (C-6),  $61.36$  (C-6'),  $29.67$  (C-2) ppm.

**Methyl-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-lyxo-hexopyranosid (105) und Methyl-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-lyxo-hexopyranosid (106)**

**a)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4 und 1)**

19 mg (63.1  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 90 mg (505  $\mu$ mol, 8 eq.) **52**, 630  $\mu$ l Inkubationspuffer, 5.4 mg (270 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Das Gemisch der Disaccharide (5.8 mg, 17  $\mu$ mol, 27 %) wird in 1 ml Pyridin aufgenommen, mit 0.5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:1. Es werden 6.4 mg (10.8  $\mu$ mol, 17 %) **105** und 3.3 mg (5.6  $\mu$ mol, 9 %) **106** erhalten.

**b)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5 und 1)**

35 mg (116  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 62 mg (348  $\mu$ mol, 3 eq.) **52**, 1.0 ml Inkubationspuffer, 50  $\mu$ g BSA, 2.6  $\mu$ l (26 U)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Das Gemisch der Disaccharide (5.5 mg, 16  $\mu$ mol, 14 %) wird in 1 ml Pyridin aufgenommen, mit 0.5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:1. Es werden 7.5 mg (12.7  $\mu$ mol, 11 %) **105** und 1.6 mg (2.7  $\mu$ mol, 2 %) **106** erhalten.

**c)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6 und 1)**

15 mg (49.8  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 26.5 mg (149  $\mu$ mol, 3 eq.) **52**, 0.8 ml Inkubationspuffer, 14  $\mu$ l (294 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Das Gemisch der Disaccharide

(5.7 mg, 17  $\mu\text{mol}$ , 34 %) wird in 1 ml Pyridin aufgenommen, mit 0.5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:1. Es werden 5.5 mg (9.3  $\mu\text{mol}$ , 19 %) **105** und 3.6 mg (6.1  $\mu\text{mol}$ , 12 %) **106** erhalten.

d) Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* (AAV 7 und 1)

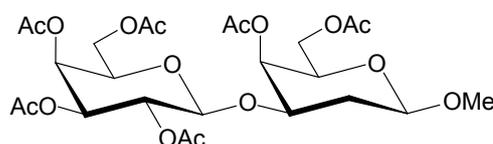
20.0 mg (59.5  $\mu\text{mol}$ ) Gal-1-P, 12.7 mg (71.3  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) **52**, 11.7 ml Inkubationspuffer, 1.7 ml Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum*. Das Rohprodukt (2.9 mg, 8.5  $\mu\text{mol}$ , 14 %) wird in 1 ml Pyridin aufgenommen, mit 0.5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Laufmittel: Petrolether / Ethylacetat 1:1. Ausbeute: 4.5 mg (7.6  $\mu\text{mol}$ , 13 %) **105**.

Methyl-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-lyxo-hexopyranosid (**105**)

$\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_{16}$  (592.55)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +27^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 615.5 [M+\text{Na}]^+$ ,  $631.6 [M+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.34$  (dd, 1 H, H-4'), 5.27 (dd, 1 H, H-4), 5.13 (dd, 1 H, H-2'), 4.96 (dd, 1 H, H-3'), 4.53 (d, 1 H, H-1'), 4.39 (dd, 1 H, H-1), 4.17-4.04 (m, 4 H, H-6a/b, H-6'a/b), 3.93 (ddd, 1 H, H-3), 3.85 (dt, 1 H, H-5'), 3.71 (dt, 1 H, H-5), 3.51 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.14, 2.08 (2 s, 6 H, 2  $\text{COCH}_3$ ), 2.06 ( $m_c$ , 1 H,  $\text{H}_{2\text{eq}}$ ), 2.04, 2.03, 2.00, 1.95 (4 s, 12 H, 4  $\text{COCH}_3$ ), 1.78 (ddd, 1 H,  $\text{H}_{2\text{ax}}$ ) ppm.

$J_{1,2\text{ax}} = 9.7$ ,  $J_{1,2\text{eq}} = 2.3$ ,  $^2J_{2\text{ax},2\text{eq}} = 12.2$ ,  $J_{2\text{ax},3} = 12.0$ ,  $J_{2\text{eq},3} = 4.6$ ,  $J_{3,4} = 3.3$ ,  $J_{4,5} = 0.8$ ,  $J_{5,6\text{a}} = 6.3$ ,  $J_{5,6\text{b}} = 6.6$ ,  $J_{1',2'} = 7.9$ ,  $J_{2',3'} = 10.4$ ,  $J_{3',4'} = 3.3$ ,  $J_{4',5'} = 0.8$ ,  $J_{5',6'\text{a}} = J_{5',6'\text{b}} = 6.7$  Hz.

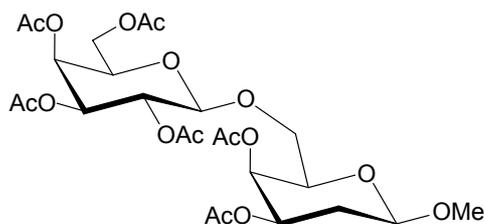
$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.79$ , 170.68, 170.56, 170.40, 170.32, 169.51 (6 C, 6  $\text{COCH}_3$ ), 101.32 (C-1), 98.88 (C-1'), 73.02 (C-3), 71.93 (C-5), 71.26 (C-5'), 71.15 (C-3'), 68.85 (C-2'), 67.21 (C-4'), 67.03 (C-4), 62.78 (C-6), 61.51 (C-6'), 57.16 ( $\text{OCH}_3$ ), 32.70 (C-2), 21.16, 21.13, 21.08, 21.01, 20.97, 20.91 (6 C, 6  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

Methyl-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-lyxo-hexopyranosid (**106**)

$\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_{16}$  (592.55)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 615.6 [M+\text{Na}]^+$ ,  $631.6 [M+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.36$  (dd, 1 H, H-4'), 5.21 (bd, 1 H, H-4), 5.16 (dd, 1 H, H-2'), 4.98-4.93 (m, 2 H, H-3, H-3'), 4.54 (d, 1 H, H-1'), 4.44 (dd, 1 H, H-1), 4.13-4.08 (m, 2 H, H-6'a/b), 3.88 (dt, 1 H, H-5'), 3.83 (dd, 1 H, H-6a), 3.77-3.73 (m, 2 H, H-5, H-6b), 3.53 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.13, 2.11 (2 s, 6 H, 2  $\text{COCH}_3$ ), 2.06 ( $m_c$ , 1 H,  $\text{H}_{2\text{eq}}$ ), 2.03, 2.02, 1.97, 1.96 (4 s, 12 H, 4  $\text{COCH}_3$ ), 1.89 (ddd, 1 H,  $\text{H}_{2\text{ax}}$ ) ppm.

$J_{1,2\text{ax}} = 9.4$ ,  $J_{1,2\text{eq}} = 2.3$ ,  $^2J_{2\text{ax},2\text{eq}} = 12.2$ ,  $J_{2\text{ax},3} = 11.6$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{5,6\text{a}} = 7.9$ ,  $^2J_{6\text{a}/\text{b}} = 13.7$ ,  $J_{1',2'} = 7.9$ ,  $J_{2',3'} = 10.4$ ,  $J_{3',4'} = 3.3$ ,  $J_{4',5'} = 1.0$ ,  $J_{5',6'\text{a}} = 6.6$ ,  $J_{5',6'\text{b}} = 6.9$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 171.23$ , 171.04, 170.69, 170.51, 170.15, 169.98 (6 C, 6  $\text{COCH}_3$ ), 101.47 (C-1), 101.25 (C-1'), 73.16 (C-5), 71.36 (C-5'), 71.11 (C-3'), 69.94 (C-3), 68.90 (C-2'), 67.96 (C-6), 67.40 (C-4'), 66.46 (C-4), 61.63 (C-6'), 57.27 ( $\text{OCH}_3$ ), 29.93 (C-2), 21.30, 21.21, 21.15, 21.10, 21.06, 20.99 (6 C, 6  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### Allyl-3-*O*-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (**107**) und Allyl-6-*O*-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (**108**)

#### a) $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4)

30 mg (99.6  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 219 mg (994  $\mu\text{mol}$ , 10 eq.) **59**,<sup>379</sup> 1.1 ml Inkubationspuffer, 9.5 mg (476 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Es werden 4.1 mg (10.7  $\mu\text{mol}$ , 11 %) **107** und 2.9 mg (7.6  $\mu\text{mol}$ , 8 %) **108** erhalten.

#### b) $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5)

40 mg (133  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 88 mg (400  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **59**,<sup>379</sup> 1.1 ml Inkubationspuffer, 57  $\mu\text{g}$  BSA, 3.0  $\mu\text{l}$  (30 U)  $\beta$ -Galactosidase. 50 Stunden. Ausbeute: 1.9 mg (5.0  $\mu\text{mol}$ , 4 %) **107**.

#### c) $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6)

30 mg (99.6  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 66 mg (300  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **59**,<sup>379</sup> 1.6 ml Inkubationspuffer, 28  $\mu\text{l}$  (588 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Es werden 3.7 mg (9.7  $\mu\text{mol}$ , 10 %) **107** und 2.0 mg (5.2  $\mu\text{mol}$ , 5 %) **108** erhalten.

### Allyl-3-*O*-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (**107**)

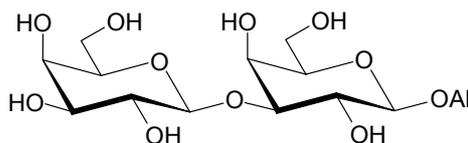
$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$  (382.36)

weißer Feststoff, Smp.: 202 °C

$[\alpha]_D^{20} = +2^\circ$  (c 0.1,  $\text{H}_2\text{O}$ )

Lit.:<sup>150</sup> Smp.: 213-215 °C

$[\alpha]_D^{21} = +11^\circ$  (c 1.2,  $\text{H}_2\text{O}$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 405.2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 421.1  $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 5.97$  (dddd, 1 H, All-2), 5.34 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.16 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.49 (d, 1 H, H-1'), 4.38 (dddd, 1 H, All-1a), 4.33 (d, 1 H, H-1), 4.16 (dddd, 1 H, All-1b), 4.12 (dd, 1 H, H-4), 3.82 (bd, 1 H, H-4'), 3.77-3.68 (m, 5 H, H-2, H-6a/b, H-6'a/b), 3.63 (dd, 1 H, H-2'), 3.60 (dd, 1 H, H-3), 3.56-3.51 (m, 2 H, H-5, H-5'), 3.49 (dd, 1 H, H-3') ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 12.7$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.4$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 6.1$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $J_{1,2} = 7.9$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{1',2'} = 7.6$ ,  $J_{2',3'} = 10.2$ ,  $J_{3',4'} = 3.1$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 134.70$  (All-2), 116.37 (All-3), 105.25 (C-1'), 102.34 (C-1), 83.83 (C-3), 75.70 (C-5), 75.19 (C-5'), 73.55 (C-3'), 71.89 (C-2'), 70.44 (C-2), 69.85 (All-1), 69.15 (C-4'), 68.69 (C-4), 61.48 (C-6), 61.43 (C-6') ppm.

### Allyl-6-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (108)

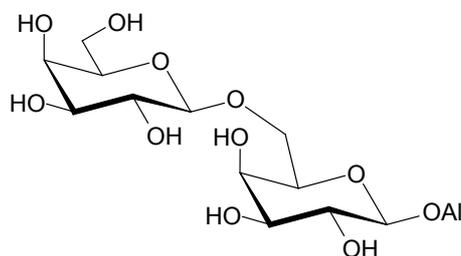
$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$  (382.36)

weißer Feststoff, Smp.: 137 °C

$[\alpha]_D^{20} = -21^\circ$  (c 0.1,  $\text{H}_2\text{O}$ )

Lit.:<sup>150</sup> Smp.: 134-135 °C

$[\alpha]_D^{21} = -14.5^\circ$  (c 1,  $\text{H}_2\text{O}$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 405.2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 421.1  $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 5.96$  (dddd, 1 H, All-2), 5.33 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.15 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.37 (dddd, 1 H, All-1a), 4.32 (d, 1 H, H-1'), 4.27 (d, 1 H, H-1), 4.14 (dddd, 1 H, All-1b), 4.01 (dd, 1 H, H-6a), 3.90 (dd, 1 H, H-4), 3.84 (dd, 1 H, H-6b), 3.22 (bd, 1 H, H-4'), 3.80-3.70 (m, 3 H, H-3', H-6'a/b), 3.55-3.49 (m, 4 H, H-2, H-5, H-2', H-5'), 3.46 (dd, 1 H, H-3) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 12.9$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 4.8$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 5.9$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.0$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.1$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.3$ ,  $J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.3$ ,  $J_{4,5} = 0.8$ ,  $J_{5,6a} = 5.9$ ,  $J_{5,6b} = 6.4$ ,  $^2J_{6/b} = 10.7$ ,  $J_{1',2'} = 7.4$ ,  $J_{3',4'} = 3.1$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 134.79$  (All-2), 116.23 (All-3), 104.23 (C-1'), 102.95 (C-1), 75.66 (C-5'), 74.11 (C-3'), 73.90 (C-3), 73.75 (C-5), 71.47 (C-2'), 71.43 (C-2), 70.05 (All-1), 69.22 (C-4'), 68.98 (C-4), 68.31 (C-6), 61.44 (C-6') ppm.

### **2-(Trimethylsilyl)-ethyl-2,4,6-tri-O-acetyl-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (109) und 2-(Trimethylsilyl)-ethyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (110)**

#### a) $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4 und 1)

10 mg (33.2  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 93 mg (332  $\mu\text{mol}$ , 10 eq.) **60**,<sup>380</sup> 400  $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer, 3.1 mg (155 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Das Gemisch der Disaccharide (1.9 mg, 4.3  $\mu\text{mol}$ ,

13 %) wird in 1 ml Pyridin aufgenommen, mit 0.5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 3:2. Es werden 0.7 mg (0.95  $\mu\text{mol}$ , 2.9 %) **109** und 2.1 mg (2.85  $\mu\text{mol}$ , 8.6 %) **110** erhalten.

**b)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5 und 1)**

20 mg (66.4  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 56 mg (200  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **60**,<sup>380</sup> 570  $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer, 29  $\mu\text{g}$  BSA, 1.5  $\mu\text{l}$  (15 U)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Das Rohprodukt wird in 1 ml Pyridin aufgenommen, mit 0.5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 3:2. Ausbeute: 1.5 mg (2.0  $\mu\text{mol}$ , 3.1 %) **109**.

**c)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6 und 1)**

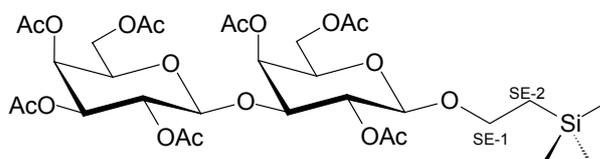
15 mg (49.8  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 42 mg (150  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **60**,<sup>380</sup> 0.8 ml Inkubationspuffer, 14  $\mu\text{l}$  (294 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Das Gemisch der Disaccharide (4.2 mg, 9.5  $\mu\text{mol}$ , 19 %) wird in 1 ml Pyridin aufgenommen, mit 0.5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 3:2. Es werden 3.2 mg (4.3  $\mu\text{mol}$ , 8.7 %) **109** und 2.7 mg (3.7  $\mu\text{mol}$ , 7.4 %) **110** erhalten.

**2-(Trimethylsilyl)-ethyl-2,4,6-tri-*O*-acetyl-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (**109**)**

$\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_{18}\text{Si}$  (736.80)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -41^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 759.1$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $775.1$   $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.36$  (bd, 1 H, H-4), 5.33 (dd, 1 H, H-4'), 5.17 (dd, 1 H, H-2), 5.06 (dd, 1 H, H-2'), 4.91 (dd, 1 H, H-3'), 4.54 (d, 1 H, H-1'), 4.35 (d, 1 H, H-1), 4.18 (dd, 1 H, H-6'a), 4.13-4.06 (m, 3 H, H-6a/b, H-6'b), 3.94 (ddd, 1 H, SE-1a), 3.85-3.77 (m, 3 H, H-3, H-5, H-5'), 3.52 (ddd, 1 H, SE-1b), 2.15, 2.11, 2.07, 2.05, 2.04, 2.00, 1.95 (7 s, 21 H, 7  $\text{COCH}_3$ ), 0.99-0.85 (m, 2 H, SE-2a/b), -0.03 (s, 9 H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

$^2\text{J}_{\text{SE-1a/b}} = 10.4$ ,  $\text{J}_{\text{SE-1a,2a}} = 9.7$ ,  $\text{J}_{\text{SE-1a,2b}} = 5.6$ ,  $\text{J}_{\text{SE-1b,2a}} = 6.9$ ,  $\text{J}_{\text{SE-1b,2b}} = 9.2$ ,  $\text{J}_{1,2} = 8.1$ ,  $\text{J}_{2,3} = 10.2$ ,  $\text{J}_{3,4} = 2.5$ ,  $\text{J}_{1',2'} = 7.9$ ,  $\text{J}_{2',3'} = 10.4$ ,  $\text{J}_{3',4'} = 3.6$ ,  $\text{J}_{4',5'} = 1.0$ ,  $\text{J}_{5',6'a} = 5.9$ ,  $^2\text{J}_{6'a/b} = 11.2$  Hz.

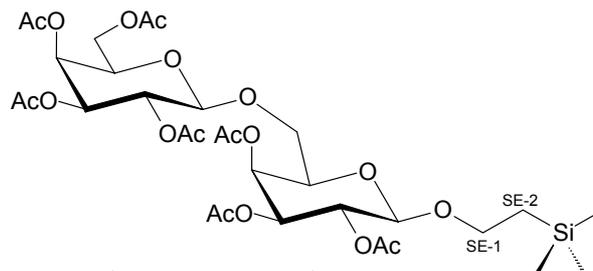
$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.90$ , 170.80, 170.78, 170.63, 170.53, 169.65, 169.25 (7 C, 7  $\text{COCH}_3$ ), 101.51 (C-1'), 100.91 (C-1), 76.38 (C-3), 71.79 (C-5), 71.48 (C-2), 71.23 (C-5'), 71.20 (C-3'), 69.33 (C-4), 69.00 (C-2'), 67.70 (SE-1), 67.15 (C-4'), 62.10 (C-6), 61.60 (C-6'), 21.79, 21.52, 21.48, 21.44, 21.36, 21.25, 21.12 (7 C, 7  $\text{COCH}_3$ ), 18.41 (SE-2), -0.99 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

2-(Trimethylsilyl)-ethyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosid (110)

C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>O<sub>18</sub>Si (736.80)

amorpher Feststoff

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -13° (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 759.2 [M+Na]<sup>+</sup>, 775.2 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5.37-5.33 (m, 2 H, H-4, H-4'), 5.17 (dd, 1 H, H-2), 5.14 (dd, 1 H, H-2'), 4.98 (dd, 1 H, H-3), 4.95 (dd, 1 H, H-3'), 4.50 (d, 1 H, H-1'), 4.44 (d, 1 H, H-1), 4.15 (dd, 1 H, H-6'a), 4.10 (dd, 1 H, H-6'b), 4.01 (ddd, 1 H, SE-1a), 3.88 (vt, 1 H, H-5'), 3.85-3.78 (m, 2 H, H-5, H-6a), 3.74 (dd, 1 H, H-6b), 3.53 (ddd, 1 H, SE-1b), 2.13, 2.12, 2.04, 2.03, 2.02, 1.96, 1.95 (7 s, 21 H, 7 COCH<sub>3</sub>), 0.97 (ddd, 1 H, SE-2a), 0.89 (ddd, 1 H, SE-2b), 0.01 (s, 9 H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>SE-1a/b</sub> = 10.2, J<sub>SE-1a,2a</sub> = 9.9, J<sub>SE-1a,2b</sub> = 5.3, J<sub>SE-1b,2a</sub> = 6.9, J<sub>SE-1b,2b</sub> = 9.7, <sup>2</sup>J<sub>SE-2a/b</sub> = 14.0, J<sub>1,2</sub> = 8.1, J<sub>2,3</sub> = 10.4, J<sub>3,4</sub> = 3.3, J<sub>5,6b</sub> = 6.4, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 9.9, J<sub>1',2'</sub> = 7.9, J<sub>2',3'</sub> = 10.4, J<sub>3',4'</sub> = 3.3, J<sub>5',6'a</sub> = 6.6, J<sub>5',6'b</sub> = 6.9, <sup>2</sup>J<sub>6'a/b</sub> = 11.2 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 170.86, 170.71, 170.69, 170.46, 170.44, 169.82, 169.80 (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>), 101.18 (C-1), 101.14 (C-1'), 72.70 (C-5), 71.47, 71.46 (2 C, C-3, C-3'), 71.44 (C-5'), 69.19 (C-2), 68.12 (SE-1), 67.68, 67.67 (2 C, C-4, C-4'), 67.21 (C-6), 67.19 (C-2'), 61.77 (C-6'), 21.48, 21.47, 21.46, 21.45, 21.18, 21.16, 19.40 (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>), 19.52 (SE-2), -0.98 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

**1,5-Anhydro-2-desoxy-3-O-(β-D-galactopyranosyl)-D-lyxo-hex-1-enitol (111)**

a) β-Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4)

75 mg (249 μmol) pNP-Gal, 468 mg (2.49 mmol, 10 eq.) **64**, 2.3 ml Inkubationspuffer, 24 mg (1.2 U) β-Galactosidase aus Rinderhoden. Ausbeute: 25.2 mg (81.7 μmol, 33 %).

b) β-Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5)

30 mg (99.6 μmol) pNP-Gal, 56 mg (298 μmol, 3 eq.) **64**, 800 μl Inkubationspuffer, 40 μg BSA, 2.2 μl (22 U) β-Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Ausbeute: 2.7 mg (8.8 μmol, 9 %).

c) β-Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6)

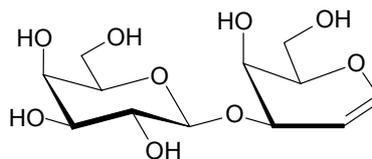
30 mg (99.6 μmol) pNP-Gal, 56 mg (298 μmol, 3 eq.) **64**, 1.6 ml Inkubationspuffer, 28 μl (588 mU) β-Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Ausbeute: 3.5 mg (11.4 μmol, 11 %).

$C_{12}H_{20}O_9$  (308.29)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$  (c 0.25,  $H_2O$ )

Lit.:<sup>244</sup>  $[\alpha]_D^{21} = -10^\circ$  (c 0.2,  $H_2O$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 331.4 [M+Na]^+$ ,  $347.4 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 6.52$  (dd, 1 H, H-1),  $4.89$  (dt, 1 H, H-2),  $4.67$  ( $m_c$ , 1 H, H-3),  $4.61$  (d, 1 H, H-1'),  $4.24$  (ddd, 1 H, H-4),  $4.13$  (ddd, 1 H, H-5),  $3.97$  (bd, 1 H, H-4'),  $3.91$  (dd, 1 H, H-6a),  $3.85$ - $3.79$  (m, 3 H, H-6b, H6'a/b),  $3.75$  (ddd, 1 H, H-5'),  $3.71$  (dd, 1 H, H-3'),  $3.61$  (dd, 1 H, H-2') ppm.

$J_{1,2} = 6.4$ ,  $^4J_{1,3} = 1.8$ ,  $J_{2,3} = 2.0$ ,  $^4J_{2,4} = 1.3$ ,  $J_{3,4} = 4.6$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{5,6a} = 7.9$ ,  $J_{5,6b} = 4.3$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.7$ ,  $J_{1',2'} = 7.6$ ,  $J_{2',3'} = 9.9$ ,  $J_{3',4'} = 3.3$ ,  $J_{4',5'} = 0.8$ ,  $J_{5',6'a} = 3.6$ ,  $J_{5',6'b} = 7.9$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 145.06$  (C-1),  $102.77$  (C-1'),  $100.50$  (C-2),  $77.21$  (C-5),  $75.51$  (C-5'),  $73.29$  (C-3),  $73.07$  (C-3'),  $71.13$  (C-2'),  $69.01$  (C-4'),  $64.59$  (C-4),  $61.62$  (C-6),  $61.34$  (C-6') ppm.

### 1,5-Anhydro-2-desoxy-3-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-D-arabino-hex-1-enitol (112) und 1,5-Anhydro-2-desoxy-4-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-D-arabino-hex-1-enitol (113)

#### a) $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4)

Akzeptor **61**:<sup>374</sup>

75 mg (249  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 364 mg (2.49 mmol, 10 eq.) **61**, 2.3 ml Inkubationspuffer, 24 mg (1.2 U)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Ausbeute: 18.3 mg (59.4  $\mu$ mol, 24 %) **112** und 6.4 mg (20.8  $\mu$ mol, 8 %) **113**.

Akzeptor **63**:

75 mg (249  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 468 mg (2.49 mmol, 10 eq.) **63**, 2.3 ml Inkubationspuffer, 24 mg (1.2 U)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Ausbeute: 20.1 mg (65.2  $\mu$ mol, 26 %) **112** und 1.5 mg (4.9  $\mu$ mol, 2 %) **113**.

#### b) $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5)

Akzeptor **61**:<sup>374</sup>

30 mg (99.6  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 44 mg (301  $\mu$ mol, 3 eq.) **61**, 800  $\mu$ l Inkubationspuffer, 40  $\mu$ g BSA, 2.2  $\mu$ l (22 U)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Ausbeute: 3.5 mg (11.4  $\mu$ mol, 11 %) **112**.

Akzeptor **63**:

30 mg (99.6  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 56 mg (298  $\mu$ mol, 3 eq.) **63**, 800  $\mu$ l Inkubationspuffer, 40  $\mu$ g BSA, 2.2  $\mu$ l (22 U)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Ausbeute: 3.3 mg (10.7  $\mu$ mol, 11 %) **112**.

c)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6)

Akzeptor **61**.<sup>374</sup>

30 mg (99.6  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 44 mg (301  $\mu$ mol, 3 eq.) **61**, 1.6 ml Inkubationspuffer, 28  $\mu$ l (588 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Ausbeute: 2.4 mg (7.8  $\mu$ mol, 8 %) **112**.

Akzeptor **63**:

30 mg (99.6  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 56 mg (298  $\mu$ mol, 3 eq.) **63**, 1.6 ml Inkubationspuffer, 28  $\mu$ l (588 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Ausbeute: 1.9 mg (6.2  $\mu$ mol, 6 %) **112**.

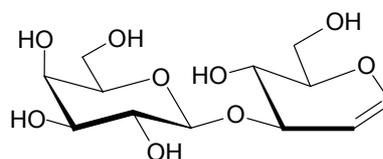
1,5-Anhydro-2-desoxy-3-*O*-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-D-arabino-hex-1-enitol (**112**)

C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub> (308.29)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -25^\circ$  (c 0.2, H<sub>2</sub>O)

Lit.:<sup>244</sup>  $[\alpha]_D^{21} = -21^\circ$  (c 0.28, H<sub>2</sub>O)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 331.2$  [M+Na]<sup>+</sup>, 347.2 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 6.40$  (dd, 1 H, H-1), 4.83 (dd, 1 H, H-2), 4.41 (d, 1 H, H-1'), 4.28 (m<sub>c</sub>, 1 H, H-3), 3.84-3.78 (m, 3 H, H-4, H-5, H-4'), 3.76-3.73 (m, 2 H, H-6a/b), 3.69-3.63 (m, 2 H, H6'a/b), 3.60 (vt, 1 H, H-5'), 3.57 (dd, 1 H, H-3'), 3.41 (dd, 1 H, H-2') ppm.

$J_{1,2} = 6.2$ ,  $^4J_{1,3} = 1.6$ ,  $J_{2,3} = 2.6$ ,  $J_{1',2'} = 7.8$ ,  $J_{2',3'} = 9.6$ ,  $J_{3',4'} = 3.4$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 145.18$  (C-1), 101.83 (C-1'), 100.07 (C-2), 78.41 (C-5), 77.14 (C-5'), 75.79 (C-3), 73.23 (C-3'), 71.07 (C-2'), 69.04 (C-4'), 67.41 (C-4), 61.53 (C-6), 60.39 (C-6') ppm.

1,5-Anhydro-2-desoxy-4-*O*-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-D-arabino-hex-1-enitol (**113**)

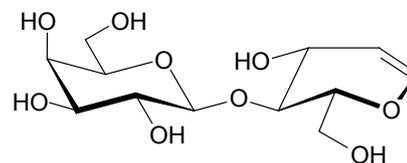
C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub> (308.29)

weißer Feststoff, Smp.: 188 °C

$[\alpha]_D^{20} = +21^\circ$  (c 0.2, H<sub>2</sub>O)

Lit.:<sup>381</sup> Smp.: 191-193 °C

$[\alpha]_D^{21} = +27^\circ$  (c 1.6, H<sub>2</sub>O)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 331.3$  [M+Na]<sup>+</sup>, 347.2 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 6.42$  (dd, 1 H, H-1), 4.81 (dd, 1 H, H-2), 4.50 (d, 1 H, H-1'), 4.44 (dt, 1 H, H-3), 4.00 (dt, 1 H, H-5), 3.94-3.85 (m, 3 H, H-6a/b, H-4'), 3.82 (dd, 1 H, H-4), 3.79-3.73 (m, 2 H, H6'a/b), 3.70 (vt, 1 H, H-5'), 3.66 (dd, 1 H, H-3'), 3.51 (dd, 1 H, H-2') ppm.

$J_{1,2} = 6.2$ ,  ${}^4J_{1,3} = 1.3$ ,  $J_{2,3} = 2.6$ ,  $J_{3,4} = 6.6$ ,  $J_{4,5} = 9.1$ ,  $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 3.8$ ,  $J_{1',2'} = 8.1$ ,  $J_{2',3'} = 9.6$ ,  $J_{3',4'} = 3.5$  Hz.

${}^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 144.91$  (C-1), 103.88 (C-1'), 102.70 (C-2), 78.41 (C-4), 77.74 (C-5), 76.31 (C-5'), 73.52 (C-3'), 71.93 (C-2'), 69.46 (C-4'), 68.29 (C-3), 62.03 (C-6'), 60.59 (C-6) ppm.

### 1,5-Anhydro-2-desoxy-3-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-D-lyxo-hexitol (114)

#### a) $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4)

75.2 mg (250  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 371 mg (2.50 mmol, 10 eq.) **66**, 2.8 ml Inkubationspuffer, 24 mg (1.20 U)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Ausbeute: 46.9 mg (151  $\mu\text{mol}$ , 61 %).

#### b) $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5 und 8)

24.1 mg (80.0  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 35.6 mg (240  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **66**, 700  $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer, 30  $\mu\text{g}$  BSA, 1.8  $\mu\text{l}$  (18 U)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Verdünnen mit 7 ml Hydrolysepuffer, 20 U  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*. Ausbeute: 4.5 mg (14.5  $\mu\text{mol}$ , 18 %).

#### c) $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6 und 8)

24.1 mg (80.0  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 35.6 mg (240  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **66**, 1.4 ml Inkubationspuffer, 22  $\mu\text{l}$  (462 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Verdünnen mit 14 ml Hydrolysepuffer, 20 U  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*. Ausbeute: 3.2 mg (10.3  $\mu\text{mol}$ , 13 %).

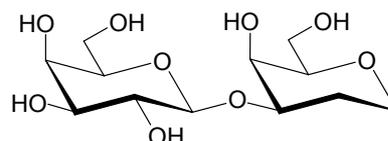
#### d) Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* (AAV 7)

14.0 mg (41.6  $\mu\text{mol}$ ) Gal-1-P, 7.4 mg (50.0  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) **66**, 8.2 ml Inkubationspuffer, 1.2 ml Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum*. Ausbeute: 2.4 mg (7.7  $\mu\text{mol}$ , 19 %).

$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_9$  (310.30)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -13^\circ$  (c 0.08,  $\text{H}_2\text{O}$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 333.3$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 349.3  $[\text{M}+\text{K}]^+$

${}^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 4.55$  (d, 1 H, H-1'), 4.07-4.01 (m, 3 H, H-1<sub>eq</sub>, H-3, H-4), 3.93 (bd, 1 H, H-4'), 3.78-3.68 (m, 5 H, H-6a/b, H-5', H-6'a/b), 3.65 (dd, 1 H, H-3'), 3.56-3.48 (m, 3 H, H-1<sub>ax</sub>, H-5, H-2'), 1.90 (m, 2 H, H-2<sub>ax/eq</sub>) ppm.

$J_{1',2'} = 7.9$ ,  $J_{2',3'} = 9.9$ ,  $J_{3',4'} = 3.3$  Hz.

${}^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 101.98$  (C-1'), 79.57 (C-5), 77.51 (C-3), 75.72 (C-5'), 73.24 (C-3'), 71.32 (C-2'), 69.24 (C-4'), 68.24 (C-4), 66.27 (C-1), 62.45 (C-6), 61.57 (C-6'), 26.14 (C-2) ppm.

**Allyl-2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-α-D-glucopyranosid (115) und Allyl-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-α-D-glucopyranosid (116)**

**a) β-Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4 und 1)**

40 mg (133 μmol) *p*NP-Gal, 347 mg (1.33 mmol, 10 eq.) **8**, 1.5 ml Inkubationspuffer, 13 mg (651 mU) β-Galactosidase aus Rinderhoden. Der Reaktionsansatz wird ohne Gelpermeationschromatographie direkt nach **AAV 1** acetyliert: 4 ml Pyridin, 2 ml Essigsäureanhydrid. Laufmittel: Ethylacetat / Ethanol 9:1. Ausbeute: 44 mg (65 μmol, 49 %) **115** und 5.5 mg (8.1 μmol, 6 %) **116**.

**b) β-Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5 und 1)**

20 mg (66.4 μmol) *p*NP-Gal, 52 mg (199 μmol, 3 eq.) **8**, 550 μl Inkubationspuffer, 28 μg BSA, 1.5 μl (15 U) β-Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Verdünnen mit 5 ml Hydrolysepuffer, 16 U β-Galactosidase aus *E. coli*. Aufarbeitung analog zu Punkt a). Ausbeute: 10.1 mg (14.9 μmol, 23 %) **115**.

**c) β-Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6 und 1)**

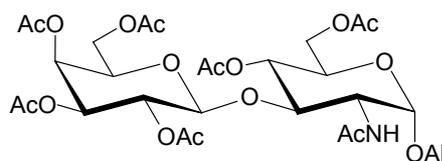
20 mg (66.4 μmol) *p*NP-Gal, 52 mg (199 μmol, 3 eq.) **8**, 1.1 ml Inkubationspuffer, 19 μl (399 mU) β-Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Verdünnen mit 11 ml Hydrolysepuffer, 16 U β-Galactosidase aus *E. coli*. Aufarbeitung analog zu Punkt a). Ausbeute: 12.8 mg (18.9 μmol, 29 %) **115**.

**Allyl-2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-α-D-glucopyranosid (115)**

C<sub>29</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>17</sub> (675.64)

amorpher Feststoff

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +27° (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 698.2 [M+Na]^+$ ,  $714.2 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5.82 (dddd, 1 H, All-2), 5.53 (d, 1 H, NH), 5.30 (bd, 1 H, H-4'), 5.27 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.23 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 5.00-4.91 (m, 3 H, H-4, H-2', H-3'), 4.74 (d, 1 H, H-1), 4.48 (d, 1 H, H-1'), 4.35 (ddd, 1 H, H-2), 4.19-4.10 (m, 4 H, All-1a, H-6a/b, H-6'a), 4.01-3.95 (m, 2 H, All-1b, H-6'b), 3.92-3.79 (m, 3 H, H-3, H-5, H-5'), 2.12, 2.09, 2.06, 2.05, 2.02, 2.01, 1.95 (7 s, 21 H, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

$J_{All-1a,2} = 5.1$ ,  $J_{All-1b,2} = 5.9$ ,  $J_{All-2,3cis} = 17.3$ ,  $J_{All-2,3trans} = 10.4$ ,  $^2J_{All-3cis/trans} = 1.0$ ,  $J_{1,2} = 3.8$ ,  $J_{2,NH} = 7.8$ ,  $J_{2,3} = 10.6$ ,  $J_{1',2'} = 7.6$ ,  $J_{3',4'} = 3.5$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.87, 170.79, 170.67, 170.48, 170.39, 170.34, 170.12$  (7 C, 7  $\text{COCH}_3$ ), 132.14 (All-2), 117.72 (All-3), 100.21 (C-1'), 95.79 (C-1), 75.36 (C-3), 69.91 (C-2'), 69.37 (C-4'), 67.95 (C-5'), 67.45 (C-4), 67.24 (All-1), 67.05 (C-5), 65.80 (C-3'), 61.34 (C-6), 60.09 (C-6'), 51.35 (C-2), 22.24, 21.04, 20.48, 20.29, 20.13, 20.7, 19.93 (7 C, 7  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

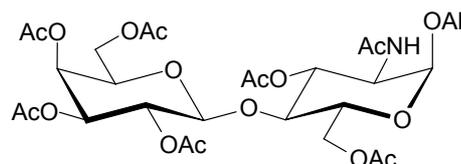
Allyl-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-glucopyranosid (116)

$\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{NO}_{17}$  (675.64)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +27^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ )

Lit.:<sup>382</sup>  $[\alpha]_D^{20} = +33^\circ$  (c 0.13,  $\text{CHCl}_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 698.4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $714.3$   $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.80$  (dddd, 1 H, All-2), 5.60 (d, 1 H, NH), 5.29-5.18 (m, 4 H, All-3<sub>cis</sub>, All-3<sub>trans</sub>, H-3, H-4'), 5.03 (dd, 1 H, H-2'), 4.87 (dd, 1 H, H-3'), 4.79 (d, 1 H, H-1), 4.46 (d, 1 H, H-1'), 4.37 (dd, 1 H, H-6'a), 4.21 (ddd, 1 H, H-2), 4.08 (dddd, 1 H, All-1a), 4.05-3.94 (m, 3 H, H-6a/b, H-6'b), 3.89 (dddd, 1 H, All-1b), 3.85-3.77 (m, 2 H, H-5, H-5'), 3.71 (vt, 1 H, H-4), 2.09, 2.04, 2.03, 2.01, 1.99, 1.97, 1.94 (7 s, 21 H, 7  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 12.2$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.1$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 6.8$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 0.7$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 9.8$ ,  $J_{2,3} = 11.0$ ,  $J_{3,4} = 9.5$ ,  $J_{4,5} = 10.2$ ,  $J_{1',2'} = 8.1$ ,  $J_{2',3'} = 7.6$ ,  $J_{3',4'} = 3.6$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 169.92, 169.87, 169.76, 169.22, 169.04, 168.71, 168.17$  (7 C, 7  $\text{COCH}_3$ ), 132.07 (All-2), 117.52 (All-3), 100.17 (C-1'), 95.16 (C-1), 75.39 (C-4), 70.52 (C-3), 69.98 (C-3'), 69.61 (C-5), 68.06 (C-2'), 67.74 (All-1), 67.44 (C-5'), 65.43 (C-4'), 61.53 (C-6'), 60.76 (C-6), 51.13 (C-2), 22.31, 21.32, 21.08, 20.85, 20.66, 19.97, 19.56 (7 C, 7  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

**Methyl-2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-glucopyranosid (117) und Methyl-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-glucopyranosid (118)**

a)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4 und 1)

40 mg (133  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 312 mg (1.33 mmol, 10 eq.) Methyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosid<sup>207</sup> (24), 1.5 ml Inkubationspuffer, 13 mg (651 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Der Reaktionsansatz wird ohne Gelpermeationschromatographie direkt nach AAV 1 acetyliert: 4 ml Pyridin, 2 ml Essigsäureanhydrid. Laufmittel: Dichlormethan / Aceton 6:1. Ausbeute: 37 mg (57  $\mu\text{mol}$ , 43 %) 117 und 14 mg (21.6  $\mu\text{mol}$ , 16 %) 118.

**b)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5 und 1)**

20 mg (66.4  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 46 mg (196  $\mu$ mol, 3 eq.) **24**, 550  $\mu$ l Inkubationspuffer, 28  $\mu$ g BSA, 1.5  $\mu$ l (15 U)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Verdünnen mit 5 ml Hydrolysepuffer, 16 U  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*. Aufarbeitung analog zu Punkt a). Ausbeute: 8.8 mg (13.5  $\mu$ mol, 20 %) **117**.

**c)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6 und 1)**

20 mg (66.4  $\mu$ mol) *p*NP-Gal, 46 mg (196  $\mu$ mol, 3 eq.) **24**, 1.1 ml Inkubationspuffer, 19  $\mu$ l (399 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Verdünnen mit 11 ml Hydrolysepuffer, 16 U  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*. Aufarbeitung analog zu Punkt a). Ausbeute: 14.5 mg (22.3  $\mu$ mol, 34 %) **117**.

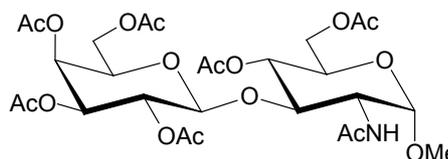
**Methyl-2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-glucopyranosid (117)**

C<sub>27</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>17</sub> (649.60)

weißer Feststoff, Smp.: 171 °C

$[\alpha]_D^{20} = +17^\circ$  (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

Lit.:<sup>294</sup>  $[\alpha]_D^{20} = +15^\circ$  (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 672.6 [M+Na]^+$ ,  $688.7 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 5.54$  (d, 1 H, NH),  $5.35$  (bd, 1 H, H-4'),  $5.02$ - $4.92$  (m, 3 H, H-4, H-2', H-3'),  $4.64$  (d, 1 H, H-1),  $4.54$  (d, 1 H, H-1'),  $4.37$  (ddd, 1 H, H-2),  $4.21$ - $4.14$  (m, 3 H, H-6a/b, H-6'a),  $4.01$  (dd, 1 H, H-6'b),  $3.90$ - $3.85$  (m, 3 H, H-3, H-5, H-5'),  $3.41$  (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>),  $2.12$ ,  $2.08$ ,  $2.06$ ,  $2.05$ ,  $2.01$ ,  $2.00$ ,  $1.96$  (7 s, 21 H, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

$J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,NH} = 9.6$ ,  $J_{2,3} = 10.2$ ,  $J_{1',2'} = 7.8$ ,  $J_{3',4'} = 3.1$ ,  $J_{5,6'b} = 5.6$ ,  $^2J_{6'a/b} = 11.8$  Hz.

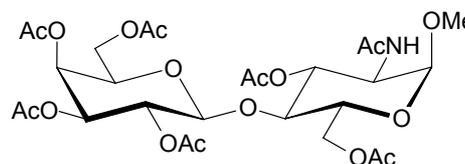
<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 169.78$ ,  $169.69$ ,  $169.27$ ,  $167.06$ ,  $168.93$ ,  $168.54$ ,  $168.31$  (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>),  $100.02$  (C-1'),  $97.57$  (C-1),  $75.24$  (C-3),  $69.95$  (C-4),  $69.29$  (C-5'),  $67.89$  (C-2'),  $67.61$  (C-3'),  $66.85$  (C-5),  $65.73$  (C-4'),  $61.29$  (C-6),  $60.00$  (C-6'),  $54.31$  (OCH<sub>3</sub>),  $51.25$  (C-2),  $22.15$ ,  $20.64$ ,  $20.22$ ,  $20.12$ ,  $19.77$ ,  $19.39$ ,  $19.26$  (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

**Methyl-2-acetamido-3,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-glucopyranosid (118)**

C<sub>27</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>17</sub> (649.60)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +14^\circ$  (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 672.7 [M+Na]^+$ ,  $688.7 [M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 5.58 (d, 1 H, NH), 5.21-5.17 (m, 2 H, H-3, H-4'), 5.05 (dd, 1 H, H-2'), 4.90 (dd, 1 H, H-3'), 4.68 (d, 1 H, H-1), 4.50 (d, 1 H, H-1'), 4.24 (ddd, 1 H, H-2), 4.17 (dd, 1 H, H-6'a), 4.09-4.01 (m, 3 H, H-6a/b, H-6'b), 3.80-3.74 (m, 2 H, H-5, H-5'), 3.71 (vt, 1 H, H-4), 3.47 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.08, 2.03, 2.02, 2.01, 1.98, 1.96, 1.94 (7 s, 21 H, 7  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$J_{1,2} = 3.8$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 8.4$ ,  $J_{2,3} = 10.2$ ,  $J_{3,4} = 9.5$ ,  $J_{4,5} = 9.8$ ,  $J_{1',2'} = 7.8$ ,  $J_{2',3'} = 9.8$ ,  $J_{3',4'} = 3.4$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170.29, 170.16, 169.94, 169.74, 169.61, 169.39, 169.08 (7 C, 7  $\text{COCH}_3$ ), 102.01 (C-1'), 96.34 (C-1), 75.48 (C-4), 70.63 (C-3), 70.14 (C-3'), 69.82 (C-5), 68.72 (C-2'), 67.68 (C-5'), 65.51 (C-4'), 61.35 (C-6), 60.88 (C-6'), 54.37 ( $\text{OCH}_3$ ), 50.96 (C-2), 23.02, 20.92, 20.81, 20.65, 20.33, 20.09, 19.93 (7 C, 7  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

**Benzyl-2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-glucopyranosid (119) und Benzyl-2-acetamido-3,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-glucopyranosid (120)**

**a)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4 und 1)**

40 mg (133  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 413 mg (1.33 mmol, 10 eq.) Benzyl-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosid<sup>208</sup> (**25**), 1.5 ml Inkubationspuffer, 13 mg (651 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Der Reaktionsansatz wird ohne Gelpermeationschromatographie direkt nach **AAV 1** acetyliert: 4 ml Pyridin, 2 ml Essigsäureanhydrid. Laufmittel: Dichlormethan / Methanol 50:1. Ausbeute: 38 mg (52  $\mu\text{mol}$ , 39 %) **119** und 4 mg (5.5  $\mu\text{mol}$ , 4 %) **120**.

**b)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5 und 1)**

20 mg (66.4  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 62 mg (199  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **25**,<sup>208</sup> 550  $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer, 28  $\mu\text{g}$  BSA, 1.5  $\mu\text{l}$  (15 U)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Verdünnen mit 5 ml Hydrolysepuffer, 16 U  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*. Aufarbeitung analog zu Punkt a). Ausbeute: 10 mg (13.8  $\mu\text{mol}$ , 21 %) **119**.

**c)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6 und 1)**

20 mg (66.4  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 62 mg (199  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **25**,<sup>208</sup> 1.1 ml Inkubationspuffer, 19  $\mu\text{l}$  (399 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Verdünnen mit 11 ml Hydrolysepuffer, 16 U  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*. Aufarbeitung analog zu Punkt a). Ausbeute: 15.5 mg (21.4  $\mu\text{mol}$ , 32 %) **119**.

Benzyl-2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-α-D-glucopyranosid (119)

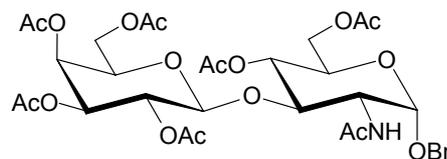
C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>17</sub> (725.70)

weißer Feststoff, Smp.: 172 °C

$[\alpha]_D^{20} = +47^\circ$  (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

Lit.:<sup>383</sup> Smp.: 175-176 °C

$[\alpha]_D^{25} = +45^\circ$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 748.8 [M+Na]^+$ ,  $764.8 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.34-7.18$  (m, 5 H, Ar), 5.45 (d, 1 H, NH), 5.25 (bd, 1 H, H-4'), 4.98-4.91 (m, 2 H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.88 (vt, 1 H, H-4), 4.81-4.77 (m, 2 H, H-2', H-3'), 4.76 (d, 1 H, H-1), 4.45 (d, 1 H, H-1'), 4.33 (ddd, 1 H, H-2), 4.08-4.01 (m, 4 H, H-6a/b, H-6'a/b), 3.94-3.89 (m, 2 H, H-5, H-5'), 3.82 (vt, 1 H, H-3), 2.12, 2.08, 2.06, 2.05, 2.01, 2.00, 1.96 (7 s, 21 H, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

$J_{1,2} = 3.5$ ,  $J_{2,NH} = 9.8$ ,  $J_{2,3} = 10.2$ ,  $J_{3,4} = 10.0$ ,  $J_{4,5} = 9.6$ ,  $J_{1',2'} = 7.8$ ,  $J_{3',4'} = 3.1$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 170.12$ , 169.94, 169.72, 167.63, 169.15, 168.97, 168.81 (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>), 135.03 (Ar-1), 129.74 (2 C, Ar-3/5), 129.46 (Ar-4), 128.68 (2 C, Ar-2/6), 100.28 (C-1'), 96.93 (C-1), 73.42 (C-3), 70.03 (OCH<sub>2</sub>Ph), 69.72 (C-4), 68.09 (C-5'), 67.98 (C-2'), 67.17 (C-3'), 66.72 (C-5), 66.31 (C-4'), 61.58 (C-6), 60.43 (C-6'), 51.52 (C-2), 23.02, 21.23, 20.87, 20.64, 20.39, 20.13, 19.94 (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

Benzyl-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-α-D-glucopyranosid (120)

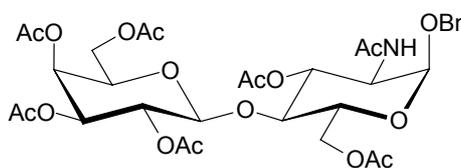
C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>17</sub> (725.70)

weißer Feststoff, Smp.: 101 °C

$[\alpha]_D^{20} = +51^\circ$  (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

Lit.:<sup>384</sup> Smp.: 102-104 °C

$[\alpha]_D^{20} = +56^\circ$  (c 1.56, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 748.7 [M+Na]^+$ ,  $764.7 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.38-7.24$  (m, 5 H, Ar), 5.78 (d, 1 H, NH), 5.35 (dd, 1 H, H-4'), 5.23 (dd, 1 H, H-3), 5.11 (dd, 1 H, H-2'), 4.98 (dd, 1 H, H-3'), 4.86 (d, 1 H, H-1), 4.70 (d, 1 H, OCH<sub>2</sub>Ph-a), 4.53 (d, 1 H, H-1'), 4.47 (d, 1 H, OCH<sub>2</sub>Ph-b), 4.37 (dd, 1 H, H-6a), 4.24 (ddd, 1 H, H-2), 4.10-4.04 (m, 3 H, H-6a, H-6'a/b), 3.87-3.82 (m, 2 H, H-5, H-5'), 3.79 (vt, 1 H, H-4), 2.13, 2.10, 2.05, 2.03, 2.02, 1.96, 1.90 (7 s, 21 H, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

$^2J_{\text{OCH}_2\text{Ph-a/b}} = 12.0$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,\text{NH}} = 9.8$ ,  $J_{2,3} = 10.2$ ,  $J_{3,4} = 9.6$ ,  $J_{4,5} = 9.8$ ,  $J_{5,6a} = 2.0$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.6$ ,  $J_{1',2'} = 7.8$ ,  $J_{2',3'} = 10.2$ ,  $J_{3',4'} = 3.6$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.92$ , 170.76, 170.49, 170.13, 169.82, 169.54, 169.16 (7 C, 7  $\text{COCH}_3$ ), 136.49 (Ar-1), 130.27 (2 C, Ar-3/5), 129.84 (Ar-4), 129.12 (2 C, Ar-2/6), 101.43 (C-1'), 96.57 (C-1), 76.55 (C-4), 71.83 (C-3), 71.24 (C-3'), 70.80 (C-5'), 70.35 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 69.38 (C-2'), 68.86 (C-5), 66.79 (C-4'), 62.08 (C-6), 60.98 (C-6'), 52.20 (C-2), 23.29, 21.09, 20.87, 20.63, 20.56, 20.41, 20.39 (7 C, 7  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

**5-Acetamido-7,9-di-O-acetyl-4,8-anhydro-1,2,3,5-tetradesoxy-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-D-glycero-D-gulo-nona-1-enitol (121) und 5-Acetamido-6,9-di-O-acetyl-4,8-anhydro-1,2,3,5-tetradesoxy-7-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-D-glycero-D-gulo-nona-1-enitol (122)**

Die Darstellung erfolgt nach **AAV 4** und **1**

15.0 mg (49.8  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 36 mg (147  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **40**, 450  $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer, 4 mg (200 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Das Gemisch der Disaccharide (5.2 mg, 12.8  $\mu\text{mol}$ , 26 %) wird nach **AAV 1** in 1 ml Pyridin aufgenommen, mit 0.5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:4.

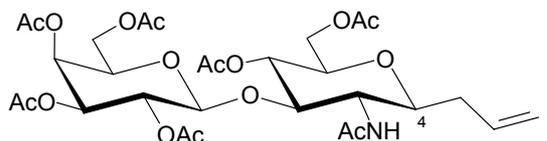
5-Acetamido-7,9-di-O-acetyl-4,8-anhydro-1,2,3,5-tetradesoxy-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-D-glycero-D-gulo-nona-1-enitol (121)

$\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{NO}_{16}$  (659.64)

Ausbeute: 4.7 mg (7.1  $\mu\text{mol}$ , 14 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -57^\circ$  (c 0.05,  $\text{CHCl}_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 682.2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $698.2$   $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.80$  ( $m_c$ , 1 H, H-2), 5.32-5.28 (m, 2 H, NH, H-4'), 5.11-5.02 (m, 3 H, H-1<sub>cis/trans</sub>, H-2'), 4.94 (dd, 1 H, H-3'), 4.85 (vt, 1 H, H-7), 4.47 (d, 1 H, H-1'), 4.18-4.06 (m, 4 H, H-9a/b, H-6'a/b), 3.99 (ddd, 1 H, H-4), 3.85 (vt, 1 H, H-5'), 3.65-3.57 (m, 2 H, H-5, H-6), 3.46 (ddd, 1 H, H-8), 2.36-2.25 (m, 2 H, H-3a/b), 2.12, 2.05, 2.04, 2.03, 2.01, 1.98, 1.94 (7 s, 21 H, 7  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$J_{3a,4} = 3.5$ ,  $J_{3b,4} = 7.4$ ,  $J_{4,5} = 10.0$ ,  $J_{6,7} = 9.5$ ,  $J_{7,8} = 9.9$ ,  $J_{8,9a} = 5.6$ ,  $J_{8,9b} = 2.0$ ,  $J_{1',2'} = 7.9$ ,  $J_{2',3'} = 10.4$ ,  $J_{3',4'} = 3.3$ ,  $J_{5',6'} = 6.6$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 171.81$ , 171.35, 171.06, 170.65, 170.58, 170.39, 169.90 (7 C, 7  $\text{COCH}_3$ ), 134.31 (C-2), 117.73 (C-1), 101.45 (C-1'), 79.51 (C-4), 77.85 (C-6), 76.85 (C-8), 71.42 (C-3'), 70.94 (C-5'), 69.91 (C-7), 69.79 (C-2'), 67.24 (C-4'), 63.22 (C-9), 61.44

(C-6'), 56.36 (C-5), 36.49 (C-3), 24.01, 21.35, 21.27, 21.20, 21.16, 21.14, 20.95 (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

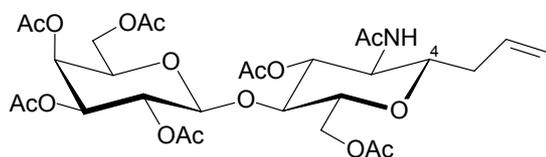
5-Acetamido-6,9-di-O-acetyl-4,8-anhydro-1,2,3,5-tetra-desoxy-7-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-D-glycero-D-gulo-nona-1-enitol (122)

C<sub>29</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>16</sub> (659.64)

Ausbeute: 3.2 mg (4.9 μmol, 10 %)

amorpher Feststoff

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -13° (c 0.05, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 682.4 [M+Na]<sup>+</sup>, 698.3 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5.78 (m<sub>c</sub>, 1 H, H-2), 5.39 (d, 1 H, NH), 5.31 (bd, 1 H, H-4'), 5.06-4.98 (m, 3 H, H-1<sub>cis/trans</sub>, H-2'), 4.93-4.89 (m, 2 H, H-6, H-3'), 4.53 (d, 1 H, H-1'), 4.40 (dd, 1 H, H-9a), 4.15-4.09 (m, 2 H, H-6'a/b), 4.04 (dd, 1 H, H-9b), 3.94 (dvt, 1 H, H-5), 3.83 (vt, 1 H, H-5'), 3.70 (vt, 1 H, H-7), 3.55 (ddd, 1 H, H-8), 3.20 (ddd, 1 H, H-4), 2.26-2.18 (m, 2 H, H-3a/b), 2.11, 2.04, 2.03, 2.02, 1.99, 1.93, 1.91 (7 s, 21 H, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

J<sub>3a,4</sub> = 3.6, J<sub>3b,4</sub> = 7.9, J<sub>4,5</sub> = 9.9, J<sub>5,NH</sub> = 9.7, J<sub>5,6</sub> = 9.9, J<sub>6,7</sub> = 9.2, J<sub>7,8</sub> = 9.1, J<sub>8,9a</sub> = 2.0, J<sub>8,9b</sub> = 4.8, <sup>2</sup>J<sub>9a/b</sub> = 14.0, J<sub>1',2'</sub> = 7.6, J<sub>3',4'</sub> = 2.0, J<sub>5',6'</sub> = 6.6 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171.79, 171.24, 171.01, 170.63, 170.48, 170.28, 169.79 (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>), 134.20 (C-2), 117.64 (C-1), 101.58 (C-1'), 79.23 (C-4), 76.94 (C-7), 76.05 (C-8), 75.23 (C-6), 71.37 (C-3'), 71.11 (C-5'), 69.59 (C-2'), 67.08 (C-4'), 62.85 (C-9), 61.25 (C-6'), 54.13 (C-5), 36.44 (C-3), 23.69, 21.24, 21.15, 21.09, 21.06, 21.03, 20.92 (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

**2-Acetamido-4,6-di-O-acetyl-1,5-anhydro-2-desoxy-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-D-glucitol (123) und 2-Acetamido-3,6-di-O-acetyl-1,5-anhydro-2-desoxy-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-D-glucitol (124)**

**a) β-Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4 und 1)**

75.3 mg (250 μmol) pNP-Gal, 513 mg (2.50 mmol, 10 eq.) **45**, 3.7 ml Inkubationspuffer, 25 mg (1.25 U) β-Galactosidase aus Rinderhoden. Das Gemisch der Disaccharide (63 mg, 171 μmol, 69 %) wird nach **AAV 1** in 4 ml Pyridin aufgenommen, mit 2 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Laufmittel: Chloroform / Methanol 45:1. Es werden 45.8 mg (73.9 μmol, 30 %) **123** und 59.2 mg (95.6 μmol, 38 %) **124** erhalten.

**b) β-Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5 und 1)**

20 mg (66.4 μmol) pNP-Gal, 41 mg (200 μmol, 3 eq.) **45**, 550 μl Inkubationspuffer, 28 μg BSA, 1.5 μl (15 U) β-Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Das Rohprodukt wird

nach **AAV 1** in 1.5 ml Pyridin aufgenommen, mit 0.75 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Laufmittel: Chloroform / Methanol 45:1. Ausbeute: 9.8 mg (15.8  $\mu\text{mol}$ , 24 %) **123**.

c)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6 und 1)

20 mg (66.4  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 41 mg (200  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **45**, 1.2 ml Inkubationspuffer, 18  $\mu\text{l}$  (378 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Das Rohprodukt wird nach **AAV 1** in 1.5 ml Pyridin aufgenommen, mit 0.75 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Laufmittel: Chloroform / Methanol 45:1. Ausbeute: 13.7 mg (22.1  $\mu\text{mol}$ , 33 %) **123**.

d) Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* (AAV 7 und 1)

20.0 mg (59.5  $\mu\text{mol}$ ) Gal-1-P, 15 mg (73  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) **45**, 11.7 ml Inkubationspuffer, 1.7 ml Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum*. Das Rohprodukt wird nach **AAV 1** in 1.5 ml Pyridin aufgenommen, mit 0.75 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Laufmittel: Chloroform / Methanol 45:1. Ausbeute: 14 mg (22.6  $\mu\text{mol}$ , 38 %) **123**.

2-Acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-1,5-anhydro-2-desoxy-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-D-glucitol (**123**)

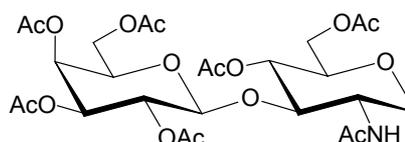
$\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{NO}_{16}$  (619.58)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -34^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ )

Ber.: C 50.40 H 6.02 N 2.26

Gef.: C 49.52 H 6.15 N 2.14



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 642.4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $658.4$   $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.90$  (d, 1 H, NH), 5.32 (bd, 1 H, H-4'), 5.06 (dd, 1 H, H-2'), 4.96 (dd, 1 H, H-3'), 4.87 (vt, 1 H, H-4), 4.61 (d, 1 H, H-1'), 4.29 (dd, 1 H, H-6a), 4.13-4.03 (m, 3 H, H-6b, H-6'a/b), 4.01-3.93 (m, 2 H, H-1<sub>eq</sub>, H-2), 3.90-3.85 (m, 2 H, H-3, H-5'), 3.69 (dt, 1 H, H-5), 3.34 (dd, 1 H, H-1<sub>ax</sub>), 2.12, 2.05, 2.04, 2.03, 2.02, 1.97, 1.93 (7 s, 21 H, 7  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^2\text{J}_{1\text{ax}/\text{eq}} = 11.2$ ,  $\text{J}_{1\text{ax},2} = 7.4$ ,  $\text{J}_{1\text{eq},2} = 4.1$ ,  $\text{J}_{2,\text{NH}} = 7.6$ ,  $\text{J}_{3,4} = 6.9$ ,  $\text{J}_{4,5} = 6.6$ ,  $\text{J}_{5,6\text{a}} = 6.9$ ,  $\text{J}_{5,6\text{b}} = 2.8$ ,  $^2\text{J}_{6\text{a}/\text{b}} = 12.2$ ,  $\text{J}_{1',2'} = 7.9$ ,  $\text{J}_{2',3'} = 10.4$ ,  $\text{J}_{3',4'} = 3.3$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 171.13$ , 170.83, 170.60, 170.52, 170.37, 169.93, 169.55 (7 C, 7  $\text{COCH}_3$ ), 101.33 (C-1'), 77.28 (C-3), 76.14 (C-5), 71.16 (C-3'), 71.12 (C-5'), 69.57 (C-2'), 69.09 (C-4), 67.25 (C-4'), 65.48 (C-1), 62.19 (C-6), 61.50 (C-6'), 50.01 (C-2), 23.72, 21.26, 21.23, 21.11, 21.04, 21.02, 20.94 (7 C, 7  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

2-Acetamido-3,6-di-O-acetyl-1,5-anhydro-2-desoxy-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-D-glucitol (124)

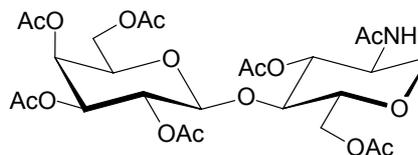
C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>16</sub> (619.58)

amorpher Feststoff

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -16° (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

Ber.: C 50.40 H 6.02 N 2.26

Gef.: C 49.32 H 6.02 N 2.20



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 642.3 [M+Na]<sup>+</sup>, 658.3 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5.93 (d, 1 H, NH), 5.31 (dd, 1 H, H-4'), 5.07 (dd, 1 H, H-2'), 4.93 (dd, 1 H, H-3'), 4.89 (vt, 1 H, H-3), 4.48 (d, 1 H, H-1'), 4.41 (dd, 1 H, H-6a), 4.16-4.11 (m, 2 H, H-1<sub>eq</sub>, H-2), 4.10-4.03 (m, 3 H, H-6b, H-6'a/b), 3.85 (vt, 1 H, H-4), 3.68 (vt, 1 H, H-5'), 3.51 (ddd, 1 H, H-5), 3.11 (dd, 1 H, H-1<sub>ax</sub>), 2.10, 2.07, 2.06, 2.01, 2.00, 1.92, 1.90 (7 s, 21 H, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>1ax/eq</sub> = 10.9, J<sub>1ax,2</sub> = 8.9, J<sub>2,NH</sub> = 7.3, J<sub>2,3</sub> = 9.2, J<sub>3,4</sub> = 8.4, J<sub>4,5</sub> = 9.7, J<sub>5,6a</sub> = 2.3, J<sub>5,6b</sub> = 4.8, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 12.0, J<sub>1',2'</sub> = 7.9, J<sub>2',3'</sub> = 10.4, J<sub>3',4'</sub> = 3.3, J<sub>4',5'</sub> = 0.8, J<sub>5',6'a</sub> = J<sub>5',6'b</sub> 8.7 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171.65, 170.54, 170.41, 170.30, 170.15, 170.09, 169.43 (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>), 101.16 (C-1'), 77.04 (C-4), 75.95 (C-5), 74.30 (C-3), 70.94 (C-3'), 70.79 (C-5'), 69.20 (C-2'), 67.46 (C-1), 66.77 (C-4'), 62.22 (C-6), 60.92 (C-6'), 50.11 (C-2), 23.20, 21.01, 20.92, 20.85, 20.81, 20.69, 20.57 (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

**Allyl-2-acetamido-2,4-dideoxy-3-O-(β-D-galactopyranosyl)-α-D-xylo-hexopyranosid (125)**

a) β-Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4)

80 mg (266 μmol) pNP-Gal, 650 mg (2.65 mmol, 10 eq.) **69**, 3.0 ml Inkubationspuffer, 25 mg (1.25 U) β-Galactosidase aus Rinderhoden. Ausbeute: 72.8 mg (179 μmol, 67 %).

b) β-Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5)

20.0 mg (66.4 μmol) pNP-Gal, 49 mg (200 μmol, 3 eq.) **69**, 600 μl Inkubationspuffer, 25 μg BSA, 1.5 μl (15 U) β-Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Ausbeute: 6.0 mg (14.7 μmol, 22 %).

c) β-Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6)

24.1 mg (80.0 μmol) pNP-Gal, 59 mg (241 μmol, 3 eq.) **69**, 1.4 ml Inkubationspuffer, 22 μl (462 mU) β-Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Ausbeute: 12.0 mg (29.5 μmol, 37 %).

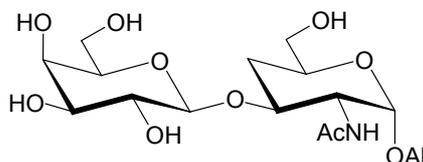
**d) Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* (AAV 7)**

14.0 mg (44.6  $\mu\text{mol}$ ) Gal-1-P, 13 mg (53  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) **69**, 8.7 ml Inkubationspuffer, 1.3 ml Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum*. Ausbeute: 7.4 mg (18.2  $\mu\text{mol}$ , 41 %).

$\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{NO}_{10}$  (407.42)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +42^\circ$  (c 0.1,  $\text{H}_2\text{O}$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 430.4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $446.3$   $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 5.97$  (dddd, 1 H, All-2), 5.35 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.26 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.95 (d, 1 H, H-1), 4.46 (d, 1 H, H-1'), 4.22 (dddd, 1 H, All-1a), 4.13 (dt, 1 H, H-3), 4.05-3.99 (m, 2 H, All-1b, H-5), 3.96 (dd, 1 H, H-2), 3.90 (bd, 1 H, H-4'), 3.77-3.73 (m, 2 H, H-6'a/b), 3.68-3.63 (m, 3 H, H-6a/b, H-5'), 3.61 (dd, 1 H, H-3'), 3.47 (dd, 1 H, H-2'), 2.24 (ddd, 1 H, H-4<sub>eq</sub>), 2.02 (s, 3 H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.60 (dd, 1 H, H-4<sub>ax</sub>) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 13.0$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.3$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 6.1$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.3$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,3} = 10.4$ ,  $J_{3,4ax} = 11.2$ ,  $J_{3,4eq} = 4.8$ ,  $^2J_{4ax/eq} = 12.7$ ,  $J_{4ax,5} = 12.0$ ,  $J_{4eq,5} = 1.8$ ,  $J_{1',2'} = 7.9$ ,  $J_{2',3'} = 9.9$ ,  $J_{3',4'} = 3.6$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 175.10$  ( $\text{COCH}_3$ ), 134.30 (All-2), 118.32 (All-3), 104.77 (C-1'), 97.45 (C-1), 75.73 (C-5'), 75.59 (C-3), 73.17 (C-3'), 71.20 (C-2'), 69.31 (C-5), 69.07 (C-4'), 68.95 (All-1), 64.22 (C-6), 61.46 (C-6'), 54.20 (C-2), 35.02 (C-4), 22.52 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

**Allyl-2,4-dideoxy-3-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-threo-hexopyranosid (126) und Allyl-2,4-dideoxy-6-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-threo-hexopyranosid (127)**

**a)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden (AAV 4)**

50 mg (166  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 250 mg (1.33 mmol, 8 eq.) **73**, 1.8 ml Inkubationspuffer, 16 mg (0.8 U)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden. Ausbeute: 8.1 mg (23  $\mu\text{mol}$ , 14 %) **126** und 18.0 mg (51.4  $\mu\text{mol}$ , 31 %) **127**.

**b)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis* (AAV 5)**

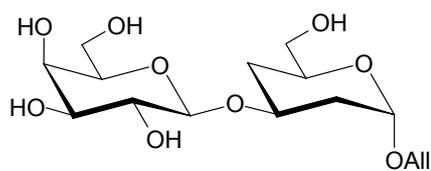
40.0 mg (133  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 75 mg (398  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **73**, 1.2 ml Inkubationspuffer, 50  $\mu\text{g}$  BSA, 3.0  $\mu\text{l}$  (30 U)  $\beta$ -Galactosidase aus *Xanthomonas manihotis*. 50 Stunden. Ausbeute: 0.9 mg (2.6  $\mu\text{mol}$ , 1.9 %) **126** und 3.8 mg (10.8  $\mu\text{mol}$ , 8.2 %) **127**.

**c)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans* (AAV 6)**

40.0 mg (133  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 75 mg (398  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) **73**, 2.4 ml Inkubationspuffer, 36  $\mu\text{l}$  (756 mU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. 4½ Stunden. Ausbeute: 1.5 mg (4.3  $\mu\text{mol}$ , 3.2 %) **126** und 5.4 mg (15.4  $\mu\text{mol}$ , 12 %) **127**.

Allyl-2,4-dideoxy-3-O-(β-D-galactopyranosyl)-α-D-threo-hexopyranosid (126)C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>9</sub> (350.37)

amorpher Feststoff

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +39° (c 0.1, MeOH)MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 373.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 389.1 [M+K]<sup>+</sup>

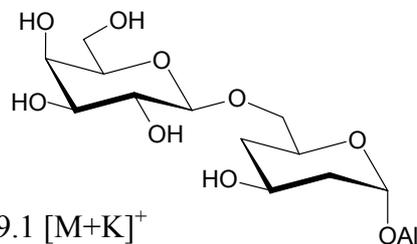
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 5.93 (dddd, 1 H, All-2), 5.29 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.14 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 5.03 (bd, 1 H, H-1), 4.34 (d, 1 H, H-1'), 4.22-4.16 (m, 2 H, All-1a, H-3), 4.01-3.93 (m, 2 H, All-1b, H-5), 3.83 (bd, 1 H, H-4'), 3.76-3.72 (m, 3 H, H-6a, H-6'a/b), 3.53-3.50 (m, 2 H, H-6b, H-3'), 3.49-3.45 (m, 2 H, H-2', H-5'), 2.19 (ddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>), 2.07 (ddd, 1 H, H-4<sub>eq</sub>), 1.55 (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 1.39 (ddd, 1 H, H-4<sub>ax</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 13.2, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.1, J<sub>All-1b,2</sub> = 6.8, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.3, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.4, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 1.3, J<sub>1,2ax</sub> = 3.1, J<sub>1,2eq</sub> = 1.0, <sup>2</sup>J<sub>2ax,2eq</sub> = 12.7, J<sub>2ax,3</sub> = 11.7, J<sub>2eq,3</sub> = 3.3, J<sub>3,4ax</sub> = 12.0, J<sub>3,4eq</sub> = 4.8, <sup>2</sup>J<sub>4ax/eq</sub> = 12.2, J<sub>4ax,5</sub> = 12.0, J<sub>4eq,5</sub> = 1.7, J<sub>1',2'</sub> = 7.6, J<sub>3',4'</sub> = 3.1, J<sub>4',5'</sub> = 1.0 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, MeOD): δ = 136.31 (All-2), 117.42 (All-3), 103.94 (C-1'), 99.05 (C-1), 77.03 (C-5'), 75.38 (C-3'), 73.03 (C-3), 72.90 (C-2'), 70.70 (C-4'), 69.48 (C-5), 69.08 (All-1), 66.60 (C-6), 62.94 (C-6'), 37.77 (C-2), 36.96 (C-4) ppm.

Allyl-2,4-dideoxy-6-O-(β-D-galactopyranosyl)-α-D-threo-hexopyranosid (127)C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>9</sub> (350.37)

amorpher Feststoff

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +14° (c 0.1, MeOH)MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 373.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 389.1 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD): δ = 5.92 (dddd, 1 H, All-2), 5.28 (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.15 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 5.01 (bd, 1 H, H-1), 4.28 (d, 1 H, H-1'), 4.16 (dddd, 1 H, All-1a), 4.08-4.00 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.94 (dddd, 1 H, All-1b), 3.85 (dd, 1 H, H-6a), 3.82 (dd, 1 H, H-4'), 3.74-3.70 (m, 2 H, H-6'a/b), 3.63 (dd, 1 H, H-6b), 3.55-3.51 (m, 2 H, H-2', H-5'), 3.45 (dd, 1 H, H-3'), 2.04 (ddd, 1 H, H-2<sub>eq</sub>), 1.97 (ddd, 1 H, H-4<sub>eq</sub>), 1.48 (ddd, 1 H, H-2<sub>ax</sub>), 1.25 (ddd, 1 H, H-4<sub>ax</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 13.2, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.1, J<sub>All-1b,2</sub> = 6.8, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.3, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.4, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 1.3, J<sub>1,2ax</sub> = 2.8, J<sub>1,2eq</sub> = 0.8, <sup>2</sup>J<sub>2ax,2eq</sub> = 12.7, J<sub>2ax,3</sub> = 12.4, J<sub>2eq,3</sub> = 4.6, J<sub>3,4ax</sub> = 12.0, J<sub>3,4eq</sub> = 4.3, <sup>2</sup>J<sub>4ax/eq</sub> = 12.0, J<sub>4ax,5</sub> = 11.9, J<sub>4eq,5</sub> = 2.0, J<sub>5,6a</sub> = 3.9, J<sub>5,6b</sub> = 6.9, <sup>2</sup>J<sub>6/b</sub> = 10.7, J<sub>1',2'</sub> = 7.4, J<sub>3',4'</sub> = 3.1, J<sub>4',5'</sub> = 0.8 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, MeOD): δ = 136.28 (All-2), 117.33 (All-3), 105.65 (C-1'), 99.06 (C-1), 77.14 (C-5'), 75.37 (C-3'), 73.54 (C-6), 72.97 (C-2'), 70.71 (C-4'), 69.47 (C-5), 69.20 (All-1), 64.51 (C-3), 62.95 (C-6'), 40.52 (C-2), 38.53 (C-4) ppm.

**(4-Nitrophenyl)- $\beta$ -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranosid-hydrat (128)**

200 mg (664  $\mu$ mol) *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid werden in 10 ml Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0 und mit 10  $\mu$ l Kupfersulfatlösung (0.5 molar), 100  $\mu$ l (100 U) Galactoseoxidase aus *Dactylium dendroides* und 180  $\mu$ l (6240 U) Katalase aus *Aspergillus niger* versetzt. Die Reaktion wird 5 Tage unter einer Sauerstoffatmosphäre gerührt und anschließend gefriergetrocknet. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel Dichlormethan / Methanol 9:1) gereinigt.

C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>9</sub> (317.25)

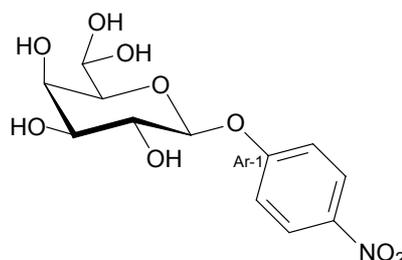
Ausbeute: 82 mg (258  $\mu$ mol, 39 %)

weißer Feststoff, Smp.: 151 °C

$[\alpha]_D^{20} = -79^\circ$  (c 0.1, H<sub>2</sub>O)

Lit.:<sup>316</sup> Smp.: 154 °C (Zers.)

$[\alpha]_D^{20} = -87^\circ$  (c 0.15, H<sub>2</sub>O)



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 8.18$  (m<sub>c</sub>, 2 H, Ar-3/5), 7.12 (m<sub>c</sub>, 2 H, Ar-2/6), 5.11 (d, 1 H, H-1), 5.06 (d, 1 H, H-6), 4.09 (bd, 1 H, H-4), 3.80 (dd, 1 H, H-2), 3.71 (dd, 1 H, H-3), 3.57 (bd, 1 H, H-5) ppm.

$J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{5,6} = 7.1$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 162.28$  (Ar-1), 142.98 (Ar-4), 126.51 (2 C, Ar-3/5), 116.90 (2 C, Ar-2/6), 100.55 (C-1), 88.49 (C-6), 77.68 (C-5), 72.80 (C-3), 70.61 (C-2), 68.45 (C-4) ppm.

**(4-Nitrophenyl-6-*O*-*p*-toluolsulfonyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (130)**

Zu einer Lösung von 1.0 g (3.32 mmol) *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid in 20 ml trockenem Pyridin werden bei -10 °C 633 mg (3.32 mmol, 1 eq.) *p*-Toluolsulfonsäure in 2 ml Pyridin zuge tropft. Nach drei Stunden rühren bei Raumtemperatur wird die Reaktion mit 60 ml Wasser versetzt und mehrmals mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan / Methanol 17:1).

C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>10</sub>S (455.44)

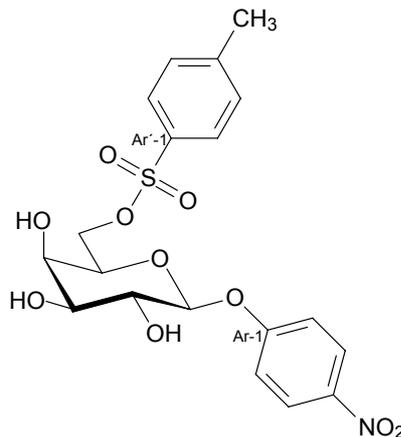
Ausbeute: 896 mg (1.97 mmol, 59 %)

weißer Feststoff, Smp.: 81 °C

$[\alpha]_D^{20} = -126^\circ$  (c 0.6, MeOH)

Ber.: C 50.11 H 4.65 N 3.08 S 7.04

Gef.: C 49.95 H 4.89 N 2.91 S 7.09



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 8.16$  (m<sub>c</sub>, 2 H, Ar-3/5), 7.72 (m<sub>c</sub>, 2 H, Ar'-2/6), 7.29 (m<sub>c</sub>, 2 H, Ar'-3/5), 7.15 (m<sub>c</sub>, 2 H, Ar-2/6), 4.98 (d, 1 H, H-1), 4.30 (dd, 1 H, H-6a), 4.26 (dd, 1 H, H-6b), 4.04 (dd, 1 H, H-5), 3.87 (bd, 1 H, H-4), 3.74 (dd, 1 H, H-2), 3.60 (dd, 1 H, H-3), 2.37 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>) ppm.

$J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.3$ ,  $J_{5,6a} = 4.3$ ,  $J_{5,6b} = 7.6$ ,  $^2J_{6a/b} = 10.7$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 164.10$  (Ar-1), 146.96 (Ar'-1), 144.28 (Ar'-4), 134.69 (Ar-4), 131.37 (2 C, Ar'-3/5), 129.40 (2 C, Ar'-2/6), 126.97 (2 C, Ar-3/5), 118.11 (2 C, Ar-2/6), 102.14 (C-1), 74.76 (C-5), 74.72 (C-3), 72.08 (C-2), 71.17 (C-6), 70.35 (C-4), 21.94 (CH<sub>3</sub>) ppm.

#### (4-Nitrophenyl)-2,3,4-tri-*O*-pivaloyl-6-*O*-*p*-toluolsulfonyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (**131**)

968 mg (2.13 mmol) **130** in 25 ml trockenem Pyridin werden im Eisbad mit 3.1 ml (25 mmol, 3.9 eq.) Pivalinsäurechlorid versetzt. Nach 38 Stunden bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Methanol abgebrochen. Der Reaktionsansatz wird mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und mit verdünnter Salzsäure, Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mit Petrolether (50-70) / Ethylacetat 4:1 säulenchromatographisch an Kieselgel.

$\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{NO}_{13}\text{S}$  (707.79)

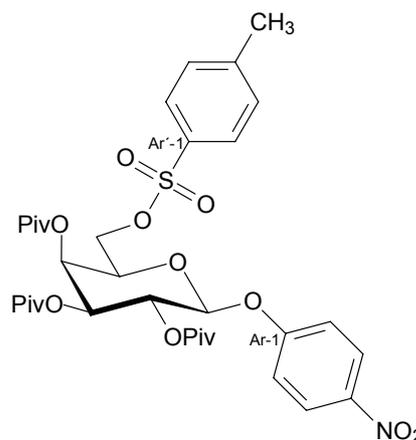
Ausbeute: 1.08 g (1.53 mmol, 72 %)

weißer Feststoff, Smp.: 194 °C (Zers.)

$[\alpha]_D^{20} = -48^\circ$  (c 0.6, CHCl<sub>3</sub>)

Ber.: C 57.70 H 6.41 N 1.98 S 4.53

Gef.: C 58.14 H 6.67 N 1.83 S 4.44



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.16$  (m<sub>c</sub>, 2 H, Ar-3/5), 7.72 (m<sub>c</sub>, 2 H, Ar'-2/6), 7.28 (m<sub>c</sub>, 2 H, Ar'-3/5), 7.04 (m<sub>c</sub>, 2 H, Ar-2/6), 5.49 (dd, 1 H, H-2), 5.45 (bd, 1 H, H-4), 5.16 (dd, 1 H, H-3), 5.13 (d, 1 H, H-1), 4.22 (dt, 1 H, H-5), 4.08 (d, 2 H, H-6a/b), 2.41 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.21, 1.11, 1.10 (3 s, 27 H, 3 C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

$J_{1,2} = 7.9$ ,  $J_{2,3} = 10.4$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{4,5} = 0.8$ ,  $J_{5,6} = 6.1$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 177.54$ , 177.15, 177.09 (3 C, 3  $\text{C}=\text{O}$  C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 161.71 (Ar-1), 145.87 (Ar'-1), 143.68 (Ar'-4), 132.75 (Ar-4), 130.39 (2 C, Ar'-3/5), 128.38 (2 C, Ar'-2/6), 126.30 (2 C, Ar-3/5), 116.90 (2 C, Ar-2/6), 99.37 (C-1), 72.54 (C-5), 70.80 (C-3), 68.41 (C-2), 66.97 (C-4), 66.90 (C-6), 39.49, 39.29, 39.21 (3 C, 3  $\text{C}=\text{O}$  C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.45 (9 C, 3  $\text{C}=\text{O}$  C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 22.05 (CH<sub>3</sub>) ppm.

**(4-Nitrophenyl)-5,6-didesoxy-2,3,4-tri-O-pivaloyl- $\alpha$ -L-arabino-hex-5-enopyranosid (132)**

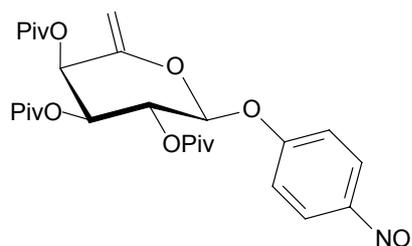
300 mg (424  $\mu$ mol) **131** und 1.37 g (2.54 mmol, 6 eq.) Tetrabutylammonium(triphenylsilyl)difluorosilicat in 7 ml trockenem Acetonitril werden für 66 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Ethylacetat versetzt und vorhandene Salze abfiltriert. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der Rückstand mehrmals mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird zur Trockne eingeeengt und der Rückstand an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 6:1).

$C_{27}H_{37}NO_{10}$  (535.59)

Ausbeute: 171 mg (319  $\mu$ mol, 75 %)

weißer Feststoff, Smp.: 127 °C (Zers.)

$[\alpha]_D^{20} = -32^\circ$  (c 0.2, DCM)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 558.4 [M+Na]^+$ ,  $574.3 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta = 8.29$  (m<sub>c</sub>, 2 H, Ar-3/5),  $7.37$  (m<sub>c</sub>, 2 H, Ar-2/6),  $5.86$  (d, 1 H, H-1),  $5.77$  (d, 1 H, H-4),  $5.52$  (dd, 1 H, H-2),  $5.35$  (dd, 1 H, H-3),  $4.89$  (d, 1 H, H-6a),  $4.84$  (d, 1 H, H-6b) 1.25, 1.22, 1.21 (3 s, 27 H, 3 C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

$J_{1,2} = 4.6$ ,  $J_{2,3} = 7.6$ ,  $J_{3,4} = 3.3$ ,  $^2J_{6a/b} = 1.5$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta = 176.45$ ,  $176.27$ ,  $176.13$  (3 C, 3  $\underline{C}OC(CH_3)_3$ ),  $160.37$  (Ar-1),  $151.43$  (C-5),  $131.32$  (Ar-4),  $127.03$  (2 C, Ar-3/5),  $118.08$  (2 C, Ar-2/6),  $101.58$  (C-6),  $99.40$  (C-1),  $69.90$  (C-2),  $69.73$  (C-3),  $68.60$  (C-4),  $39.24$ ,  $39.17$ ,  $39.13$  (3 C, 3  $\underline{C}OC(CH_3)_3$ ),  $27.79$ ,  $27.72$ ,  $27.65$  (9 C, 3  $\underline{C}OC(CH_3)_3$ ) ppm.

**(4-Nitrophenyl)-5,6-dideoxy- $\alpha$ -L-arabino-hex-5-enopyranosid (133)**

Die Entschützung erfolgt nach **AAV 2b**:

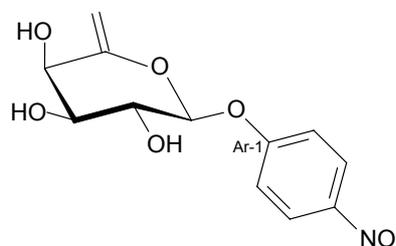
71 mg (133  $\mu$ mol) **132**, 10 ml abs. Methanol, 200  $\mu$ l 7 M NH<sub>3</sub> in Methanol, 5 Tage. Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 120:1.

$C_{12}H_{13}NO_7$  (283.24)

Ausbeute: 29.5 mg (104  $\mu$ mol, 78 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -64^\circ$  (c 0.2, MeOH)



$^1H$ -NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta = 8.24$  (m<sub>c</sub>, 2 H, Ar-3/5),  $7.28$  (m<sub>c</sub>, 2 H, Ar-2/6),  $5.30$  (d, 1 H, H-1),  $4.71$  (bs, 1 H, H-6a),  $4.68$  (bs, 1 H, H-6b),  $4.38$  (d, 1 H, H-4),  $4.07$  (dd, 1 H, H-2),  $3.77$  (dd, 1 H, H-3) ppm.

$J_{1,2} = 5.3$ ,  $J_{2,3} = 7.4$ ,  $J_{3,4} = 3.6$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 163.74$  (Ar-1), 157.59 (C-5), 144.42 (Ar-4), 127.05 (2 C, Ar-3/5), 118.23 (2 C, Ar-2/6), 102.52 (C-1), 99.14 (C-6), 73.69 (C-3), 71.79 (C-2), 70.08 (C-4) ppm.

### Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-( $\beta$ -D-fucopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosid (134)

Die Darstellung erfolgt gemäß AAV 4:

48.5 mg (170  $\mu\text{mol}$ ) *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-fucopyranosid, 444 mg (1.70 mmol, 10 eq.) **1**, 1.9 ml Inkubationspuffer, 16 mg (0.80 U)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden.

$\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{NO}_{10}$  (407.42)

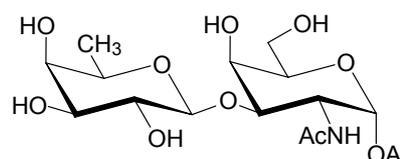
weißer Feststoff, Smp.: 173 °C

Ausbeute: 40.7 mg (99.9  $\mu\text{mol}$ , 59 %)

$[\alpha]_D^{20} = +100^\circ$  (c 0.2, MeOH)

Ber.: C 50.12 H 7.17 N 3.44

Gef.: C 48.55 H 7.37 N 3.42



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 408.3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 430.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 445.9  $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta = 5.95$  (dddd, 1 H, All-2), 5.32 (dd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.28 (dd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.87 (d, 1 H, H-1), 4.43 (dd, 1 H, H-2), 4.38 (d, 1 H, H-1'), 4.21 (dd, 1 H, All-1a), 4.14 (bd, 1 H, H-4), 4.01 (dd, 1 H, All-1b), 3.87 (dd, 1 H, H-3), 3.84 (vt, 1 H, H-5), 3.74-3.69 (m, 2 H, H-6a/b), 3.65 (q, 1 H, H-5'), 3.60 (bd, 1 H, H-4'), 3.50 (dd, 1 H, H-2'), 3.44 (dd, 1 H, H-3'), 1.97 (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>), 1.26 (d, 3 H, CH<sub>3</sub>-6) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 13.0$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.1$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 6.1$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.0$ ,  $J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{2,3} = 10.9$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{5,6a} = 5.6$ ,  $J_{5,6b} = 6.4$ ,  $J_{1',2'} = 7.4$ ,  $J_{2',3'} = 9.9$ ,  $J_{3',4'} = 3.1$ ,  $J_{5',6'} = 6.6$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 170.74$  (COCH<sub>3</sub>), 134.10 (All-2), 118.27 (All-3), 105.10 (C-1'), 96.83 (C-1), 77.64 (C-3), 75.38 (C-5'), 72.93 (C-3'), 71.08 (C-2'), 71.02 (C-5), 69.14 (C-4'), 68.99 (C-4), 68.83 (All-1), 61.58 (C-6), 61.39 (C-6'), 49.02 (C-2), 22.38 (COCH<sub>3</sub>) ppm.

### Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-( $\alpha$ -L-arabinopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosid (135)

Die Darstellung erfolgt gemäß AAV 4:

67.8 mg (250  $\mu\text{mol}$ ) *p*-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinopyranosid, 653 mg (2.50 mmol, 10 eq.) **1**, 2.8 ml Inkubationspuffer, 25 mg (1.25 U)  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden.

$\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_{10}$  (393.39)

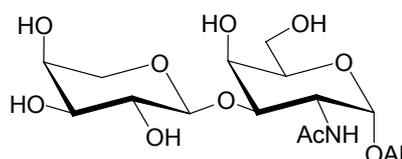
Ausbeute: 49.7 mg (126  $\mu\text{mol}$ , 51 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +138^\circ$  (c 0.5, MeOH)

Ber.: C 48.85 H 6.92 N 3.56

Gef.: C 48.53 H 7.06 N 3.68



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 394.6 [M+H]^+$ ,  $416.5 [M+Na]^+$ ,  $432.4 [M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 5.96$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.32$  (dd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.29$  (dd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $4.86$  (d, 1 H, H-1),  $4.46$  (dd, 1 H, H-2),  $4.37$  (d, 1 H, H-1'),  $4.21$  (dd, 1 H, All-1a),  $4.11$  (bd, 1 H, H-4),  $4.01$  (dd, 1 H, All-1b),  $3.87$  (dd, 1 H, H-3),  $3.85$ - $3.82$  (m, 2 H, H-5, H-5'a),  $3.80$  (m<sub>c</sub>, 1 H, H-4'),  $3.73$  (dd, 1 H, H-6a),  $3.70$  (dd, 1 H, H-6b),  $3.59$ - $3.53$  (m, 2 H, H-2', H-5'b),  $3.50$  (dd, 1 H, H-3'),  $1.96$  (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 13.2$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.3$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 6.1$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.0$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.3$ ,  $J_{1,2} = 3.8$ ,  $J_{2,3} = 10.9$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{5,6a} = 6.4$ ,  $J_{5,6b} = 5.6$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$ ,  $J_{1',2'} = 6.9$ ,  $J_{2',3'} = 9.2$ ,  $J_{3',4'} = 3.3$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 172.95$  (COCH<sub>3</sub>),  $134.45$  (All-2),  $116.56$  (All-3),  $105.27$  (C-1'),  $97.03$  (C-1),  $77.63$  (C-3),  $72.98$  (C-3'),  $71.36$  (C-2'),  $71.19$  (C-5),  $69.02$  (C-4),  $68.57$  (C-4'),  $68.18$  (All-1),  $65.91$  (C-5'),  $61.62$  (C-6),  $49.09$  (C-2),  $21.68$  (COCH<sub>3</sub>) ppm.

### Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3-O-(6,7-didesoxy-β-D-galacto-hept-6-enopyranosyl)-α-D-galactopyranosid (137)

Die Darstellung erfolgt gemäß AAV 4:

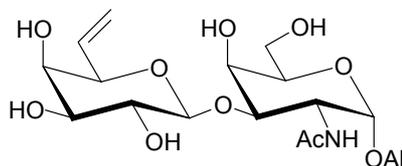
10.0 mg (33.6 μmol) 4-Nitrophenyl-6,7-didesoxy-β-D-galacto-hept-6-enopyranosid (**136**)<sup>316</sup> (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Weingarten), 87.8 mg (336 μmol, 10 eq.) **1**, 450 μl Inkubationspuffer, 3 mg (150 mU) β-Galactosidase aus Rinderhoden.

C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>10</sub> (419.43)

Ausbeute: 5.6 mg (13 μmol, 40 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +16^\circ$  (c 0.5, MeOH)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 420.3 [M+H]^+$ ,  $442.2 [M+Na]^+$ ,  $458.2 [M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 5.96$  (dddd, 1 H, All-2),  $5.92$  (ddd, 1 H, H-6'),  $5.34$  (dddd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.29$  (ddd, 1 H, H-7'<sub>cis</sub>),  $5.23$  (ddd, 1 H, H-7'<sub>trans</sub>),  $5.18$  (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $4.88$  (d, 1 H, H-1),  $4.47$ - $4.43$  (m, 2 H, H-2, H-1'),  $4.21$  (dddd, 1 H, All-1a),  $4.17$  (dd, 1 H, H-4),  $4.04$  (m<sub>c</sub>, 1 H, H-5'),  $4.00$  (dddd, 1 H, All-1b),  $3.89$  (dd, 1 H, H-3),  $3.84$  (vt, 1 H, H-5),  $3.76$  (dd, 1 H, H-4'),  $3.73$  (dd, 1 H, H-6a),  $3.69$  (dd, 1 H, H-6b),  $3.55$  (dd, 1 H, H-2'),  $3.49$  (dd, 1 H, H-3'),  $1.97$  (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>) ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 13.2$ ,  $J_{\text{All-1a,2}} = 5.1$ ,  $J_{\text{All-1b,2}} = 6.4$ ,  $J_{\text{All-2,3cis}} = 17.3$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.4$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.5$ ,  $J_{1,2} = 3.8$ ,  $J_{2,3} = 11.2$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{5,6a} = 6.6$ ,  $J_{5,6b} = 5.6$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$ ,  $J_{1',2'} = 7.1$ ,  $J_{2',3'} = 9.7$ ,  $J_{3',4'} = 3.1$ ,  $J_{4',5'} = 1.0$ ,  $J_{5',6'} = 5.1$ ,  $J_{6',7'cis} = 17.3$ ,  $J_{6',7'trans} = 10.7$ ,  $^2J_{6'cis/trans} = 1.8$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 171.59$  (COCH<sub>3</sub>),  $136.37$  (C-6'),  $135.94$  (All-2),  $118.04$ ,  $117.56$  (2 C, All-3, C-7'),  $106.70$  (C-1'),  $98.48$  (C-1),  $79.34$  (C-3),  $77.22$  (C-5'),  $75.08$  (C-3'),

73.05 (C-4'), 72.71 (C-2'), 72.61 (C-5), 70.65 (C-4), 69.65 (All-1), 63.18 (C-6), 50.61 (C-2), 23.18 (COCH<sub>3</sub>) ppm.

**Allyl-2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-α-D-galactopyranosid (138)**

Die Darstellung erfolgt in Analogie zu **AAV 4** und **1**:

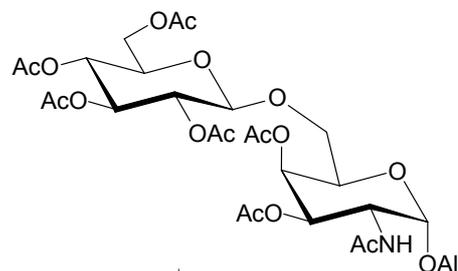
80 mg (266 μmol) *p*-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid, 695 mg (2.66 mmol, 10 eq.) **1**, 3.0 ml Inkubationspuffer, 25 mg (1.25 U) β-Galactosidase aus Rinderhoden. Nach der Gelpermeationschromatographie wird das Rohprodukt (34 mg, 80 μmol, 30 %) nach **AAV 1** in 6 ml Pyridin aufgenommen, mit 3 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Laufmittel: Chloroform / Methanol 90:1.

C<sub>29</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>17</sub> (675.64)

Ausbeute: 50 mg (74 μmol, 28 %)

amorpher Feststoff

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +43° (c 0.3, DCM)



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 698.4 [M+Na]<sup>+</sup>, 714.4 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5.85 (dddd, 1 H, All-2), 5.61 (d, 1 H, NH), 5.30 (bd, 1 H, H-4), 5.28 (dddd, 2 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.22 (dddd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 5.16 (dd, 1 H, H-3'), 5.14 (dd, 1 H, H-3), 5.04 (vt, 1 H, H-4'), 4.94 (dd, 1 H, H-2'), 4.87 (d, 1 H, H-1), 4.54 (ddd, 1 H, H-2), 4.50 (d, 1 H, H-1'), 4.24 (dd, 1 H, H-6'a), 4.15 (dddd, 1 H, All-1a), 4.11 (dd, 1 H, H-5), 4.09 (dd, 1 H, H-6'b), 3.93 (dddd, 1 H, All-1b), 3.78 (dd, 1 H, H-6a), 3.66 (ddd, 1 H, H-5'), 3.58 (dd, 1 H, H-6b), 2.12, 2.06, 1.99, 1.98, 1.96, 1.95, 1.94 (7 s, 21 H, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 12.6, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.4, J<sub>All-1b,2</sub> = 6.3, J<sub>All-2,3<sub>cis</sub></sub> = 17.0, J<sub>All-2,3<sub>trans</sub></sub> = 10.4, <sup>2</sup>J<sub>All-3<sub>cis</sub>/trans</sub> = 1.3, J<sub>1,2</sub> = 3.5, J<sub>2,NH</sub> = 9.8, J<sub>2,3</sub> = 11.4, J<sub>3,4</sub> = 3.5, J<sub>5,6a</sub> = 4.1, J<sub>5,6b</sub> = 7.6, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 10.4, J<sub>1',2'</sub> = 7.9, J<sub>2',3'</sub> = 9.8, J<sub>3',4'</sub> = 9.5, J<sub>4',5'</sub> = 10.1, J<sub>5',6'a</sub> = 4.7, J<sub>5',6'b</sub> = 2.2, <sup>2</sup>J<sub>6a'/b'</sub> = 10.4 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171.27, 171.03, 170.64, 170.46, 170.03, 169.79, 169.60 (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>), 133.63 (All-2), 118.69 (All-3), 101.14 (C-1'), 96.95 (C-1), 73.13 (C-3'), 72.29 (C-5'), 71.57 (C-2'), 68.95 (C-3), 68.74 (All-1), 68.68 (C-6), 68.64 (C-4'), 68.45 (C-4), 68.39 (C-5), 68.22 (C-6'), 48.28 (C-2), 23.73, 21.14, 21.12, 21.11, 21.04, 20.99, 20.97 (7 C, 7 COCH<sub>3</sub>) ppm.

**Allyl-2-acetamido-2-desoxy-3-O-(2-desoxy-β-D-lyxo-hexopyranosyl)-α-D-galactopyranosid (139)**

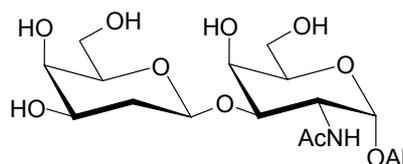
439 mg (3.00 mmol, 3 eq.) D-Galactal<sup>370</sup> (**62**) und 262 mg (1.00 mmol) **1** werden in 0.8 ml McIlvaine-Puffer (50 mM, pH 4.3) gelöst und mit 80 mg (4.0 U) β-Galactosidase aus Rinderhoden bei 37 °C behandelt. Nach drei Tagen erfolgt die Aufarbeitung analog zu **AAV 4**.

C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>10</sub> (407.42)

Ausbeute: 37 mg (91 μmol, 9 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -42^\circ$  (c 0.1, DMSO)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 430.2 [M+Na]^+$ ,  $446.2 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD/DMSO):  $\delta = 6.69$  (dddd, 1 H, All-2),  $6.07$  (dd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>),  $5.93$  (dd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>),  $5.49$  (d, 1 H, H-1),  $5.40$  (dd, 1 H, H-1'),  $5.04$  (dd, 1 H, H-2),  $4.91$  (dd, 1 H, All-1a),  $4.80$  (bd, 1 H, H-4),  $4.74$  (dd, 1 H, All-1b),  $4.56$  (dd, 1 H, H-3),  $4.47$  (vt, 1 H, H-5),  $4.38$ - $4.29$  (m, 6 H, H-6a/b, H-3', H-4', H-6'a/b),  $4.08$  (vt, 1 H, H-5'),  $2.16$  (s, 3 H, COCH<sub>3</sub>),  $1.97$ - $1.89$  (m, 2 H, H-2'<sub>ax/eq</sub>) ppm.

<sup>2</sup>J<sub>All-1a/b</sub> = 13.5, J<sub>All-1a,2</sub> = 5.1, J<sub>All-1b,2</sub> = 6.1, J<sub>All-2,3cis</sub> = 17.3, J<sub>All-2,3trans</sub> = 10.7, <sup>2</sup>J<sub>All-3cis/trans</sub> = 1.2, J<sub>1,2</sub> = 3.6, J<sub>2,3</sub> = 11.2, J<sub>3,4</sub> = 2.8, J<sub>5,6a</sub> = 5.8, J<sub>5,6b</sub> = 6.1, J<sub>1',2'ax</sub> = 7.1, J<sub>1',2'eq</sub> = 3.8, J<sub>5',6'a</sub> = 5.8, J<sub>5',6'b</sub> = 6.1 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, MeOD/DMSO):  $\delta = 171.64$  (COCH<sub>3</sub>),  $135.77$  (All-2),  $117.70$  (All-3),  $102.82$  (C-1'),  $97.87$  (C-1),  $77.71$  (C-3),  $76.76$  (C-5'),  $72.41$  (C-5),  $69.33$  (C-3'),  $69.31$  (C-4),  $68.58$  (All-1),  $67.96$  (C-4'),  $62.29$  (C-6'),  $62.16$  (C-6),  $49.66$  (C-2),  $35.85$  (C-2'),  $23.12$  (COCH<sub>3</sub>) ppm.

### (2-Chlor-4-nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosid (145)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 3:

2.88 g (7.0 mmol) **56**, 2.26 g (7.0 mmol, 1 eq.) Bu<sub>4</sub>NBr, 3.64 g (21 mmol, 3 eq.) 2-Chlor-4-nitrophenol (**140**), 50 ml DCM, 50 ml NaOH, 4 Stunden auf 35 °C erhitzen. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:1.

C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>12</sub> (503.85)

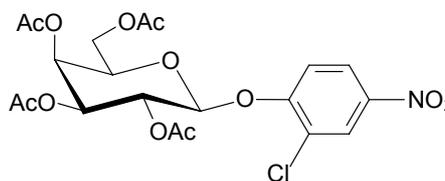
Ausbeute: 2.92 g (5.80 mmol, 83 %)

gelblicher Feststoff, Smp.: 148 °C

$[\alpha]_D^{20} = -29^\circ$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>)

Lit.:<sup>385</sup> Smp.: 147-149 °C

$[\alpha]_D^{26} = -30^\circ$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 526.1 [M+Na]^+$ ,  $542.1 [M+K]^+$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.26$  (d, 1 H, Ar-3),  $8.09$  (dd, 1 H, Ar-5),  $7.08$  (d, 1H, Ar-6),  $5.57$  (dd, 1 H, H-2),  $5.45$  (bd, 1 H, H-4),  $5.09$  (dd, 1 H, H-3),  $5.06$  (d, 1 H, H-1),  $4.21$  (dd, 1 H, H-6a),  $4.14$  (dd, 1 H, H-6b),  $4.08$  (vt, 1 H, H-5),  $2.14$ ,  $2.05$ ,  $2.04$ ,  $1.98$  (4 s, 12 H, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

$^4J_{\text{Ar-3,5}} = 2.5$ ,  $J_{\text{Ar-5,6}} = 9.2$ ,  $J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 10.7$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{5,6a} = 7.1$ ,  $J_{5,6b} = 6.1$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 169.24$ ,  $169.07$ ,  $169.03$ ,  $168.12$  (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ),  $156.34$  (Ar-1),  $142.21$  (Ar-4),  $125.22$  (Ar-3),  $123.93$  (Ar-2),  $122.56$  (Ar-5),  $115.41$  (Ar-6),  $98.97$  (C-1),  $70.71$  (C-5),  $69.35$  (C-3),  $66.86$  (C-2),  $65.63$  (C-4),  $60.35$  (C-6),  $19.70$ ,  $19.65$ ,  $19.60$ ,  $19.54$  (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### (2-Fluor-4-nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (146)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 3:

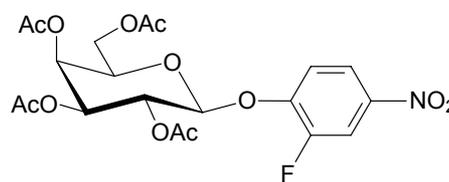
2.88 g (7.0 mmol) **56**, 2.26 g (7.0 mmol, 1 eq.)  $\text{Bu}_4\text{NBr}$ , 2.75 g (17.5 mmol, 2.5 eq.) 2-Fluor-4-nitrophenol (**141**), 50 ml DCM, 50 ml NaOH, 4 Stunden auf  $35^\circ\text{C}$  erhitzen. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 2:1.

$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{FNO}_{12}$  (487.39)

Ausbeute: 2.64 g (5.42 mmol, 77 %)

gelblicher Feststoff, Smp.:  $134^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20} = -37^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 510.1$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $526.1$   $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.02$  (dd, 1 H, Ar-5),  $8.00$  (dd, 1 H, Ar-3),  $7.28$  (dd, 1H, Ar-6),  $5.53$  (dd, 1 H, H-2),  $5.46$  (dd, 1 H, H-4),  $5.11$  (dd, 1 H, H-3),  $5.09$  (d, 1 H, H-1),  $4.21$  (dd, 1 H, H-6a),  $4.15$  (dd, 1 H, H-6b),  $4.07$  (ddd, 1 H, H-5),  $2.18$ ,  $2.08$ ,  $2.05$ ,  $2.00$  (4 s, 12 H, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^4J_{\text{Ar-3,5}} = 2.5$ ,  $J_{\text{Ar-3,F}} = 10.7$ ,  $J_{\text{Ar-5,6}} = 9.2$ ,  $^4J_{\text{Ar-6,F}} = 7.6$ ,  $J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 10.7$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{5,6a} = 7.1$ ,  $J_{5,6b} = 6.1$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.68$ ,  $170.50$ ,  $170.45$ ,  $169.66$  (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ),  $152.55$  (d, 1 C, Ar-2),  $150.20$  (d, 1 C, Ar-1),  $143.73$  (d, 1 C, Ar-4),  $120.81$  (d, 1 C, Ar-6),  $118.97$  (Ar-5),  $113.39$  (d, 1 C, Ar-3),  $100.63$  (C-1),  $72.08$  (C-5),  $70.82$  (C-3),  $68.58$  (C-2),  $67.04$  (C-4),  $61.68$  (C-6),  $21.05$ ,  $21.03$ ,  $21.00$ ,  $20.96$  (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^2J_{\text{Ar-1,F}} = 10.5$ ,  $^1J_{\text{Ar-2,F}} = 254.3$ ,  $^2J_{\text{Ar-3,F}} = 22.9$ ,  $^3J_{\text{Ar-4,F}} = 7.1$ ,  $^3J_{\text{Ar-6,F}} = 3.7$  Hz.

### (3-Fluor-4-nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (147)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 3:

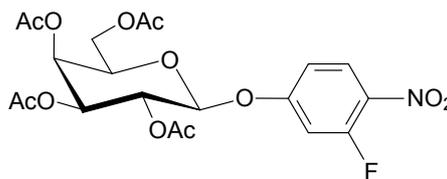
1.35 g (3.28 mmol) **56**, 1.06 g (3.28 mmol, 1 eq.)  $\text{Bu}_4\text{NBr}$ , 1.04 g (6.62 mmol, 2 eq.) 3-Fluor-4-nitrophenol (**142**), 15 ml DCM, 15 ml NaOH, 5 Stunden auf  $35^\circ\text{C}$  erhitzen. Laufmittel: Chloroform / Methanol 400:1.

$C_{20}H_{22}FNO_{12}$  (487.39)

Ausbeute: 1.22 g (2.50 mmol, 76 %)

gelblicher Feststoff, Smp.: 143 °C

$[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$  (c 0.4,  $CHCl_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 510.2 [M+Na]^+$ ,  $526.2 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 8.08$  (dd, 1 H, Ar-5), 6.89 (dd, 1 H, Ar-2), 6.85 (dd, 1H, Ar-6), 5.49 (dd, 1 H, H-2), 5.46 (bd, 1 H, H-4), 5.12 (d, 1 H, H-1), 5.11 (dd, 1 H, H-3), 4.19 (dd, 1 H, H-6a), 4.14 (dd, 1 H, H-6b), 4.10 (ddd, 1 H, H-5), 2.17, 2.07, 2.06, 2.00 (4 s, 12 H, 4  $COCH_3$ ) ppm.

$^4J_{Ar-2,6} = 2.5$ ,  $J_{Ar-2,F} = 12.2$ ,  $J_{Ar-5,6} = 9.2$ ,  $^4J_{Ar-5,F} = 8.1$ ,  $J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 10.7$ ,  $J_{3,4} = 3.6$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{5,6a} = 7.1$ ,  $J_{5,6b} = 5.1$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 170.72$ , 170.46, 170.39, 169.60 (4 C, 4  $COCH_3$ ), 161.93 (d, 1 C, Ar-1), 157.42 (d, 1 C, Ar-3), 135.42 (d, 1 C, Ar-4), 128.24 (Ar-5), 113.09 (Ar-6), 106.42 (d, 1 C, Ar-2), 99.06 (C-1), 72.19 (C-5), 70.93 (C-3), 68.53 (C-2), 67.08 (C-4), 61.91 (C-6), 21.08, 21.05, 21.01, 20.94 (4 C, 4  $COCH_3$ ) ppm.

$^3J_{Ar-1,F} = 10.2$ ,  $^2J_{Ar-2,F} = 24.7$ ,  $^1J_{Ar-3,F} = 265.5$ ,  $^2J_{Ar-4,F} = 13.2$  Hz.

### (5-Fluor-2-nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (148)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 3:

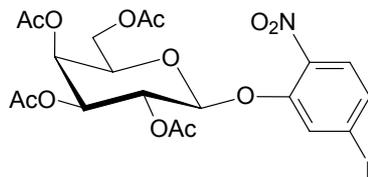
2.88 g (7.0 mmol) **56**, 2.26 g (7.0 mmol, 1 eq.)  $Bu_4NBr$ , 3.30 g (21 mmol, 3 eq.) 5-Fluor-2-nitrophenol (**143**), 50 ml DCM, 50 ml NaOH, 4 Stunden auf 35 °C erhitzen. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 2:1.

$C_{20}H_{22}FNO_{12}$  (487.39)

Ausbeute: 2.69 g (5.52 mmol, 79 %)

gelblicher Feststoff, Smp.: 159 °C

$[\alpha]_D^{20} = -21^\circ$  (c 1,  $CHCl_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 510.1 [M+Na]^+$ ,  $526.1 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 7.88$  (dd, 1 H, Ar-3), 7.12 (dd, 1 H, Ar-6), 6.89 (ddd, 1H, Ar-4), 5.55 (dd, 1 H, H-2), 5.46 (bd, 1 H, H-4), 5.09 (dd, 1 H, H-3), 5.06 (d, 1 H, H-1), 4.22 (dd, 1 H, H-6a), 4.16 (dd, 1 H, H-6b), 4.08 (ddd, 1 H, H-5), 2.17, 2.11, 2.08, 2.00 (4 s, 12 H, 4  $COCH_3$ ) ppm.

$J_{Ar-3,4} = 9.2$ ,  $^4J_{Ar-3,F} = 5.6$ ,  $^4J_{Ar-4,6} = 2.5$ ,  $J_{Ar-4,F} = 9.2$ ,  $J_{Ar-6,F} = 9.7$ ,  $J_{1,2} = 8.1$ ,  $J_{2,3} = 10.7$ ,  $J_{3,4} = 3.6$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{5,6a} = 7.6$ ,  $J_{5,6b} = 5.1$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.77, 170.53, 170.48, 169.73$  (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ), 165.38 (d, 1 C, Ar-5), 151.79 (Ar-1), 137.87 (Ar-2), 127.89 (d, 1 C, Ar-3), 111.05 (d, 1 C, Ar-4), 107.74 (d, 1 C, Ar-6), 101.06 (C-1), 72.28 (C-5), 70.90 (C-3), 68.04 (C-2), 67.18 (C-4), 62.09 (C-6), 21.05, 21.03, 21.01, 20.97 (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^3J_{\text{Ar-3,F}} = 11.0$ ,  $^2J_{\text{Ar-4,F}} = 23.3$ ,  $^1J_{\text{Ar-5,F}} = 256.4$ ,  $^2J_{\text{Ar-6,F}} = 27.3$  Hz.

### (3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (149)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 3:

2.88 g (7.0 mmol) **56**, 2.26 g (7.0 mmol, 1 eq.)  $\text{Bu}_4\text{NBr}$ , 2.90 g (21 mmol, 3 eq.) Sesamol (**144**), 50 ml DCM, 50 ml NaOH, 3 Stunden auf 35 °C erhitzen. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 3:1.

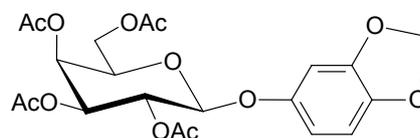
$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$  (468.41)

Ausbeute: 2.06 g (4.40 mmol, 63 %)

amorpher bräunlicher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +7^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )

Lit.:<sup>386</sup>  $[\alpha]_D^{22} = +3^\circ$  (c 2,  $\text{CHCl}_3$ )



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 491.1$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $507.1$   $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6.68$  (d, 1 H, Ar-5), 6.58 (d, 1 H, Ar-2), 6.45 (dd, 1H, Ar-6), 5.92 (s, 2 H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 5.41 ( $m_c$ , 2 H, H-2, H-4), 5.06 (dd, 1 H, H-3), 4.86 (d, 1 H, H-1), 4.21 (dd, 1 H, H-6a), 4.14 (dd, 1 H, H-6b), 3.99 (ddd, 1 H, H-5), 2.16, 2.07, 2.04, 1.99 (4 s, 12 H, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^4J_{\text{Ar-2,6}} = 2.5$ ,  $J_{\text{Ar-5,6}} = 8.4$ ,  $J_{1,2} = 7.9$ ,  $J_{2,3} = 10.4$ ,  $J_{3,4} = 3.3$ ,  $J_{4,5} = 0.8$ ,  $J_{5,6a} = 7.1$ ,  $J_{5,6b} = 6.4$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.81, 170.68, 170.55, 169.79$  (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ), 152.62 (Ar-1), 148.53 (Ar-3), 144.09 (Ar-4), 110.09 (Ar-6), 108.39 (Ar-5), 101.89 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 101.53 (C-1), 100.98 (Ar-2), 71.44 (C-5), 71.27 (C-3), 69.10 (C-2), 67.31 (C-4), 61.97 (C-6), 21.17, 21.12, 21.08, 21.00 (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### (2-Chlor-4-nitrophenyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (150)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2b:

2.78 g (5.52 mmol) **145**, 70 ml abs. Methanol, 2.5 ml  $\text{NH}_3$  in Methanol, 50 Stunden. Zur Reinigung wird aus Methanol umkristallisiert.

$C_{12}H_{14}ClNO_8$  (335.70)

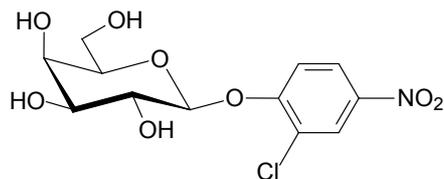
Ausbeute: 1.81 g (5.39 mmol, 98 %)

gelblicher Feststoff, Smp.: 211 °C

$[\alpha]_D^{20} = -53^\circ$  (c 1, MeOH)

Lit.:<sup>385</sup> Smp.: 213-215 °C

$[\alpha]_D^{26} = -50^\circ$  (c 0.9, MeOH)



$^1H$ -NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta = 8.31$  (d, 1 H, Ar-3), 8.18 (dd, 1 H, Ar-5), 7.45 (d, 1H, Ar-6), 5.13 (d, 1 H, H-1), 3.95-3.89 (m, 2 H, H-2, H-4), 3.80-3.73 (m, 3 H, H-5, H-6a/b), 3.62 (dd, 1 H, H-3) ppm.

$^4J_{Ar-3,5} = 2.5$ ,  $J_{Ar-5,6} = 9.2$ ,  $J_{1,2} = 8.1$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.1$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 159.86$  (Ar-1), 143.94 (Ar-4), 127.09 (Ar-3), 125.27 (Ar-2), 125.17 (Ar-5), 117.28 (Ar-6), 102.82 (C-1), 77.88 (C-5), 75.30 (C-3), 72.24 (C-4), 70.54 (C-2), 62.79 (C-6) ppm.

### (2-Fluor-4-nitrophenyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (151)

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 2b**:

2.63 g (5.39 mmol) **146**, 70 ml abs. Methanol, 2.5 ml  $NH_3$  in Methanol, 15 Stunden.

$C_{12}H_{14}FNO_8$  (319.24)

Ausbeute: 1.72 g (5.39 mmol, quant.)

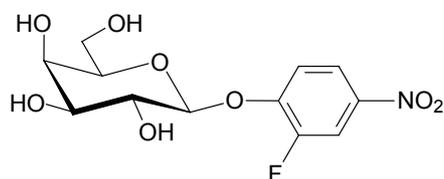
cremefarbener Feststoff, Smp.: 172 °C

$[\alpha]_D^{20} = -60^\circ$  (c 0.6, MeOH)

Ber.: C 45.15 H 4.42 N 4.39

Gef.: C 43.90 H 4.70 N 4.37

Durch die Kristallisation aus Methanol scheint etwas Lösungsmittel im Kristallgitter eingelagert zu sein.



$^1H$ -NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta = 8.09$ -8.04 (m, 2 H, Ar-3, Ar-5), 7.49 (vt, 1H, Ar-6), 5.11 (d, 1 H, H-1), 3.92 (bd, 1 H, H-4), 3.89 (dd, 1 H, H-2), 3.80 (m, 3 H, H-5, H-6a/b), 3.61 (dd, 1 H, H-3) ppm.

$J_{Ar-5,6} = 8.6$ ,  $^4J_{Ar-6,F} = 8.6$ ,  $J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.1$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 153.21$  (d, 1 C, Ar-2), 152.68 (d, 1 C, Ar-1), 143.70 (d, 1 C, Ar-4), 122.10 (d, 1 C, Ar-6), 118.32 (Ar-5), 113.58 (d, 1 C, Ar-3), 102.96 (C-1), 77.86 (C-5), 75.21 (C-3), 72.27 (C-2), 70.53 (C-4), 62.78 (C-6) ppm.

$^2J_{Ar-1,F} = 11.2$ ,  $^1J_{Ar-2,F} = 250.2$ ,  $^2J_{Ar-3,F} = 23.4$ ,  $^3J_{Ar-4,F} = 8.1$ ,  $^3J_{Ar-6,F} = 4.1$  Hz.

**(3-Fluor-4-nitrophenyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (152)**

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 2b**:

933 mg (1.91 mmol) **147**, 30 ml abs. Methanol, 0.9 ml NH<sub>3</sub> in Methanol, 28 Stunden. Zur Reinigung wird aus Methanol umkristallisiert.

C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>FNO<sub>8</sub> (319.24)

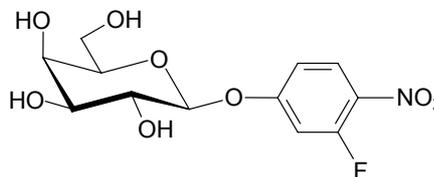
Ausbeute: 578 mg (1.81 mmol, 95 %)

cremefarbener Feststoff, Smp.: 174 °C

$[\alpha]_D^{20} = -81^\circ$  (c 0.6, MeOH)

Ber.: C 45.15 H 4.42 N 4.39

Gef.: C 44.46 H 4.76 N 4.40



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 342.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 358.0 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta = 8.12$  (vt, 1 H, Ar-5), 7.12 (dd, 1 H, Ar-2), 7.06 (dd, 1H, Ar-6), 5.02 (d, 1 H, H-1), 3.91 (bd, 1 H, H-4), 3.83 (dd, 1 H, H-2), 3.79 (m, 3 H, H-5, H-6a/b), 3.61 (dd, 1 H, H-3) ppm.

<sup>4</sup>J<sub>Ar-2,6</sub> = 2.5, J<sub>Ar-2,F</sub> = 12.7, J<sub>Ar-5,6</sub> = 9.2, <sup>4</sup>J<sub>Ar-5,F</sub> = 8.6, J<sub>1,2</sub> = 7.6, J<sub>2,3</sub> = 9.7, J<sub>3,4</sub> = 3.6 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 164.89$  (d, 1 C, Ar-1), 158.65 (d, 1 C, Ar-3), 133.41 (d, 1 C, Ar-4), 129.14 (Ar-5), 114.24 (Ar-6), 107.29 (d, 1 C, Ar-2), 102.82 (C-1), 77.81 (C-5), 75.06 (C-3), 72.28 (C-2), 70.53 (C-4), 62.81 (C-6) ppm.

<sup>3</sup>J<sub>Ar-1,F</sub> = 11.0, <sup>2</sup>J<sub>Ar-2,F</sub> = 24.5, <sup>1</sup>J<sub>Ar-3,F</sub> = 262.6, <sup>2</sup>J<sub>Ar-4,F</sub> = 6.8 Hz.

**(5-Fluor-2-nitrophenyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (153)**

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 2b**:

2.51 g (5.15 mmol) **148**, 200 ml abs. Methanol, 2.5 ml NH<sub>3</sub> in Methanol, 6 Stunden. Zur Reinigung wird aus Methanol umkristallisiert.

C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>FNO<sub>8</sub> (319.24)

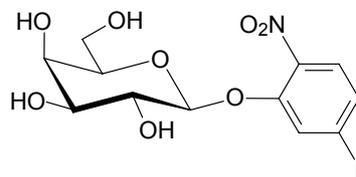
Ausbeute: 1.62 g (5.07 mmol, 98 %)

cremefarbener Feststoff, Smp.: 151 °C

$[\alpha]_D^{20} = -89^\circ$  (c 0.7, MeOH)

Ber.: C 45.15 H 4.42 N 4.39

Gef.: C 44.16 H 4.47 N 4.18



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 342.2 [M+Na]<sup>+</sup>, 358.1 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta = 7.93$  (dd, 1 H, Ar-3), 7.27 (dd, 1 H, Ar-6), 6.92 (ddd, 1H, Ar-4), 5.06 (d, 1 H, H-1), 3.90 (bd, 1 H, H-4), 3.85 (dd, 1 H, H-2), 3.80-3.72 (m, 3 H, H-5, H-6a/b), 3.59 (dd, 1 H, H-3) ppm.

$J_{\text{Ar-3,4}} = 9.2$ ,  $^4J_{\text{Ar-3,F}} = 6.1$ ,  $^4J_{\text{Ar-4,6}} = 2.5$ ,  $J_{\text{Ar-4,F}} = 7.6$ ,  $J_{\text{Ar-6,F}} = 10.7$ ,  $J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.6$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 167.02$  (d, 1 C, Ar-5), 154.07 (d, 1 C, Ar-1), 138.89 (Ar-2), 128.84 (d, 1 C, Ar-3), 110.35 (d, 1 C, Ar-4), 106.70 (d, 1 C, Ar-6), 103.40 (C-1), 77.90 (C-5), 75.23 (C-3), 72.24 (C-2), 70.53 (C-4), 62.79 (C-6) ppm.

$^3J_{\text{Ar-1,F}} = 12.2$ ,  $^3J_{\text{Ar-3,F}} = 11.4$ ,  $^2J_{\text{Ar-4,F}} = 24.1$ ,  $^1J_{\text{Ar-5,F}} = 253.3$ ,  $^2J_{\text{Ar-6,F}} = 28.1$  Hz.

### (3,4-Methylenedioxyphenyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (154)

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 2b**:

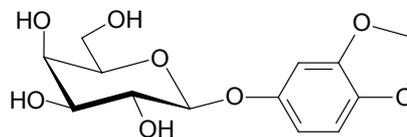
420 mg (897  $\mu\text{mol}$ ) **149**, 35 ml abs. Methanol, 0.4 ml  $\text{NH}_3$  in Methanol, 5 Stunden im Eisbad. Zur Reinigung wird aus Methanol umkristallisiert.

$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_8$  (300.27)

Ausbeute: 234 mg (779  $\mu\text{mol}$ , 87 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +19^\circ$  (c 0.3, DMSO)



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta = 6.78$  (d, 1 H, Ar-5), 6.76 (d, 1 H, Ar-2), 6.63 (dd, 1H, Ar-6), 5.96 (s, 2 H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 4.74 (d, 1 H, H-1), 3.88 (dd, 1 H, H-4), 3.76-3.73 (m, 2 H, H-6a/b), 3.72 (dd, 1 H, H-2), 3.63 (ddd, 1 H, H-5), 3.55 (dd, 1 H, H-3) ppm.

$^4J_{\text{Ar-2,6}} = 2.5$ ,  $J_{\text{Ar-5,6}} = 8.4$ ,  $J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.3$ ,  $J_{4,5} = 0.7$ ,  $J_{5,6a} = 5.6$ ,  $J_{5,6b} = 6.6$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, DMSO):  $\delta = 153.04$  (Ar-1), 147.85 (Ar-3), 142.55 (Ar-4), 108.78 (Ar-6), 107.51 (Ar-5), 102.61 (C-1), 101.05 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 99.57 (Ar-2), 75.43 (C-5), 73.29 (C-3), 70.67 (C-2), 68.53 (C-4), 60.82 (C-6) ppm.

### (2,6-Dichlor-4-nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (156)

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 3**:

2.88 g (7.0 mmol) **56**, 2.26 g (7.0 mmol, 1 eq.)  $\text{Bu}_4\text{NBr}$ , 4.37 g (21 mmol, 3 eq.) 2,6-Dichlor-4-nitrophenol (**155**), 100 ml DCM, 50 ml NaOH, 2 Tage auf  $35^\circ\text{C}$  erhitzen. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 3:2.

$\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{NO}_{12}$  (538.29)

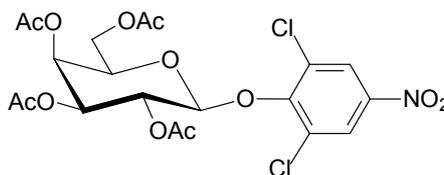
Ausbeute: 3.24 g (6.02 mmol, 86 %)

weißer Feststoff, Smp.:  $118^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20} = -0.7^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )

Ber.: C 44.63 H 3.93 N 2.60

Gef.: C 44.77 H 3.99 N 2.27



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 560.0 [M+Na]^+$ ,  $576.0 [M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.20$  (bs, 2 H, Ar-3, Ar-5), 5.56 (dd, 1 H, H-2), 5.40 (dd, 1 H, H-4), 5.25 (d, 1 H, H-1), 5.09 (dd, 1 H, H-3), 4.09 (dd, 1 H, H-6a), 4.04 (dd, 1 H, H-6b), 3.85 (dt, 1 H, H-5), 2.19, 2.10, 2.00, 1.96 (4 s, 12 H, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$J_{1,2} = 8.1$ ,  $J_{2,3} = 10.7$ ,  $J_{3,4} = 3.6$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{5,6a} = 7.1$ ,  $J_{5,6b} = 6.6$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.63$ , 170.47, 170.13, 169.78 (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ), 153.62 (Ar-1), 144.74 (Ar-4), 131.24 (2 C, Ar-2, Ar-6), 124.86 (2 C, Ar-3, Ar-5), 101.80 (C-1), 71.79 (C-5), 70.98 (C-3), 69.29 (C-2), 66.97 (C-4), 61.06 (C-6), 21.25, 21.14, 21.08, 20.96 (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### 1,2-Di-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-4-nitrobenzol (**159**)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 3:

2.88 g (7.0 mmol) **56**, 2.26 g (7.0 mmol, 1 eq.)  $\text{Bu}_4\text{NBr}$ , 3.26 g (21 mmol, 3 eq.) 4-Nitrobenzocatechin (**158**), 50 ml DCM, 50 ml NaOH, 4 Stunden auf 35 °C erhitzen. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 2:1.

$\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{NO}_{22}$  (815.69)

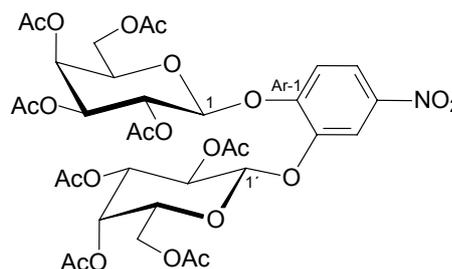
Ausbeute: 2.51 g (3.08 mmol, 44 %)

weißer Feststoff, Smp.: 211 °C (Zers.)

$[\alpha]_D^{20} = -32^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )

Ber.: C 50.06 H 5.07 N 1.72

Gef.: C 48.49 H 5.01 N 1.88



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 838.6 [M+Na]^+$ ,  $854.5 [M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.99$  (d, 1 H, Ar-3), 7.90 (dd, 1 H, Ar-5), 7.11 (d, 1 H, Ar-6), 5.44-5.42 (m, 2 H, H-4, H-4'), 5.40 (dd, 1 H, H-2'), 5.38 (dd, 1 H, H-2), 5.16 (d, 1 H, H-1'), 5.10 (d, 1 H, H-1), 5.08 (dd, 1 H, H-3), 5.07 (dd, 1 H, H-3'), 4.17-4.06 (m, 5 H, H-6a/b, H-5', H-6'a/b), 4.04 (vt, 1 H, H-5), 2.13, 2.12, 2.05, 2.04, 2.02, 2.00, 1.95, 1.94 (8 s, 24 H, 8  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

$^4J_{\text{Ar-3,5}} = 2.5$ ,  $J_{\text{Ar-5,6}} = 9.2$ ,  $J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 10.7$ ,  $J_{3,4} = 3.6$ ,  $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 7.1$ ,  $J_{1',2'} = 7.6$ ,  $J_{2',3'} = 10.2$ ,  $J_{3',4'} = 3.6$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 169.65$ , 169.21, 169.13, 169.05, 168.99, 168.37, 167.84, 167.76 (8 C, 8  $\text{COCH}_3$ ), 150.76 (Ar-1), 145.75 (Ar-2), 142.20 (Ar-4), 118.45 (Ar-5), 115.77 (Ar-6), 112.11 (Ar-3), 98.96 (C-1), 98.37 (C-1'), 70.97 (C-5'), 70.61 (C-5), 69.68 (C-3), 69.66 (C-3'), 67.48 (C-2), 67.40 (C-2'), 66.14 (C-4'), 65.86 (C-4), 60.91 (C-6'), 60.27 (C-6), 19.64, 19.61, 19.60, 19.58, 19.56, 19.55, 19.53, 19.52 (8 C, 8  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

**(3-Acetoxymethyl-4-nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (161) und (3-Hydroxymethyl-4-nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (162)**

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 3:

2.88 g (7.0 mmol, 2 eq.) **56**, 1.13 g (3.5 mmol, 1 eq.) Bu<sub>4</sub>NBr, 592 mg (3.5 mmol) 5-Hydroxy-2-nitrobenzylalkohol (**160**), 35 ml DCM, 25 ml NaOH, 24 Stunden auf 35 °C erhitzen. Laufmittel: Dichlormethan / Aceton 30:1.

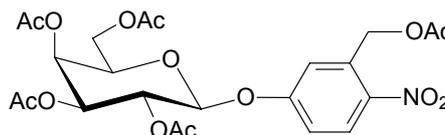
**(3-Acetoxymethyl-4-nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (161)**

C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>14</sub> (541.47)

Ausbeute: 566 mg (1.05 mmol, 30 %)

weißer Feststoff, Smp.: 137 °C

$[\alpha]_D^{20} = +7.4^\circ$  (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 564.3$  [M+Na]<sup>+</sup>, 580.2 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.15$  (d, 1 H, Ar-5), 7.13 (d, 1 H, Ar-2), 7.00 (dd, 1 H, Ar-6), 5.54-5.46 (m, 3 H, Ar-CH<sub>2</sub>, H-2), 5.45 (dd, 1 H, H-4), 5.17 (d, 1 H, H-1), 5.12 (dd, 1 H, H-3), 4.19 (dd, 1 H, H-6a), 4.14 (dd, 1 H, H-6b), 4.10 (dt, 1 H, H-5), 2.17, 2.16, 2.05, 2.04, 2.00 (5 s, 15 H, 5 COCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>4</sup>J<sub>Ar-2,6</sub> = 2.6, J<sub>Ar-5,6</sub> = 9.2, J<sub>1,2</sub> = 7.9, J<sub>2,3</sub> = 10.4, J<sub>3,4</sub> = 3.6, J<sub>4,5</sub> = 1.0, J<sub>5,6a</sub> = 5.6, J<sub>5,6b</sub> = 6.9, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 9.7 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 169.27$ , 169.18, 169.07, 169.02, 168.27 (5 C, 5 COCH<sub>3</sub>), 159.35 (Ar-1), 141.06 (Ar-4), 134.50 (Ar-3), 126.70 (Ar-5), 115.49 (Ar-2), 114.11 (Ar-6), 97.45 (C-1), 70.45 (C-5), 69.59 (C-3), 67.27 (C-2), 65.65 (C-4), 61.92 (Ar-CH<sub>2</sub>), 60.28 (C-6), 19.81, 19.73, 19.69, 19.60, 19.52 (5 C, 5 COCH<sub>3</sub>) ppm.

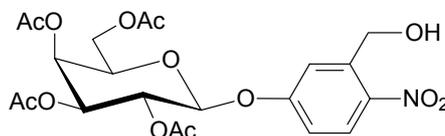
**(3-Hydroxymethyl-4-nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (162)**

C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>13</sub> (499.43)

Ausbeute: 204 mg (408  $\mu$ mol, 12 %)

weißer Feststoff, Smp.: 156 °C

$[\alpha]_D^{20} = -3.5^\circ$  (c 0.25, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 522.1$  [M+Na]<sup>+</sup>, 538.0 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.14$  (d, 1 H, Ar-5), 7.37 (d, 1 H, Ar-2), 6.98 (dd, 1 H, Ar-6), 5.50 (dd, 1 H, H-2), 5.46 (bd, 1 H, H-4), 5.19 (d, 1 H, H-1), 5.12 (dd, 1 H, H-3), 4.99 (s, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>), 4.20-4.10 (m, 3 H, H-5, H-6a/b), 2.17, 2.06, 2.05, 2.00 (4 s, 12 H, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>4</sup>J<sub>Ar-2,6</sub> = 2.8, J<sub>Ar-5,6</sub> = 9.2, J<sub>1,2</sub> = 7.9, J<sub>2,3</sub> = 10.4, J<sub>3,4</sub> = 3.3 Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 169.49, 169.16, 169.06, 168.32$  (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ), 159.74 (Ar-1), 140.94 (Ar-4), 139.56 (Ar-3), 126.60 (Ar-5), 115.32 (Ar-2), 114.50 (Ar-6), 97.49 (C-1), 70.54 (C-5), 69.62 (C-3), 67.31 (C-2), 65.83 (C-4), 61.40 (Ar- $\text{CH}_2$ ), 60.49 (C-6), 19.69, 19.62, 19.58, 19.54 (4 C, 4  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### (3-Hydroxymethyl-4-nitrophenyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (163)

a) Aus **161**: Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 2b**:

444 mg (820  $\mu\text{mol}$ ) **161**, 25 ml abs. Methanol, 0.4 ml  $\text{NH}_3$  in Methanol, 18 Stunden. Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 6:1. Ausbeute: 252 mg (761  $\mu\text{mol}$ , 93 %).

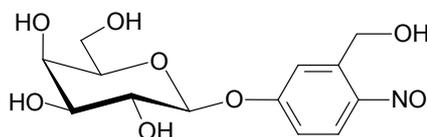
b) Aus **162**: Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 2b**:

153 mg (306  $\mu\text{mol}$ ) **162**, 10 ml abs. Methanol, 150  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_3$  in Methanol, 18 Stunden. Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 6:1. Ausbeute: 97 mg (293  $\mu\text{mol}$ , 96 %).

$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_9$  (331.28)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -11^\circ$  (c 0.13, MeOH)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 354.1$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $370.1$   $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta = 8.14$  (d, 1 H, Ar-5), 7.54 (d, 1 H, Ar-2), 7.15 (dd, 1 H, Ar-6), 5.03 (d, 1 H, H-1), 4.96 (s, 2 H, Ar- $\text{CH}_2$ ), 3.93 (bd, 1 H, H-4), 3.85 (dd, 1 H, H-2), 3.80-3.74 (m, 3 H, H-5, H-6a/b), 3.61 (dd, 1 H, H-3) ppm.

$^4J_{\text{Ar-2,6}} = 2.8$ ,  $J_{\text{Ar-5,6}} = 9.2$ ,  $J_{1,2} = 7.9$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.3$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz, MEOD):  $\delta = 163.73$  (Ar-1), 143.02 (Ar-4), 142.14 (Ar-3), 128.68 (Ar-5), 116.99 (Ar-2), 116.26 (Ar-6), 102.72 (C-1), 77.64 (C-5), 75.17 (C-3), 72.45 (C-2), 70.53 (C-4), 62.75 (C-6), 62.60 (Ar- $\text{CH}_2$ ) ppm.

### Methyl-5-nitro-salicylat (166)

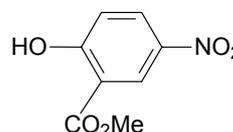
9.16 g (50.0 mmol) 5-Nitrosalicylsäure werden mit 4 g Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ ) eine Woche in 80 ml Methanol gerührt. Der Ionenaustauscher wird abfiltriert und der Reaktionseinsatz zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

$\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_5$  (197.15)

Ausbeute: 8.39 g (42.6 mmol, 85 %)

gelbliche Nadeln, Smp.:  $116^\circ\text{C}$

Lit.:<sup>387</sup> Smp.:  $117^\circ\text{C}$



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta = 8.72$  (d, 1 H, Ar-6), 8.36 (dd, 1 H, Ar-4), 7.13 (d, 1 H, Ar-3), 4.03 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.

$J_{\text{Ar-3,4}} = 9.2$ ,  $^4J_{\text{Ar-4,6}} = 2.5$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, DMSO):  $\delta = 170.22$  ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 167.15 (Ar-2), 141.39 (Ar-5), 131.42 (Ar-4), 127.44 (Ar-6), 119.64 (Ar-3), 113.84 (Ar-1), 53.63 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ) ppm.

### Methyl-4-hydroxy-3-nitro-benzoat (169)

Die Darstellung erfolgt analog zu Verbindung **166**:

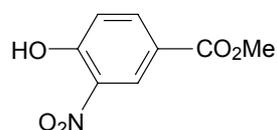
11.0 g (60.1 mmol) 4-Hydroxy-3-nitrobenzoesäure, 5 g Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ ), 100 ml Methanol, eine Woche.

$\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_5$  (197.15)

Ausbeute: 11.0 g (55.8 mmol, 93 %)

gelbe rhombisch Kristalle, Smp.: 76 °C

Lit.:<sup>388</sup> Smp.: 74 °C



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 8.62$  (d, 1 H, Ar-2), 8.15 (dd, 1 H, Ar-6), 7.20 (d, 1 H, Ar-5), 3.91 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.

$^4J_{\text{Ar-2,6}} = 2.6$ ,  $J_{\text{Ar-5,6}} = 9.2$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 166.80$  ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 158.87 (Ar-4), 138.09 (Ar-6), 136.46 (Ar-3), 128.56 (Ar-2), 123.65 (Ar-1), 121.53 (Ar-5), 53.32 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ) ppm.

### (2-Formyl-4-nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (170)

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 3**:

2.88 g (7.0 mmol) **56**, 2.26 g (7.0 mmol, 1 eq.)  $\text{Bu}_4\text{NBr}$ , 2.92 g (17.5 mmol, 2.5 eq.) 5-Nitrosalicylaldehyd (**164**), 50 ml DCM, 50 ml NaOH, 7½ Stunden auf 35 °C erhitzen.  
Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 2:1.

$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_{13}$  (497.41)

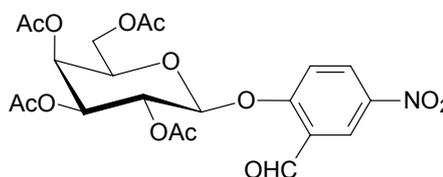
Ausbeute: 2.05 g (4.12 mmol, 59 %)

weiße Kristalle, Smp.: 178 °C

$[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$  (c 0.5,  $\text{CHCl}_3$ )

Ber.: C 50.71 H 4.66 N 2.82

Gef.: C 50.81 H 4.86 N 2.98



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 520.1$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 536.1  $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 10.32$  (s, 1 H, CHO), 8.70 (d, 1 H, Ar-3), 8.40 (dd, 1 H, Ar-5), 7.23 (d, 1H, Ar-6), 5.60 (dd, 1 H, H-2), 5.49 (bd, 1 H, H-4), 5.26 (d, 1 H, H-1), 5.16 (dd, 1 H,

H-3), 4.22 (dd, 1 H, H-6a), 4.18-4.13 (m, 2 H, H-5, H-6b), 2.19, 2.06, 2.05, 2.01 (4 s, 12 H, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>4</sup>J<sub>Ar-3,5</sub> = 3.1, J<sub>Ar-5,6</sub> = 9.2, J<sub>1,2</sub> = 8.1, J<sub>2,3</sub> = 10.7, J<sub>3,4</sub> = 3.6, J<sub>5,6a</sub> = 9.2, <sup>2</sup>J<sub>6a/b</sub> = 12.7 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 185.95 (CHO), 169.21, 169.00, 168.94, 168.24 (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>), 160.99 (Ar-1), 142.35 (Ar-4), 129.09 (Ar-5), 124.81 (Ar-2), 123.45 (Ar-3), 114.71 (Ar-6), 97.83 (C-1), 70.79 (C-5), 69.22 (C-3), 67.03 (C-2), 65.50 (C-4), 60.23 (C-6), 19.63, 19.59, 19.54, 19.51 (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

### (2-Methoxycarbonyl-4-nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosid (171)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 3:

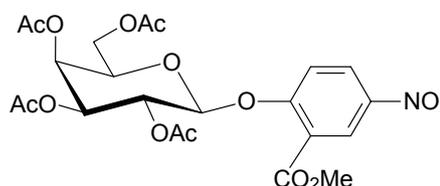
2.88 g (7.0 mmol) **56**, 2.26 g (7.0 mmol, 1 eq.) Bu<sub>4</sub>NBr, 4.14 g (21 mmol, 2.5 eq.) **166**, 50 ml DCM, 50 ml NaOH, 18 Stunden auf 35 °C erhitzen. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 3:2.

C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>14</sub> (527.44)

Ausbeute: 2.65 g (5.02 mmol, 72 %)

weiße Kristalle, Smp.: 192 °C (Zers.)

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -42° (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 550.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 566.0 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.65 (d, 1 H, Ar-3), 8.31 (dd, 1 H, Ar-5), 7.23 (d, 1H, Ar-6), 5.59 (dd, 1 H, H-2), 5.47 (bd, 1 H, H-4), 5.15 (d, 1 H, H-1), 5.10 (dd, 1 H, H-3), 4.23-4.16 (m, 3 H, H-5, H-6a/b), 3.89 (s, 3 H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.18, 2.07, 2.06, 2.01 (4 s, 12 H, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>4</sup>J<sub>Ar-3,5</sub> = 3.1, J<sub>Ar-5,6</sub> = 9.2, J<sub>1,2</sub> = 7.6, J<sub>2,3</sub> = 10.2, J<sub>3,4</sub> = 3.1 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 169.51, 169.44, 169.37, 169.22 (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>), 164.07 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 158.97 (Ar-1), 149.56 (Ar-4), 134.02 (Ar-5), 128.63 (Ar-6), 126.11 (Ar-3), 119.51 (Ar-2), 99.19 (C-1), 70.72 (C-5), 69.40 (C-3), 66.65 (C-2), 65.63 (C-4), 60.39 (C-6), 51.68 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 19.64, 19.59, 19.55, 19.53 (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

### (2-Acetoxyethyl-4-nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosid (172)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 3:

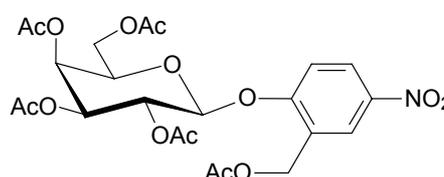
656 mg (1.6 mmol, 3 eq.) **56**, 172 mg (534 μmol, 1 eq.) Bu<sub>4</sub>NBr, 90 mg (532 μmol) 2-Hydroxy-5-nitrobenzylalkohol<sup>329</sup> (**167**), 10 ml DCM, 10 ml NaOH, 6 Stunden auf 35 °C erhitzen. Laufmittel: Dichlormethan / Aceton 30:1.

C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>14</sub> (541.47)

Ausbeute: 153 mg (283 μmol, 53 %)

amorpher Feststoff

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +13° (c 0.11, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 564.2 [M+Na]^+$ ,  $580.2 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 8.22$  (d, 1 H, Ar-3),  $8.16$  (dd, 1 H, Ar-5),  $7.13$  (d, 1 H, Ar-6),  $5.54$  (dd, 1 H, H-2),  $5.47$  (dd, 1 H, H-4),  $5.18$  (d, 1 H, Ar-CH<sub>2</sub>-a),  $5.15$  (d, 1 H, H-1),  $5.13$  (dd, 1 H, H-3),  $5.04$  (d, 1 H, Ar-CH<sub>2</sub>-b),  $4.22$  (dd, 1 H, H-6a),  $4.15$  (dd, 1 H, H-6b),  $4.11$  (dt, 1 H, H-5),  $2.18$ ,  $2.15$ ,  $2.09$ ,  $2.06$ ,  $2.01$  (5 s, 15 H, 5 COCH<sub>3</sub>) ppm.

$^4J_{Ar-3,5} = 2.8$ ,  $J_{Ar-5,6} = 9.2$ ,  $^2J_{Ar-CH_2-a/b} = 14.2$ ,  $J_{1,2} = 7.9$ ,  $J_{2,3} = 10.4$ ,  $J_{3,4} = 3.6$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{5,6a} = 6.9$ ,  $J_{5,6b} = 5.6$ ,  $^2J_{6a/b} = 10.9$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 170.50$ ,  $170.41$ ,  $170.23$ ,  $169.92$ ,  $169.74$  (5 C, 5 COCH<sub>3</sub>),  $158.73$  (Ar-1),  $143.64$  (Ar-4),  $127.99$  (Ar-2),  $125.34$  (Ar-5),  $124.65$  (Ar-3),  $114.78$  (Ar-6),  $99.46$  (C-1),  $72.04$  (C-5),  $70.83$  (C-3),  $68.52$  (C-2),  $67.08$  (C-4),  $61.76$  (C-6),  $60.25$  (Ar-CH<sub>2</sub>),  $21.28$ ,  $21.17$ ,  $21.06$ ,  $21.04$ ,  $20.94$  (5 C, 5 COCH<sub>3</sub>) ppm.

#### (4-Methylcarboxylat-2-nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (173)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 3:

2.88 g (7.0 mmol) **56**, 2.26 g (7.0 mmol, 1 eq.) Bu<sub>4</sub>NBr, 4.14 g (21 mmol, 2.5 eq.) **169**, 50 ml DCM, 50 ml NaOH, 6½ Stunden auf 35 °C erhitzen. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:1.

C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>14</sub> (527.44)

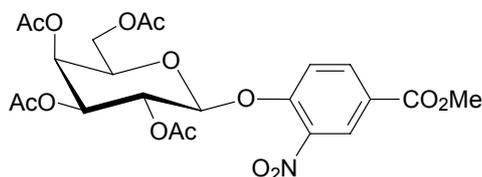
Ausbeute: 2.47 g (4.68 mmol, 67 %)

weiße Kristalle, Smp.: 163 °C

$[\alpha]_D^{20} = +57^\circ$  (c 0.5,  $CHCl_3$ )

Ber.: C 50.10 H 4.78 N 2.66

Gef.: C 50.25 H 4.80 N 2.29



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 550.1 [M+Na]^+$ ,  $566.1 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 8.43$  (d, 1 H, Ar-3),  $8.17$  (dd, 1 H, Ar-5),  $7.37$  (d, 1 H, Ar-6),  $5.55$  (dd, 1 H, H-2),  $5.46$  (dd, 1 H, H-4),  $5.15$  (d, 1 H, H-1),  $5.10$  (dd, 1 H, H-3),  $4.23$  (dd, 1 H, H-6a),  $4.16$  (dd, 1 H, H-6b),  $4.10$  (ddd, 1 H, H-5),  $3.93$  (s, 3 H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  $2.17$ ,  $2.11$ ,  $2.06$ ,  $2.00$  (4 s, 12 H, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

$^4J_{Ar-3,5} = 2.0$ ,  $J_{Ar-5,6} = 9.2$ ,  $J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 10.2$ ,  $J_{3,4} = 3.6$ ,  $J_{4,5} = 1.0$ ,  $J_{5,6a} = 7.1$ ,  $J_{5,6b} = 5.6$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.2$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 169.24$ ,  $169.08$ ,  $168.91$ ,  $168.19$  (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>),  $163.53$  (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  $151.45$  (Ar-1),  $139.78$  (Ar-2),  $133.67$  (Ar-5),  $125.70$  (Ar-3),  $124.61$  (Ar-4),  $117.35$  (Ar-6),  $99.19$  (C-1),  $70.72$  (C-5),  $69.40$  (C-3),  $66.65$  (C-2),  $65.63$  (C-4),  $60.39$  (C-6),  $51.68$  (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  $19.64$ ,  $19.59$ ,  $19.55$ ,  $19.53$  (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

**(2-Formyl-4-nitrophenyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (174)**

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 2b**:

1.98 g (3.98 mmol) **170**, 150 ml abs. Methanol, 2.0 ml  $\text{NH}_3$  in Methanol, 5 Stunden. Zur Reinigung wird aus Methanol umkristallisiert.

$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_9$  (329.26)

Ausbeute: 1.20 g (3.64 mmol, 92 %)

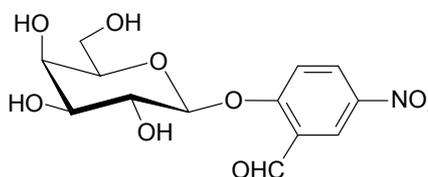
cremefarbener Feststoff, Smp.: 203 °C

$[\alpha]_D^{20} = -60^\circ$  (c 0.5, MeOH)

Ber.: C 47.42 H 4.59 N 4.25

Gef.: C 45.74 H 4.85 N 4.77

Durch die Kristallisation aus Methanol scheint etwas Lösungsmittel im Kristallgitter eingelagert zu sein.



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 10.52$  (s, 1 H, CHO), 8.44 (d, 1 H, Ar-3), 8.21 (dd, 1 H, Ar-5), 7.39 (d, 1H, Ar-6), 5.19 (d, 1 H, H-1), 3.94-3.89 (m, 2 H, H-2, H-4), 3.81-3.74 (m, 1 H, H-5, H-6a/b), 3.61 (dd, 1 H, H-3) ppm.

$^4\text{J}_{\text{Ar-3,5}} = 2.8$ ,  $\text{J}_{\text{Ar-5,6}} = 9.2$ ,  $\text{J}_{1,2} = 7.6$ ,  $\text{J}_{2,3} = 9.7$ ,  $\text{J}_{3,4} = 3.6$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 189.81$  (CHO), 161.34 (Ar-1), 147.02 (Ar-4), 131.78 (Ar-5), 126.67 (Ar-3), 124.60 (Ar-2), 117.01 (Ar-6), 103.09 (C-1), 77.82 (C-5), 75.09 (C-3), 72.31 (C-4), 70.53 (C-2), 62.83 (C-6) ppm.

**(2-Methoxycarbonyl-4-nitrophenyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (175)****a) Durch Entschützung von **171****

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 2b**:

2.30 g (4.36 mmol) **171**, 130 ml abs. Methanol, 8 ml  $\text{NH}_3$  in Methanol, 12 Stunden. Zur Reinigung wird aus Methanol umkristallisiert. Ausbeute: 1.42 g (3.95 mmol, 91 %).

**b) Durch Zersetzung von **180** bei der Deacetylierung**

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 2b**:

1.46 g (1.73 mmol) **180**, 50 ml abs. Methanol, 1.5 ml  $\text{NH}_3$  in Methanol, 28 Stunden im Eisbad. Zur Reinigung wird aus Methanol umkristallisiert. Ausbeute: 430 mg (1.20 mmol, 69 %).

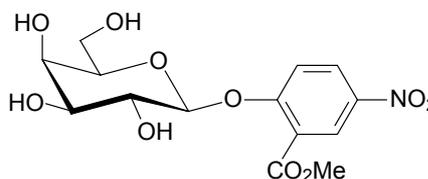
$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_{10}$  (359.29)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -61^\circ$  (c 0.4, MeOH)

Ber.: C 46.80 H 4.77 N 3.90

Gef.: C 46.65 H 4.74 N 4.03



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 382.1 [M+Na]^+$ ,  $398.0 [M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta = 8.62$  (d, 1 H, Ar-3),  $8.40$  (dd, 1 H, Ar-5),  $7.53$  (d, 1H, Ar-6),  $5.09$  (d, 1 H, H-1),  $3.94$  (s, 3 H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ),  $3.91$  (bd, 1 H, H-4),  $3.90$  (dd, 1 H, H-2),  $3.81$ - $3.74$  (m, 3 H, H-5, H-6a/b),  $3.62$  (dd, 1 H, H-3) ppm.

$^4J_{\text{Ar-3,5}} = 3.1$ ,  $J_{\text{Ar-5,6}} = 9.2$ ,  $J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.6$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, DMSO):  $\delta = 164.77$  ( $\underline{\text{CO}}_2\text{CH}_3$ ),  $161.02$  (Ar-1),  $141.18$  (Ar-4),  $128.85$  (Ar-5),  $126.61$  (Ar-3),  $121.68$  (Ar-2),  $116.69$  (Ar-6),  $101.04$  (C-1),  $76.08$  (C-2),  $73.32$  (C-3),  $70.27$  (C-5),  $68.17$  (C-4),  $60.48$  (C-6),  $52.95$  ( $\text{CO}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ) ppm.

### (2-Carboxy-4-nitrophenyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (176)

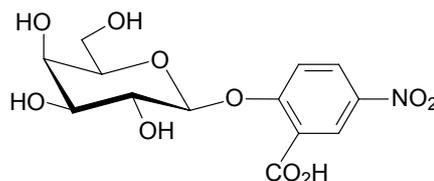
179 mg (498  $\mu\text{mol}$ ) **175** werden in 6 ml eines Wasser-Methanol-Gemisches (3:1) gelöst und mit 1 ml einer 1 molaren Natronlauge versetzt. Nach 7 Stunden wird mit Amberlitter IR-120 ( $\text{H}^+$ ) neutralisiert und das Lösungsmittel wiederholt mit Methanol codestilliert. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 2:1) gereinigt.

$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_{10}$  (345.26)

Ausbeute: 136 mg (394  $\mu\text{mol}$ , 79 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -31^\circ$  (c 0.1, MeOH)



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 8.61$  (d, 1 H, Ar-3),  $8.43$  (dd, 1 H, Ar-5),  $7.60$  (d, 1H, Ar-6),  $5.11$  (d, 1 H, H-1),  $3.92$  (bd, 1 H, H-4),  $3.89$  (dd, 1 H, H-2),  $3.83$ - $3.76$  (m, 3 H, H-5, H-6a/b),  $3.67$  (dd, 1 H, H-3) ppm.

$^4J_{\text{Ar-3,5}} = 2.8$ ,  $J_{\text{Ar-5,6}} = 9.2$ ,  $J_{1,2} = 7.9$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.1$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 169.93$  ( $\underline{\text{CO}}_2\text{H}$ ),  $160.86$  (Ar-1),  $141.62$  (Ar-4),  $128.52$  (Ar-5),  $127.09$  (Ar-3),  $117.34$  (Ar-2),  $116.47$  (Ar-6),  $102.13$  (C-1),  $75.89$  (C-2),  $73.27$  (C-3),  $70.30$  (C-5),  $68.14$  (C-4),  $60.49$  (C-6) ppm.

### (2-Hydroxymethyl-4-nitrophenyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (177)

a) Aus **172**: Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 2b**:

105 mg (194  $\mu\text{mol}$ ) **172**, 5 ml abs. Methanol, 100  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_3$  in Methanol, 12 Stunden. Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 6:1. Ausbeute: 54 mg (163  $\mu\text{mol}$ , 84 %).

b) Durch Reduktion von **175**:

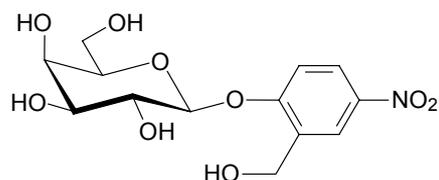
500 mg (1.39 mmol) **175** werden in 35 ml Ethanol suspendiert und mit 210 g (5.55 mmol) Natriumborhydrid versetzt. Nach 6 Stunden wird die Reaktion durch Zugabe von verdünnter Salzsäure abgebrochen und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert.

Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 6:1) gereinigt. Ausbeute: 372 mg (1.12 mmol, 81 %).

$C_{13}H_{17}NO_9$  (331.28)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$  (c 0.1, MeOH)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 354.0 [M+Na]^+$ ,  $370.0 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta = 8.24$  (d, 1 H, Ar-3),  $8.15$  (d, 1 H, Ar-5),  $7.21$  (dd, 1 H, Ar-6),  $5.13$  (d, 1 H, H-1),  $4.88$  (s, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>),  $3.91$  (bd, 1 H, H-4),  $3.87$  (dd, 1 H, H-2),  $3.81$ - $3.73$  (m, 3 H, H-5, H-6a/b),  $3.64$  (dd, 1 H, H-3) ppm.

$^4J_{Ar-3,5} = 2.9$ ,  $J_{Ar-5,6} = 9.2$ ,  $J_{1,2} = 7.9$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.3$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz, MEOD):  $\delta = 163.47$  (Ar-1),  $144.21$  (Ar-4),  $136.73$  (Ar-2),  $127.96$  (Ar-5),  $125.76$  (Ar-3),  $116.68$  (Ar-6),  $103.24$  (C-1),  $78.07$  (C-5),  $75.98$  (C-3),  $73.19$  (C-2),  $71.32$  (C-4),  $62.51$  (C-6),  $61.83$  (Ar-CH<sub>2</sub>) ppm.

#### (4-Methoxycarbonyl-2-nitrophenyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (178)

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 2b**:

1.74 g (3.30 mmol) **173**, 130 ml abs. Methanol, 2 ml NH<sub>3</sub> in Methanol, 24 Stunden. Zur Reinigung wird aus Methanol umkristallisiert.

$C_{14}H_{17}NO_{10}$  (359.29)

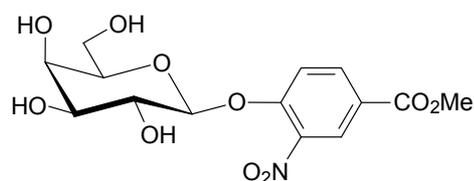
Ausbeute: 1.04 g (2.89 mmol, 88 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -90^\circ$  (c 0.4, MeOH)

Ber.: C 46.80 H 4.77 N 3.90

Gef.: C 46.35 H 4.84 N 3.98



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 382.3 [M+Na]^+$ ,  $398.4 [M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO):  $\delta = 8.40$  (d, 1 H, Ar-3),  $8.21$  (dd, 1 H, Ar-5),  $7.55$  (d, 1H, Ar-6),  $5.15$  (d, 1 H, H-1),  $3.93$  (s, 3 H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  $3.91$  (bd, 1 H, H-4),  $3.86$  (dd, 1 H, H-2),  $3.80$ - $3.74$  (m, 3 H, H-5, H-6a/b),  $3.60$  (dd, 1 H, H-3) ppm.

$^4J_{Ar-3,5} = 2.5$ ,  $J_{Ar-5,6} = 9.2$ ,  $J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.6$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz, DMSO):  $\delta = 166.71$  (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  $155.24$  (Ar-1),  $141.98$  (Ar-2),  $136.13$  (Ar-5),  $127.74$  (Ar-3),  $125.51$  (Ar-4),  $118.81$  (Ar-6),  $103.05$  (C-1),  $77.95$  (C-5),  $75.26$  (C-3),  $72.22$  (C-2),  $70.52$  (C-4),  $62.78$  (C-6),  $53.40$  (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

**(4-Carboxy-2-nitrophenyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (179)**

Die Umsetzung erfolgt analog der Darstellung von **176**:

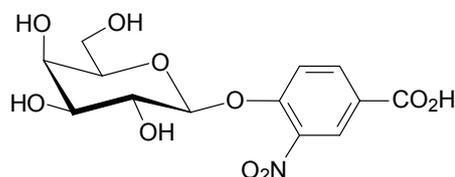
179 mg (498  $\mu$ mol) **178**, 6 ml Wasser / Methanol 3:1, 1 ml NaOH, 7 Stunden. Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 2:1.

$C_{13}H_{15}NO_{10}$  (345.26)

Ausbeute: 149 mg (432  $\mu$ mol, 87 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$  (c 0.1, MeOH)



$^1H$ -NMR (400 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 8.38$  (d, 1 H, Ar-3), 8.18 (dd, 1 H, Ar-5), 7.48 (d, 1H, Ar-6), 5.13 (d, 1 H, H-1), 3.93 (bd, 1 H, H-4), 3.87 (dd, 1 H, H-2), 3.81-3.74 (m, 3 H, H-5, H-6a/b), 3.62 (dd, 1 H, H-3) ppm.

$^4J_{Ar-3,5} = 2.0$ ,  $J_{Ar-5,6} = 9.2$ ,  $J_{1,2} = 8.1$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.6$  Hz.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 170.64$  ( $\underline{CO_2H}$ ), 154.13 (Ar-1), 141.78 (Ar-2), 136.31 (Ar-5), 127.70 (Ar-3), 118.36 (Ar-6), 115.84 (Ar-4), 103.15 (C-1), 77.79 (C-5), 75.23 (C-3), 72.34 (C-2), 70.58 (C-4), 62.78 (C-6) ppm.

**(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-5-nitrobenzoat (180)**

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 3**:

2.88 g (7.0 mmol) **56**, 2.26 g (7.0 mmol, 1 eq.)  $Bu_4NBr$ , 5.13 g (28 mmol, 4 eq.) 5-Nitrosalicylsäure (**165**), 75 ml DCM, 75 ml NaOH, 6 Stunden auf 35  $^\circ C$  erhitzen. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:1.

$C_{35}H_{41}NO_{23}$  (843.70)

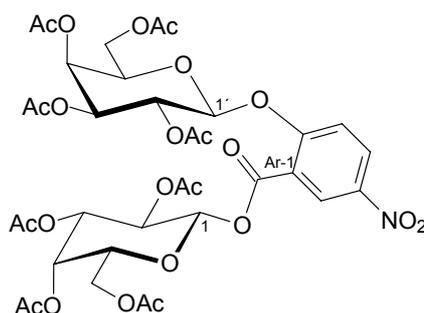
Ausbeute: 2.48 g (2.94 mmol, 42 %)

weißer Feststoff, Smp.: 129  $^\circ C$

$[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$  (c 0.5,  $CHCl_3$ )

Ber.: C 49.83 H 4.90 N 1.66

Gef.: C 49.90 H 4.99 N 1.59



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 866.2$   $[M+Na]^+$ , 882.2  $[M+K]^+$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 8.72$  (d, 1 H, Ar-3), 8.36 (dd, 1 H, Ar-5), 7.32 (d, 1 H, Ar-6), 5.89 (d, 1 H, H-1), 5.61 (dd, 1 H, H-2'), 5.49 (dd, 1 H, H-2), 5.47-5.44 (m, 2 H, H-4, H-4'), 5.19 (d, 1 H, H-1'), 5.15 (dd, 1 H, H-3), 5.11 (dd, 1 H, H-3'), 4.21-4.11 (m, 6 H, H-5, H-6a/b, H-5', H-6'a/b), 2.19, 2.18, 2.07, 2.06, 2.05, 2.01, 2.00, 1.99 (8 s, 24 H, 8  $COCH_3$ ) ppm.

$^4J_{Ar-3,5} = 2.5$ ,  $J_{Ar-5,6} = 9.2$ ,  $J_{1,2} = 8.1$ ,  $J_{2,3} = 10.2$ ,  $J_{3,4} = 3.6$ ,  $J_{1',2'} = 7.6$ ,  $J_{2',3'} = 10.7$ ,  $J_{3',4'} = 3.1$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.81, 170.73, 170.67, 170.63, 170.52, 170.40, 169.66, 169.44$  (8 C, 8  $\text{COCH}_3$ ), 161.36 (Ar-CO), 160.59 (Ar-1), 142.97 (Ar-4), 129.67 (Ar-5), 128.38 (Ar-3), 120.65 (Ar-2), 117.47 (Ar-6), 99.92 (C-1'), 93.44 (C-1), 72.39, 72.17 (2 C, C-5, C-5'), 71.11, 71.04 (2 C, C-3, C-3'), 68.53 (C-2'), 68.17 (C-2), 67.16, 67.10 (2 C, C-4, C-4'), 61.81, 61.47 (2 C, C-6, C-6'), 21.65, 21.46, 21.16, 21.08, 21.06, 21.01, 20.83, 20.72 (8 C, 8  $\text{COCH}_3$ ) ppm.

### *o*-Aminophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (181)

300 mg (996  $\mu\text{mol}$ ) *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid werden in 150 ml Methanol gelöst, mit 150 mg Palladium auf Aktivkohle (5%ig) versetzt und über Nacht unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Reaktionslösung wird durch Celite filtriert und der Rückstand zur Trockne eingengt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 5:1).

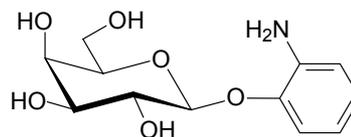
$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_6$  (271.27)

Ausbeute: 246 mg (907  $\mu\text{mol}$ , 91 %)

weißer Feststoff, Smp.: 200 °C

$[\alpha]_D^{20} = -46^\circ$  (c 0.6, MeOH)

Lit.:<sup>389</sup> Smp.: 201.4-202.4 °C



$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta = 7.10$  (dd, 1H, Ar-6), 6.84 (dt, 1H, Ar-4), 6.78 (dd, 1H, Ar-3), 6.65 (ddd, 1H, Ar-5), 4.69 (d, 1H, H-1), 3.89 (dd, 1H, H-4), 3.81 (dd, 1H, H-2), 3.77 (dd, 1H, H-6a), 3.74 (dd, 1H, H-6b), 3.60 (ddd, 1H, H-5), 3.56 (dd, 1H, H-3) ppm.

$J_{\text{Ar-3,4}} = 7.9$ ,  $^4J_{\text{Ar-3,5}} = 1.5$ ,  $J_{\text{Ar-4,5}} = 7.4$ ,  $^4J_{\text{Ar-4,6}} = 1.3$ ,  $J_{\text{Ar-5,6}} = 8.1$ ,  $J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.6$ ,  $J_{4,5} = 0.8$ ,  $J_{5,6a} = 5.6$ ,  $J_{5,6b} = 5.3$ ,  $J_{6a/b} = 11.7$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta = 146.14$  (Ar-1), 138.27 (Ar-2), 123.66 (Ar-4), 118.51 (Ar-5), 119.93 (Ar-6), 116.38 (Ar-3), 104.19 (C-1), 75.91 (C-5), 73.78 (C-3), 71.33 (C-2), 69.16 (C-4), 61.35 (C-6) ppm.

### (2-Pyridyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (184)

2.88 g (7.0 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosylbromid<sup>364</sup> (**56**) und 1.63 g (8.07 mmol, 1.15 eq.) Silber-2-pyridoxid<sup>390</sup> (**182**) werden für 1 Stunde in 30 ml Toluol unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird durch Celite filtriert und mit Toluol nachgespült. Das Filtrat wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Anschließend wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch mit Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:1.

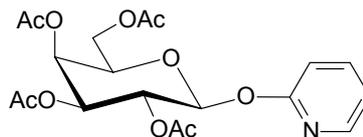
C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>10</sub> (425.39)

Ausbeute: 1.87 g (4.40 mmol, 63 %)

weißer Feststoff, Smp.: 48 °C

$[\alpha]_D^{20} = +25^\circ$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>)

Lit.:<sup>390</sup>  $[\alpha]_D = +27^\circ$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>)



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.13$  (dd, 1H, Ar-6), 7.60 (ddd, 1 H, Ar-4), 6.96 (dd, 1 H, Ar-5), 6.79 (d, 1 H, Ar-3), 6.17 (d, 1 H, H-1), 5.48 (dd, 1 H, H-2), 5.44 (bd, 1 H, H-4), 5.14 (dd, 1 H, H-3), 4.13-4.11 (m, 3 H, H-5, H-6a/b), 2.14, 1.99, 1.98, 1.95 (4 s, 12 H, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

$J_{Ar-3,4} = 8.1$ ,  $J_{Ar-4,5} = 7.1$ ,  ${}^4J_{Ar-4,6} = 1.5$ ,  $J_{Ar-5,6} = 5.1$ ,  $J_{1,2} = 8.1$ ,  $J_{2,3} = 10.7$ ,  $J_{3,4} = 3.1$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 170.76$ , 170.70, 170.52, 169.95 (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>), 161.74 (Ar-2), 147.16 (Ar-6), 139.79 (Ar-4), 119.27 (Ar-5), 112.19 (Ar-3), 94.30 (C-1), 71.55 (C-3), 71.51 (C-5), 69.08 (C-2), 67.69 (C-4), 61.68 (C-6), 21.40, 21.19, 21.10, 21.02 (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

### (3-Nitro-2-pyridyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (185)

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von **184**:

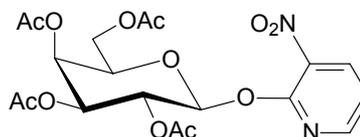
2.88 g (7.0 mmol) **56**, 1.99 g (8.06 mmol, 1.15 eq.) Silber-3-nitro-2-pyridoxid<sup>338</sup> (**183**), 30 ml Toluol, 1 Stunde. Laufmittel: Toluol / Aceton 3:1.

C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub> (470.39)

Ausbeute: 2.33 g (4.95 mmol, 71 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +128^\circ$  (c 0.4, CHCl<sub>3</sub>)



MALDI-TOF (DHB, positive mode):  $m/z = 493.3$  [M+Na]<sup>+</sup>, 509.3 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.38$  (dd, 1H, Ar-6), 8.24 (dd, 1 H, Ar-4), 7.16 (dd, 1 H, Ar-5), 6.14 (d, 1 H, H-1), 5.58 (dd, 1 H, H-2), 5.46 (bd, 1 H, H-4), 5.15 (dd, 1 H, H-3), 4.18-4.12 (m, 3 H, H-5, H-6a/b), 2.16, 2.03, 2.01, 2.00 (4 s, 12 H, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

$J_{Ar-4,5} = 7.9$ ,  ${}^4J_{Ar-4,6} = 1.8$ ,  $J_{Ar-5,6} = 4.8$ ,  $J_{1,2} = 8.1$ ,  $J_{2,3} = 10.2$ ,  $J_{3,4} = 3.6$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 170.72$ , 170.67, 170.58, 170.50 (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>), 169.40 (Ar-2), 154.21 (Ar-3), 151.44 (Ar-6), 135.64 (Ar-4), 119.18 (Ar-5), 95.28 (C-1), 71.92 (C-5), 71.24 (C-3), 68.19 (C-2), 67.23 (C-4), 61.43 (C-6), 21.07, 21.05, 21.01, 20.92 (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

**(2-Pyridyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (186)**

Die Darstellung erfolgt nach **AAV 2b**:

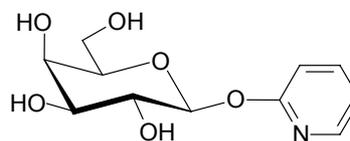
190 mg (447  $\mu$ mol) **184**, 10 ml abs. Methanol, 250  $\mu$ l  $\text{NH}_3$  in Methanol, 15 Stunden. Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 6:1.

$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_6$  (257.24)

Ausbeute: 113 mg (440  $\mu$ mol, 98 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$  (c 0.1, MeOH)



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta = 8.17$  (dd, 1 H, Ar-3), 7.75 (ddd, 1 H, Ar-5), 7.03 (ddd, 1 H, Ar-4), 6.84 (d, 1 H, Ar-6), 5.70 (d, 1 H, H-1), 3.70 (bd, 1 H, H-4), 3.58 (dd, 1 H, H-2), 3.54-3.48 (m, 2 H, H-5, H-6a), 3.45-3.39 (m, 2 H, H-3, H-6b) ppm.

$J_{\text{Ar-3,4}} = 5.1$ ,  $^4J_{\text{Ar-3,5}} = 2.0$ ,  $J_{\text{Ar-4,5}} = 7.1$ ,  $^4J_{\text{Ar-4,6}} = 1.0$ ,  $J_{\text{Ar-5,6}} = 8.1$ ,  $J_{1,2} = 8.1$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.6$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, DMSO):  $\delta = 162.59$  (Ar-2), 147.22 (Ar-3), 139.90 (Ar-5), 118.48 (Ar-4), 111.44 (Ar-6), 96.85 (C-1), 76.01 (C-5), 73.81 (C-3), 70.30 (C-2), 68.43 (C-4), 60.57 (C-6) ppm.

**(3-Nitro-2-pyridyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (187)**

Die Darstellung erfolgt nach **AAV 2b**:

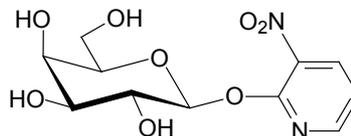
2.04 g (4.34 mmol) **185**, 100 ml abs. Methanol, 2 ml  $\text{NH}_3$  in Methanol, 8 Stunden.

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8$  (302.24)

Ausbeute: 1.31 g (4.33 mmol, quant.)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +37^\circ$  (c 0.1, MeOH)



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):  $\delta = 8.43$  (dd, 1 H, Ar-6), 8.35 (dd, 1 H, Ar-4), 7.23 (dd, 1 H, Ar-5), 6.09 (d, 1 H, H-1), 3.93 (bd, 1 H, H-4), 3.90 (dd, 1 H, H-2), 3.73-3.71 (m, 3 H, H-5, H-6a/b), 3.62 (dd, 1 H, H-3) ppm.

$J_{\text{Ar-4,5}} = 7.9$ ,  $^4J_{\text{Ar-4,6}} = 1.5$ ,  $J_{\text{Ar-5,6}} = 4.8$ ,  $J_{1,2} = 7.9$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 3.3$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz, MeOD):  $\delta = 155.48$  (Ar-3), 152.03 (Ar-6), 136.03 (Ar-4), 135.70 (Ar-2), 119.15 (Ar-5), 98.02 (C-1), 77.09 (C-5), 74.78 (C-3), 71.30 (C-2), 69.84 (C-4), 61.84 (C-6) ppm.

**(4-Pyridyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (189)**

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von **184**:

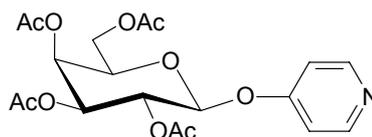
2.88 g (7.0 mmol) **56**, 1.63 g (8.07 mmol, 1.15 eq.) Silber-4-pyridoxid<sup>390</sup> (**188**), 30 ml Toluol, 1 Stunde. Laufmittel: Petrolether (50-70) / Ethylacetat 1:3.

C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>10</sub> (425.39)

Ausbeute: 1.96 g (4.61 mmol, 66 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +54^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.48$  (bd, 2H, Ar-2, Ar-6),  $6.92$  (bd, 2 H, Ar-3, Ar-5),  $5.49$  (dd, 1 H, H-2),  $5.45$  (bd, 1 H, H-4),  $5.18$  (d, 1 H, H-1),  $5.11$  (dd, 1 H, H-3),  $4.20$ - $4.09$  (m, 3 H, H-5, H-6a/b),  $2.16$ ,  $2.05$ ,  $2.04$ ,  $2.00$  (4 s, 12 H, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

$J_{\text{Ar-2,3}} = J_{\text{Ar-5,6}} = 6.1$ ,  $J_{1,2} = 7.6$ ,  $J_{2,3} = 10.7$ ,  $J_{3,4} = 3.6$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 170.71$ ,  $170.52$ ,  $170.45$ ,  $169.66$  (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>),  $163.54$  (Ar-4),  $151.05$  (2 C, Ar-2, Ar-6),  $112.27$  (2 C, Ar-3, Ar-5),  $98.29$  (C-1),  $71.89$  (C-5),  $71.02$  (C-3),  $68.61$  (C-2),  $67.08$  (C-4),  $61.74$  (C-6),  $21.09$ ,  $21.05$ ,  $21.03$ ,  $20.96$  (4 C, 4 COCH<sub>3</sub>) ppm.

#### (4-Pyridyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (190)

Die Darstellung erfolgt nach AAV 2b:

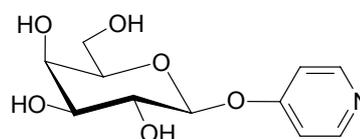
1.24 g (2.91 mmol) **189**, 70 ml abs. Methanol, 1.5 ml NH<sub>3</sub> in Methanol, 6 Stunden. Laufmittel: Ethylacetat / Methanol 6:1.

C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub> (257.24)

Ausbeute: 717 mg (2.79 mmol, 96 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +94^\circ$  (c 0.1, MeOH)



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO):  $\delta = 8.43$  (bd, 2 H, Ar-2, Ar-6),  $7.04$  (bd, 2 H, Ar-3, Ar-5),  $5.02$  (d, 1 H, H-1),  $3.72$  (bd, 1 H, H-4),  $3.65$  (vt, 1 H, H-5),  $3.60$  (dd, 1 H, H-2),  $3.55$  (dd, 1 H, H-6a),  $3.49$  (dd, 1 H, H-6b),  $3.41$  (dd, 1 H, H-3) ppm.

$J_{\text{Ar-2,3}} = J_{\text{Ar-5,6}} = 6.1$ ,  $J_{1,2} = 8.1$ ,  $J_{2,3} = 9.5$ ,  $J_{3,4} = 3.5$ ,  $J_{5,6a} = 5.7$ ,  $J_{5,6b} = 6.6$ ,  $^2J_{6a/b} = 11.0$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, DMSO):  $\delta = 163.59$  (Ar-4),  $151.30$  (2 C, Ar-2, Ar-6),  $111.97$  (2 C, Ar-3, Ar-5),  $100.14$  (C-1),  $76.06$  (C-5),  $73.56$  (C-3),  $70.35$  (C-2),  $68.43$  (C-4),  $60.66$  (C-6) ppm.

#### 1D-1-O-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*chiro*-inositol (191) und 1D-3-O-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*chiro*-inositol (193)

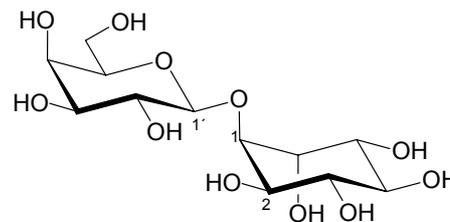
Die Darstellung erfolgt gemäß AAV 9:

555 mg (1.84 mmol) *p*NP-Gal, 1.99 g (11.1 mmol, 6.2 eq.) 1D-*chiro*-Inositol, 20 ml Inkubationspuffer, 900 mg (4950 MU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1. Ausbeute: 292 mg (853  $\mu$ mol, 46 %) **191** und **193** im Verhältnis 10:3.

ES-MS:  $m/z = 343$  [M+H]<sup>+</sup>

1D-1-O-(β-D-Galactopyranosyl)-chiro-inositol (191)C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> (342.30)

amorpher Feststoff



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 4.48 (d, 1 H, H-1'), 4.27 (dd, 1 H, H-6), 4.02 (dd, 1 H, H-1), 3.88 (bd, 1 H, H-4'), 3.79 (dd, 1 H, H-5), 3.77 (dd, 1 H, H-2), 3.72 (m<sub>c</sub>, 2 H, H-6'a/b), 3.65 (dd, 1 H, H-5'), 3.62 (dd, 1 H, H-3'), 3.60 (dd, 1 H, H-3), 3.53 (dd, 1 H, H-4), 3.52 (dd, 1 H, H-2') ppm.

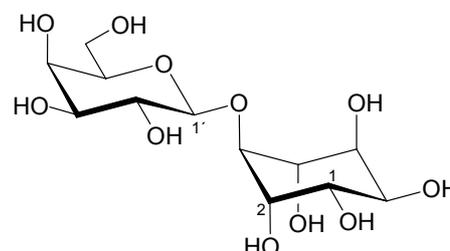
J<sub>1,2</sub> = 3.3, J<sub>1,6</sub> = 3.3, J<sub>2,3</sub> = 10.0, J<sub>3,4</sub> = 10.0, J<sub>4,5</sub> = 3.8, J<sub>5,6</sub> = 3.3, J<sub>1',2'</sub> = 7.8, J<sub>2',3'</sub> = 9.5, J<sub>3',4'</sub> = 3.4, J<sub>5',6'a</sub> = 4.2, J<sub>5',6'b</sub> = 7.8 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 105.3 (C-1'), 81.9 (C-1), 75.6 (C-5'), 73.3 (C-3), 73.2 (C-4), 73.0 (C-3'), 71.6 (C-2'), 71.1 (C-6), 70.9 (C-5), 70.8 (C-2), 68.9 (C-4'), 61.4 (C-6') ppm.

1D-3-O-(β-D-Galactopyranosyl)-chiro-inositol (193)C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> (342.30)

Die Identifizierung erfolgt durch

Methylierungsanalyse mittels GC-MS.

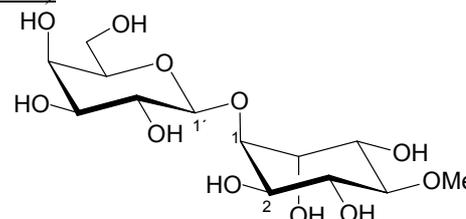
1D-1-O-(β-D-Galactopyranosyl)-4-O-methyl-chiro-inositol (192) und 1D-1-O-(β-D-Galactopyranosyl)-3-O-methyl-chiro-inositol (194)

Die Darstellung erfolgt gemäß AAV 9:

23 mg (76 μmol) *p*NP-Gal, 91 mg (0.47 mmol, 6.2 eq.) 1D-Pinitol, 1 ml Inkubationspuffer, 20 mg (110 MU) β-Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1. Ausbeute: 13.5 mg (37.9 μmol, 50 %) **192** und **194** im Verhältnis 1:1.

HR-ES-MS: Calcd m/z = 374.1657 [M+Na]<sup>+</sup>Found m/z = 374.1659 [M+Na]<sup>+</sup>1D-1-O-(β-D-Galactopyranosyl)-4-O-methyl-chiro-inositol (192)C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub> (356.33)

amorpher Feststoff



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 4.47 (d, 1 H, H-1'), 4.27 (dd, 1 H, H-6), 4.01 (dd, 1 H, H-1), 3.88 (bd, 1 H, H-4'), 3.84 (dd, 1 H, H-5), 3.77 (dd, 1 H, H-2), 3.74 (dd, 1 H, H-6'a), 3.70 (dd, 1 H, H-6'b), 3.68 (dd, 1 H, H-3), 3.65 (dd, 1 H, H-5'), 3.62 (dd, 1 H, H-3'), 3.57 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.51 (dd, 1 H, H-2'), 3.34 (dd, 1 H, H-4) ppm.

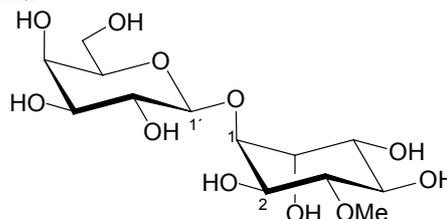
$J_{1,2} = 3.7$ ,  $J_{1,6} = 3.7$ ,  $J_{2,3} = 9.5$ ,  $J_{3,4} = 9.5$ ,  $J_{4,5} = 9.5$ ,  $J_{5,6} = 3.7$ ,  $J_{1',2'} = 7.8$ ,  $J_{2',3'} = 10.0$ ,  $J_{3',4'} = 3.4$ ,  $J_{5',6'a} = 4.4$ ,  $J_{5',6'b} = 7.8$ ,  ${}^2J_{6'a/b} = 11.7$  Hz.

${}^{13}\text{C}$ -NMR (125.8 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 105.3$  (C-1'), 83.1 (C-4), 81.6 (C-1), 75.6 (C-5'), 72.9 (C-3'), 72.7 (C-3), 71.6 (C-2'), 71.1 (C-6), 70.8 (C-2), 70.2 (C-5), 68.9 (C-4'), 61.4 (C-6'), 60.1 ( $\text{OCH}_3$ ) ppm.

#### 1D-1-O-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-3-O-methyl-*chiro*-inositol (194)

$\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$  (356.33)

amorpher Feststoff



${}^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 4.51$  (d, 1 H, H-1'), 4.30 (dd, 1 H, H-6), 4.03 (dd, 1 H, H-1), 3.91 (m, 1 H, H-4'), 3.87 (m, 1 H, H-2), 3.81 (m, 1 H, H-5), 3.74 (m, 2 H, H-6'a/b), 3.68 (m, 1 H, H-5'), 3.63 (m, 1 H, H-4), 3.62 (m, 1 H, H-3'), 3.59 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.54 (m, 1 H, H-2'), 3.40 (dd, 1 H, H-3) ppm.

$J_{1,2} = 3.7$ ,  $J_{1,6} = 3.8$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 9.7$ ,  $J_{5,6} = 3.9$ ,  $J_{1',2'} = 5.1$  Hz.

${}^{13}\text{C}$ -NMR (125.8 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 106.0$  (C-1'), 83.9 (C-4), 82.7 (C-6), 76.3 (C-5'), 73.6 (C-3'), 73.2 (C-3), 72.3 (C-2'), 71.5 (C-1), 71.5 (C-2), 70.9 (C-5), 69.6 (C-4'), 62.1 (C-6'), 60.8 ( $\text{OCH}_3$ ) ppm.

#### 1D-1-O-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-3,4-di-O-methyl-*chiro*-inositol (195)

Die Darstellung erfolgt gemäß AAV 9:

25.5 mg (85  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 99 mg (0.42 mmol, 5.0 eq.) 1D-3,4-Di-O-methyl-*chiro*-inositol,<sup>361</sup> 1 ml Inkubationspuffer, 20 mg (110 MU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1.

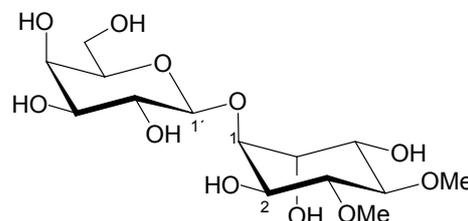
$\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$  (370.35)

Ausbeute: 17.6 mg (47.5  $\mu\text{mol}$ , 52 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +32^\circ$  (c 1,  $\text{H}_2\text{O}$ )

HR-ES-MS: Calcd  $m/z = 393.1367$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$   
Found  $m/z = 393.1388$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$



${}^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 4.47$  (d, 1 H, H-1'), 4.26 (dd, 1 H, H-6), 3.99 (dd, 1 H, H-1), 3.88 (m, 1 H, H-4'), 3.86 (m, 1 H, H-2), 3.84 (dd, 1 H, H-5), 3.75 (dd, 1 H, H-6'a), 3.70 (dd, 1 H, H-6'b), 3.65 (m, 1 H, H-5'), 3.62 (dd, 1 H, H-3'), 3.57 (s, 3 H, 3- $\text{OCH}_3$ ), 3.57 (s, 3 H, 4- $\text{OCH}_3$ ), 3.52 (dd, 1 H, H-2'), 3.46 (dd, 1 H, H-3), 3.35 (dd, 1 H, H-4) ppm.

$J_{1,2} = 3.6$ ,  $J_{1,6} = 3.4$ ,  $J_{2,3} = 9.7$ ,  $J_{3,4} = 9.7$ ,  $J_{4,5} = 9.7$ ,  $J_{5,6} = 3.4$ ,  $J_{1',2'} = 7.8$ ,  $J_{2',3'} = 9.8$ ,  $J_{3',4'} = 3.3$ ,  $J_{5',6'a} = 8.5$ ,  $J_{5',6'b} = 3.6$ ,  ${}^2J_{6'a/b} = 7.8$  Hz.

${}^{13}\text{C}$ -NMR (125.8 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 105.3$  (C-1'), 82.9 (C-3), 82.8 (C-4), 81.7 (C-1), 75.6 (C-5'), 72.9 (C-3'), 71.6 (C-2'), 70.8 (C-6), 70.3 (C-5), 70.3 (C-2), 68.9 (C-4'), 61.4 (C-6'), 60.2 (3-OCH<sub>3</sub>), 60.2 (4-OCH<sub>3</sub>) ppm.

### 1D-4-O-Allyl-1-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-3-O-methyl-*chiro*-inositol (**196**) und 1D-3-O-Allyl-1-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-4-O-methyl-*chiro*-inositol (**197**)

Die Darstellung erfolgt gemäß AAV 9:

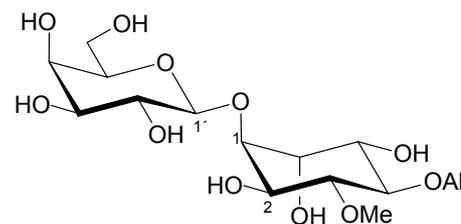
28.6 mg (95  $\mu\text{mol}$ ) *p*NP-Gal, 99 mg (0.48 mmol, 5.0 eq.) 1D-3-O-Allyl-4-O-methyl-*chiro*-inositol, 1 ml Inkubationspuffer, 20 mg (110 MU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1. Ausbeute: 21 mg (53  $\mu\text{mol}$ , 60 %) **196** und **197** im Verhältnis 16:9.

HR-ES-MS: Calcd  $m/z = 397.1737$  [M+Na]<sup>+</sup>  
Found  $m/z = 397.1704$  [M+Na]<sup>+</sup>

#### 1D-4-O-Allyl-1-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-3-O-methyl-*chiro*-inositol (**196**)

$\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$  (396.39)

amorpher Feststoff



${}^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 6.00$  (m, 1 H, All-2), 5.34 (dd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.24 (d, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.47 (d, 1 H, H-1'), 4.28 (m<sub>c</sub>, 2 H, All-1a/b), 4.26 (m, 1 H, H-6), 4.00 (m, 1 H, H-1), 3.88 (m, 1 H, H-4'), 3.86 (m, 1 H, H-2), 3.84 (m, 1 H, H-5), 3.72 (m, 2 H, H-6'a/b), 3.65 (m, 1 H, H-5'), 3.62 (m, 1 H, H-3'), 3.60 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.52 (m, 1 H, H-2'), 3.49 (m, 1 H, H-4), 3.42 (dd, 1 H, H-3) ppm.

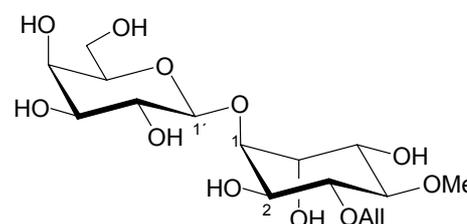
$J_{\text{All-2,3cis}} = 17.1$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.3$ ,  ${}^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.2$ ,  $J_{2,3} = 9.5$ ,  $J_{3,4} = 9.5$ ,  $J_{4,5} = 9.5$ ,  $J_{1',2'} = 7.8$  Hz.

${}^{13}\text{C}$ -NMR (125.8 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 134.7$  (All-2), 119.0 (All-3), 105.3 (C-1'), 83.2 (C-3), 81.7 (C-1), 81.1 (C-4), 75.6 (C-5'), 74.4 (All-1), 73.0 (C-3'), 71.6 (C-6), 71.6 (C-2'), 70.6, 70.4 (C-2, C-5), 68.9 (C-4'), 61.4 (C-6'), 60.6 (OCH<sub>3</sub>) ppm.

#### 1D-3-O-Allyl-1-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-4-O-methyl-*chiro*-inositol (**197**)

$\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$  (396.39)

amorpher Feststoff



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 6.00$  (m, 1 H, All-2), 5.34 (dd, 1 H, All-3<sub>cis</sub>), 5.24 (dd, 1 H, All-3<sub>trans</sub>), 4.47 (d, 1 H, H-1'), 4.28 (m<sub>c</sub>, 2 H, All-1a/b), 4.26 (m, 1 H, H-6), 4.00 (m, 1 H, H-1), 3.88 (m, 1 H, H-4'), 3.88 (m, 1 H, H-2), 3.84 (m, 1 H, H-5), 3.72 (m, 2 H, H-6'a/b), 3.65 (m, 1 H, H-5'), 3.62 (m, 1 H, H-3'), 3.60 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.56 (m, 1 H, H-3), 3.52 (m, 1 H, H-2'), 3.35 (dd, 1 H, H-4) ppm.

$J_{\text{All-2,3cis}} = 17.1$ ,  $J_{\text{All-2,3trans}} = 10.3$ ,  $^2J_{\text{All-3cis/trans}} = 1.2$ ,  $J_{3,4} = 9.5$ ,  $J_{4,5} = 9.5$ ,  $J_{1',2'} = 7.8$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 134.7$  (All-2), 119.0 (All-3), 105.3 (C-1'), 83.1 (C-4), 82.0 (C-1), 81.3 (C-3), 75.6 (C-5'), 74.5 (All-1), 73.0 (C-3'), 71.6 (C-2'), 70.8 (C-6), 70.6, 70.4 (C-2, C-5), 68.9 (C-4'), 61.4 (C-6'), 60.6 ( $\text{OCH}_3$ ) ppm.

### **1L-3-O-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*chiro*-inositol (198) und 1L-1-O-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*chiro*-inositol (199)**

Die Darstellung erfolgt gemäß **AAV 9**:

111 mg (0.37 mmol) *p*NP-Gal, 398 mg (2.2 mmol, 6.0 eq.) 1L-*chiro*-Inositol, 4 ml Inkubationspuffer, 80 mg (440 MU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1.

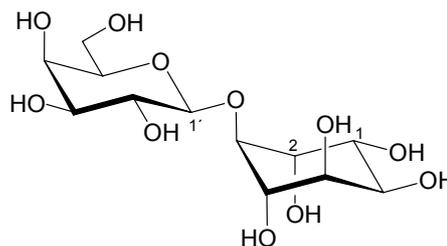
#### 1L-3-O-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*chiro*-inositol (198)

$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  (342.30)

Ausbeute: 61 mg (0.18 mmol, 48 %)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$  (c 1.1,  $\text{H}_2\text{O}$ )



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 4.62$  (dd, 1 H, H-1'), 4.04, 4.00 (2 dd, 2 H, H-1, H-6), 3.89 (d, 1 H, H-4'), 3.80, 3.76 (2 m<sub>c</sub>, 2 H, H-2, H-5), 3.78 (m, 1 H, H-3), 3.76 (m, 1 H, H-4), 3.76 (m, 1 H, H-6'), 3.72 (m, 1 H, H-6'), 3.70 (m, 1 H, H-5'), 3.66 (ddd, 1 H, H-3'), 3.57 (ddd, 1 H, H-2') ppm.

$J_{1',2'} = 7.9$ ,  $^3J_{1',3'} = 1.0$ ,  $J_{2',3'} = 9.9$ ,  $J_{2',4'} = 1.0$ ,  $J_{3',4'} = 3.4$  Hz.

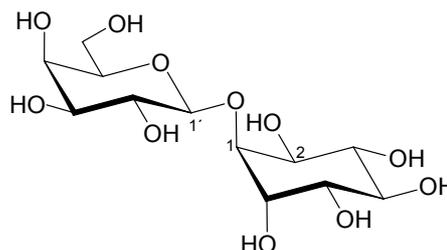
$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 104.0$  (C-1'), 82.9 (C-3), 75.8 (C-5'), 73.0 (C-3'), 72.7 (C-4), 71.7, 71.6 (2 C, C-1, C-6), 70.6, 69.5 (2 C, C-2, C-5), 69.1 (C-4'), 61.6 (C-2'), 61.6 (C-6') ppm.

#### 1L-1-O-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*chiro*-inositol (199)

$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  (342.30)

Ausbeute: 14 mg (41  $\mu\text{mol}$ , 11 %)

amorpher Feststoff



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 4.42$  (d, 1 H, H-1'), 4.14 (dd, 1 H, H-1), 4.12 (dd, 1 H, H-6), 3.90 (bd, 1 H, H-4'), 3.78 (m, 1 H, H-5), 4.75 (m, 1 H, H-2), 3.74 (m, 2 H, H-6'a/b), 3.67 (dd, 1 H, H-5'), 3.62 (dd, 1 H, H-3'), 3.57 (m, 1 H, H-3), 3.57 (m, 1 H, H-4), 3.49 (dd, 1 H, H-2') ppm.

$J_{1,2} = 3.5$ ,  $J_{1,6} = 3.5$ ,  $J_{5,6} = 3.5$ ,  $J_{1',2'} = 7.8$ ,  $J_{2',3'} = 10.0$ ,  $J_{3',4'} = 3.4$ ,  $J_{5',6'a} = 3.9$ ,  $J_{5',6'b} = 8.3$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 102.3$  (C-1'), 79.1 (C-1), 75.6 (C-5'), 73.5, 73.1 (2 C, C-3, C-4), 73.1 (C-3'), 70.9 (C-2'), 70.8 (C-5), 70.1 (C-2), 69.6 (C-6), 69.1 (C-4'), 61.6 (C-6') ppm.

### Galactosylierung von *myo*-Inositol

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 9**:

111 mg (0.37 mmol) *p*NP-Gal, 398 mg (2.2 mmol, 6.0 eq.) *myo*-Inositol, 4 ml Inkubationspuffer, 80 mg (440 MU)  $\beta$ -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1.  
Ausbeute: 80 mg (0.23 mmol, 63 %).

Die Identifizierung erfolgt durch Methylierungsanalyse mittels GC-MS. Das Gemisch enthält 2-*O*-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*myo*-inositol (**200**), 1D- oder 1L-4-*O*-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*myo*-inositol, 5-*O*-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*myo*-inositol (**201**), 1D- oder 1L-1-*O*-( $\beta$ -D-Galactopyranosyl)-*myo*-inositol im Verhältnis 12:4:3:2.

## 10.5. Gefahrenhinweise

	Gef. St. Symbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Acetylchlorid	F, C	13-14-34	9-16-26-45
Allylalkohol	T, N	10-23/24/25-36/37/38-50	36/37/39-38-45-61
Allyltributylzinn	T, N	21-25-36/38-48/23/25-50/53	35-36/37/39-45-60-61
Ammoniak / Methanol	C, T	11-34-23/24/25-39	7-16-24-33-45-36/37/39
Ammoniumcer(IV)-nitrat	F, Xi	8-36/37/38	17-26-36
Ammoniumhydrogencarbonat	C	22	22-24/25
$\alpha,\alpha'$ -Azoisobutyronitril	E, Xn	2-11-20/22-52/53	39-41-47.1-61
Benzaldehyddimethylacetal	Xn	22	23-24/25
Benzol	F, T	45-11-48/23/24/25	53.1-45
Benzoylchlorid	T	34	53-26-45
Benzylalkohol	Xn	20/22	26
Benzylbromid	Xi	36/37/38	39
Bortrifluorid-Diethyletherat	F, T	15-34-48/23	26/36/37/39-45
<i>N</i> -Bromsuccinimid	Xn	22-36/37/38	26-36
Bromwasserstoff (33 % in Eisessig)	C	34-37	7/9-23.2-26-36/37/39-45
Campher-10-sulfonsäure	C	34	22-26-36/37/39-45
Celite	Xn	40/20	22
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Chlorwasserstoff-Gas	T, C	23-35	9-26-36/37/39-45
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en	C	22-34-52/53	26-36/37/39-45-61
1,2-Dichlorethan	T, F	45-11-E22-36/37/38	53-45
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Diethylaminoschwefeltrifluorid	C	5-14-35	8-26-36/37/39-45
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	9-16-29-33
2,5-Dihydroxybenzoesäure	---	---	24/25
Dimethoxypropan	F, Xi	11-36-66	9-16-26
4-(Dimethylamino)-pyridin	T	25-36/38	37-45
<i>N,N'</i> -Dimethylformamid	T	61-36-20/21	53-45
Dimethylsulfoxid	Xi	36/37/38	26-36
1,4-Dioxan	F, Xn	11-19-36/37-40	16-36/37
Essigsäure	C	34	23-26-45
Essigsäureanhydrid	C	10-34	26-45
Ethanthiol	F, X, N	11-20-50/53	16-25-60-61
Ethylacetat	F, Xi	11-36-66-67	16-26-33
Ethylthiotrimethylsilan	F	11	---
<i>N</i> -Iodsuccinimid	Xn	22-36/37/38	26-36
Imidazol	C	22-34	22-26-36/37/39-45
Kaliumphosphat	Xi	36/38	---
Kieselgel 60	---	---	22
Lithiumbromid	Xn	22	---

	<b>Gef. St. Symbol</b>	<b>R-Sätze</b>	<b>S-Sätze</b>
Methanol	F, T	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45
Methansulfonsäurechlorid	T+	21/22-26-34-37-52/53	26-28.1-36/37/39-45
1-Methylimidazol	C	21/22-34	26-36-45
Methyliodid	T	21-23/25-37/38-40	36/37-38-45
Natriumacetat	---	---	22-24/25
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61 26-36/37/39-
Natriumborhydrid	F, C	15-34	43.12-45
Natriumcyanoborhydrid	F, C	15-32-34	26-36/37/39-43.3-45
Natriumhydrid	F, C	15-34	7/8-26-36/37/38-43.6- 45
Natriumhydrogencarbonat	---	---	22-24/25
Natriumhydroxid	C	45	26-37/39-45
Natriummethanolat	T, C	11-14-34	8-16-26-43.6-45
Natriumnitrit	O, T, N	8-25-50	45-61
Natriumphosphat	Xi	36/38	---
Palladium / Aktivkohle	O	7-36/37/38	17-26-36
Petrolether (50-70)	F+, Xn	12-65	9-16-29-33-62
Pivaloylchlorid	F, Xn, C	11-23-34-36/37	16-26-36/37/39-45
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28
Salzsäure, konzentriert	C	34-37	26-36/37/39-45
Schwefelsäure, konzentriert	C	35	26-30-45
Silbercarbonat	Xi	36/37/38	26-36
Silbertrifluormethansulfonat	Xi	---	---
Tetrabutylammoniumbromid	Xi	36/38	26-36
TBAT	---	14-34	22-26-36/37/39-45
Tetrahydrofuran	F, Xi	11-19-36/37	16-29-33
1,1'-Thiocarbonyldiimidazol	---	---	22-24/25
Titantetrachlorid	C	14-34-36/37	7/8-26-45
Toluol	Xn	11-20	16-25-29-33
p-Toluolsulfonsäure	Xi	36/37/38	26-37
p-Toluolsulfonsäurechlorid	C	34	22-26-36/37/39-45
Tributylzinnhydrid	T, N	21-25-36/38-48/23/25- 50/53	35-36/37/39-45-60-61
Trichloracetonitril	T, N	23/24/25-51/53	45-61
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39- 45
Trifluormethansulfonsäureanhydrid	C	35	15-36/37/39-45
2-Trimethylsilylethanol	F	10	24/25
Trimethylsilyltrifluormethansulfonat	C	10-14-34-37	26-36/37/39-45
Triphenylphosphin	Xn, C	43-48/20/22-50-53	22-24-37
Wasserstoff	F+	12	9-16-33
Zink, gepulvert	F	10-15	7/8-43.3
Zinkiodid	C	34	26-36/37/39-45
Zinntetrachlorid	C	34-52/53	26-45-61-7/8

## 11. Literatur

- (1) Mann, J. *Secondary Metabolism*; 2 ed.; Clarendon Press: Oxford, 1987, 6-21.
- (2) Stryer, L. *Biochemistry*; 4 ed.; W. H. Freeman and Company: New York, 1995, 463-482.
- (3) Montreuil, J.; Vliegthart, J. F. G.; Schachter, H. *Glycoproteins*; Elsevier: Amsterdam, 1995, 1-10.
- (4) Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 4-8.
- (5) Laine, R. A. *Glycobiology* **1994**, *4*, 759-767.
- (6) Fukuda, M. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 207-215.
- (7) Sharon, N.; Lis, H. *The Proteins*; 5 ed.; Academic Press: New York, 1982, 1-124.
- (8) Paulson, J. C. *The Receptors*; 2 ed.; Academic Press: New York, 1985, 131-219.
- (9) Feizi, T. *Nature* **1985**, *314*, 53-57.
- (10) Lasky, L. A. *Science* **1992**, *258*, 964-969.
- (11) Wittmann, V. In *Glycoscience*; Fraser-Reid, B., Tatsuta, K., Thiem, J., Eds.; Springer: Berlin, 2001; Vol. 3, 2253-2303.
- (12) Nuenke, R. L.; Cunningham, L. W. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 2452-2460.
- (13) Paul, G.; Lottspeich, F.; Wieland, F. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1020-1024.
- (14) Brooks, S. A.; Dwek, M. V.; Schumacher, U. *Functional & Molecular Glycobiology*; BIOS Scientific Publishers Ltd.: Oxford, 2002.
- (15) Hashimoto, Y.; Pigman, W. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *93*, 541.
- (16) Thomsen, O. *Z. Immun. Forschung* **1927**, *52*, 85-93.
- (17) Hounsell, E. F.; Davies, M. J.; Renouf, D. V. *Glycoconj. J.* **1996**, *13*, 19-26.
- (18) Fransson, L.-A. *The Polysaccharides*; Academic Press: New York, 1985.
- (19) Spiro, R. G. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 4813-4823.
- (20) Lampport, D. T. A. *Nature* **1967**, *216*, 1322-1324.
- (21) Tanner, W.; Lehle, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *906*, 81-96.
- (22) Hase, S.; Nishimura, H.; Kawabata, S.; Iwanaga, S.; Ikenaka, T. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 1858-1861.
- (23) Hart, G. W.; Holt, G. D.; Haltiwanger, R. S. *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *13*, 380-384.
- (24) Hallgren, P.; Lundblad, A.; Svensson, S. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 5312-5314.
- (25) Coltart, D. M.; Royyuru, A. K.; Williams, L. J.; Glunz, P. W.; Sames, D.; Kuduk, S. D.; Schwarz, J. B.; Chen, X.-T.; Danishefsky, S. J.; Live, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9833-9844.
- (26) Lehmann, J. *Kohlenhydrate*; 2 ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1996.

- 
- (27) Fukuda, M.; Lauffenburger, M.; Sasaki, H.; Rogers, M. E.; Dell, A. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11952-11957.
- (28) Low, M. G.; Ferguson, M. A.; Futerman, A. H.; Silman, I. *Trends Biochem. Sci.* **1986**, *11*, 212-215.
- (29) Ferguson, M. A.; Williams, A. F. *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 285-320.
- (30) Doering, T.; Masterson, W.; Hart, G.; Englund, P. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 611-614.
- (31) Springer, G. F.; Desai, P. R.; Banatwala, I. *Naturwissenschaften* **1974**, *61*, 457-458.
- (32) Vavasseur, F.; Yang, J. M.; Dole, K.; Paulsen, H.; Brockhausen, I. *Glycobiol.* **1995**, *5*, 351-357.
- (33) Singh, R.; Campbell, B. J.; Yu, L.-G.; Fernig, D. G.; Milton, J. D.; Goodlad, R. A.; FitzGerald, A. J.; Rhodes, J. M. *Glycobiol.* **2001**, *11*, 587-592.
- (34) Springer, G. F. *Science* **1984**, *224*, 1198-1205.
- (35) Itzkowitz, S. H.; Bloom, E. J.; Kokal, W. A.; Modin, G.; Hakomori, S.; Kim, Y. S. *Cancer* **1990**, *66*, 1960-1966.
- (36) Karsten, U.; Papsdorf, G.; Pauly, A.; Vojtesek, B.; Moll, R.; Lane, E. B.; Clausen, H.; Stosiek, P.; Kasper, M. *Differentiation* **1993**, *54*, 55-66.
- (37) Baeckstrom, D. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11503-11509.
- (38) Lloyd, K. O.; Burchell, J.; Kudryashov, V.; Yin, B. W. T.; Taylor-Papadimitriou, J. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 33325-33334.
- (39) Fukuda, M.; Carlsson, S. R.; Klock, J. C.; Dell, A. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 12796-12806.
- (40) Saitoh, O.; Gallagher, R. E.; Fukuda, M. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2854-2862.
- (41) Brockhausen, I.; Yang, J. M.; Burchell, J.; Whitehouse, C.; Taylor-Papadimitriou, J. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 607-617.
- (42) Kim, Y. J.; Varki, A. *Glycoconj. J.* **1997**, *14*, 569-576.
- (43) Fung, P. Y.; Madej, M.; Koganty, R. R.; Longenecker, B. M. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 4308-4314.
- (44) MacLean, G. D.; Reddish, M. A.; Koganty, R. R.; Longenecker, B. M. *J. Immunother. Emphasis. Tumor Immunol.* **1996**, *19*, 59-68.
- (45) Livingston, P. O.; Zhang, S.; Lloyd, K. O. *Cancer Immunol. Immunother.* **1997**, *45*, 1-9.
- (46) Livingston, P. O.; Ragupathi, G. *Cancer Immunol. Immunother.* **1997**, *45*, 10-19.
- (47) Rittenhouse-Diakun, K.; Xia, Z.; Pickhardt, D.; Morey, P. S.; Baek, M.-G.; Roy, R. *Hybridoma* **1998**, *17*, 165-173.
- (48) Roy, R.; Baek, M.-G.; Rittenhouse-Olson, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1809-1816.

- (49) Ashida, H.; Yamamoto, K.; Kumagai, H. *Carbohydr. Res.* **2001**, *330*, 487-493.
- (50) Stults, C. L.; Sweeley, C. C.; Macher, B. A. *Methods Enzymol.* **1989**, *179*, 167-214.
- (51) Kolter, T.; Proia, R. L.; Sandhoff, K. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25859-25862.
- (52) Lee, A. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, R811-814.
- (53) Hakomori, S. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 18713-18716.
- (54) Mutoh, T.; Tokuda, A.; Miyadai, T.; Hamaguchi, M.; Fujiki, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5087-5091.
- (55) Nojiri, H.; Stroud, M.; Hakomori, S. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4531-4537.
- (56) Allende, M. L.; Proia, R. L. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 587-592.
- (57) Ogawa-Goto, K.; Abe, T. *Neurochem. Res.* **1998**, *23*, 305-310.
- (58) Faller, A. *Der Körper des Menschen*; 11 ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1988, 45-52, 314-323.
- (59) Changeux, J.-P. *Sci. Am.* **1993**, *269*, 58-62.
- (60) Streit, W. J.; Kincaid-Colton, C. A. *Sci. Am.* **1995**, *273*, 38-43.
- (61) Stoffel, W. *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 969-986; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 958-975.
- (62) Ransom, B. R.; Sontheimer, H. *J. Clin. Neurophysiol.* **1992**, *9*, 224-251.
- (63) Kettenmann, H. *Adv. Neurol.* **1999**, *79*, 565-571.
- (64) Hucho, F. *Neurochemistry - Fundamentals and Concepts*; VCH: Weinheim, 1986.
- (65) Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. *J. Physiol.* **1952**, *117*, 500-544.
- (66) Schnaar, R. L. In *Carbohydrates in Chemistry and Biology*; Ernst, B., Hart, G. W., Sinay, P., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2000, 1013-1027.
- (67) Bosio, A.; Binczek, E.; Haupt, W. F.; Stoffel, W. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 308-315.
- (68) Bosio, A.; Binczek, E.; Stoffel, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13280-13285.
- (69) Kelm, S.; Schauer, R. *Int. Rev. Cytol.* **1997**, *175*, 137-240.
- (70) Wiley, D. C.; Skehel, J. J. *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 365-394.
- (71) Crocker, P. R.; Kelm, S.; Dubois, C.; Martin, B.; McWilliam, A. S.; Shotton, D. M.; Paulson, J. C.; Gordon, S. *EMBO J.* **1991**, *10*, 1661-1669.
- (72) Crocker, P. R.; Clark, E. A.; Filbin, M.; Gordon, S.; Jones, Y.; Kehrl, J. H.; Kelm, S.; Le Douarin, N.; Powell, L.; Roder, J.; Schnaar, R. L.; Sgroi, D. C.; Stamenkovic, K.; Schauer, R.; Schachner, M.; van den Berg, T. K.; van der Merwe, P. A.; Watt, S. M.; Varki, A. *Glycobiol.* **1998**, *8*, Glycoforum v-vi.
- (73) Stamenkovic, I.; Seed, B. *Nature* **1990**, *345*, 74-77.
- (74) Simmons, D. L.; Seed, B. *J. Immunol.* **1988**, *141*, 2797-2800.

- (75) Arquint, M.; Roder, J.; Chia, L. S.; Down, J.; Wilkinson, D.; Bayley, H.; Braun, P.; Dunn, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 600-604.
- (76) Powell, L. D.; Varki, A. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 14243-14246.
- (77) Angata, T.; Varki, A. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 22127-22135.
- (78) Razi, N.; Varki, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 7469-7474.
- (79) Trapp, B. D.; Quarles, R. H.; Suzuki, K. *J. Cell Biol.* **1984**, *99*, 594-606.
- (80) Owens, G. C.; Boyd, C. J.; Bunge, R. P.; Salzer, J. L. *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 1171-1182.
- (81) Owens, G. C.; Bunge, R. P. *Neuron* **1991**, *7*, 565-575.
- (82) Li, C.; Tropak, M. B.; Gerlai, R.; Clapoff, S.; Abramow-Newerly, W.; Trapp, B.; Peterson, A.; Roder, J. *Nature* **1994**, *369*, 747-750.
- (83) Fruttiger, M.; Montag, D.; Schachner, M.; Martini, R. *Eur. J. Neurosci.* **1995**, *7*, 511-515.
- (84) Sheikh, K. A.; Sun, J.; Liu, Y.; Kawai, H.; Crawford, T. O.; Proia, R. L.; Griffin, J. W.; Schnaar, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7532-7537.
- (85) Kelm, S.; Pelz, A.; Schauer, R.; Filbin, M. T.; Tang, S.; de Bellard, M. E.; Schnaar, R. L.; Mahoney, J. A.; Hartnell, A.; Bradfield, P.; Crocker, P. R. *Curr. Biol.* **1994**, *4*, 965-972.
- (86) Crocker, P. R.; Kelm, S.; Hartnell, A.; Freeman, S.; Nath, D.; Vinson, M.; Mucklow, S. *Biochem. Soc. Trans.* **1996**, *24*, 150-156.
- (87) Collins, B. E.; Yang, L. Y.; Mukhopadhyay, G.; Filbin, M. T.; Kiso, M.; Hasegawa, A.; Schnaar, R. L. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1248-1255.
- (88) Schnaar, R. L.; Collins, B. E.; Wright, L. P.; Kiso, M.; Tropak, M. B.; Roder, J. C.; Crocker, P. R. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1998**, *845*, 92-105.
- (89) Collins, B. E.; Kiso, M.; Hasegawa, A.; Tropak, M. B.; Roder, J. C.; Crocker, P. R.; Schnaar, R. L. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16889-16895.
- (90) Streng, K.; Schauer, R.; Bovin, N.; Hasegawa, A.; Ishida, H.; Kiso, M.; Kelm, S. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *258*, 677-685.
- (91) Mukhopadhyay, G.; Doherty, P.; Walsh, F. S.; Crocker, P. R.; Filbin, M. T. *Neuron* **1994**, *13*, 757-767.
- (92) Fawcett, J. W.; Keynes, R. J. *Annu. Rev. Neurosci.* **1990**, *13*, 43-60.
- (93) Yang, L. J.; Zeller, C. B.; Shaper, N. L.; Kiso, M.; Hasegawa, A.; Shapiro, R. E.; Schnaar, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 814-818.
- (94) Vyas, A. A.; Patel, H. V.; Fromholt, S. E.; Heffer-Laue, M.; Vyas, K. A.; Dang, J.; Schachner, M.; Schnaar, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 8412-8417.
- (95) Vinson, M.; Strijbos, P. J. L. M.; Rowles, A.; Facci, L.; Moore, S. E.; Simmons, D. L.; Walsh, F. S. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20280-20285.

- (96) Yamashita, T.; Higuchi, H.; Tohyama, M. *J. Cell Biol.* **2002**, *157*, 565-570.
- (97) Liu, B. P.; Fournier, A.; GrandPré, T.; Strittmatter, S. M. *Science* **2002**, *297*, 1190-1193.
- (98) Kaplan, D. R.; Miller, F. D. *Nature Neurosci.* **2003**, *6*, 435-436.
- (99) Schelhaas, M.; Waldmann, H. *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2192-2219; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2056-2083.
- (100) Wong, C.-H.; Halcomb, R. L.; Ichikawa, Y.; Kajimoto, T. *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 453-474; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 412-433.
- (101) Wong, C.-H.; Halcomb, R. L.; Ichikawa, Y.; Kajimoto, T. *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 569-593; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 521-546.
- (102) Crout, D. H.; Vic, G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 98-111.
- (103) Koeller, K. M.; Wong, C.-H. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4465-4494.
- (104) Kren, V.; Thiem, J. *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 463-473.
- (105) Leloir, L. F. *Science* **1971**, *172*, 1299-1303.
- (106) Beyer, T. A.; Sadler, J. E.; Rearick, J. I.; Paulson, J. C.; Hill, R. L. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1981**, *52*, 23-175.
- (107) Baisch, G.; Öhrlein, R.; Ernst, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 749-754.
- (108) Scheppokat, A. M.; Bretting, H.; Thiem, J. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 2083-2090.
- (109) Kren, V.; Dvoráková, J.; Gambert, U.; Sedmera, P.; Havlíček, V.; Thiem, J.; Bezouska, K. *Carbohydr. Res.* **1998**, *305*, 517-523.
- (110) Gambert, U.; Thiem, J. *Top. Curr. Chem.* **1997**, *186*, 21-43.
- (111) Bülter, T.; Elling, L. *Glycoconj. J.* **1999**, *16*, 147-159.
- (112) Wong, C.-H.; Haynie, S. L.; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 5416-5418.
- (113) Waldmann, H.; Gygax, D.; Bednarski, M. D.; Shangraw, W. R.; Whitesides, G. M. *Carbohydr. Res.* **1986**, *157*, C4-C7.
- (114) Eis, C.; Nidetzky, B. *Biochem. J.* **1999**, *341*, 385-393.
- (115) Evers, B.; Thiem, J. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 857-863.
- (116) Evers, B.; Mischnick, P.; Thiem, J. *Carbohydr. Res.* **1994**, *262*, 335-341.
- (117) Wolfenden, R.; Lu, X.; Young, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6814-6815.
- (118) Davies, G. J.; Wilson, K. S.; Henrissat, B. *Biochem. J.* **1997**, *321*, 557-559.
- (119) Sulzenbacher, G.; Schüle, M.; Davies, G. J. *Biochem. J.* **1997**, *36*, 5902-5911.
- (120) Sinnott, M. L. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171-1202.
- (121) IUBMB *Enzyme Nomenclature: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*; Academic Press: New York, 1992.

- (122) Henrissat, B. *Biochem. J.* **1991**, *280*, 309-316.
- (123) Gebler, J.; Gilkes, N. R.; Claeysens, M.; Wilson, D. B.; Béguin, P.; Wakarchuk, W. W.; Kilburn, D. G.; Miller Jr., R. C.; Warren, R. A.; Withers, S. G. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 12559-12561.
- (124) Davies, G.; Henrissat, B. *Structure* **1995**, *3*, 853-859.
- (125) Henrissat, B.; Coutinho, P. M. *Methods Enzymol.* **2001**, *330*, 183-201.
- (126) Henrissat, B.; Callebaut, I.; Fabrega, S.; Lehn, P.; Mornon, J.-P.; Davies, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *93*, 7090-7094.
- (127) Bourne, Y.; Henrissat, B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 593-600.
- (128) Henrissat, B. *Biochem. Soc. Trans.* **1998**, *26*, 153-156.
- (129) Coutinho, P. M.; Henrissat, B. **2003**, Carbohydrate Active Enzymes Server at <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>.
- (130) Campbell, J. A.; Davies, G. J.; Bulone, V.; Henrissat, B. *Biochem. J.* **1997**, *326*, 929-939.
- (131) Coutinho, P. M.; Deleury, E.; Davies, G. J.; Henrissat, B. *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 307-317.
- (132) Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985-2993.
- (133) Ogston, A. G. *Nature* **1948**, *162*, 963-969.
- (134) Mesecar, A. D.; Koshland Jr., D. E. *Nature* **2000**, *403*, 614-615.
- (135) Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 5073-5076.
- (136) Koshland Jr., D. E. *Biol. Rev.* **1953**, *28*, 416-436.
- (137) McCarter, J. D.; Withers, S. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 885-892.
- (138) White, A.; Rose, D. R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 645-651.
- (139) Rye, C. S.; Withers, S. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 573-580.
- (140) Phillips, D. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, *57*, 483-495.
- (141) Vocadlo, D. J.; Davies, G. J.; Laine, R.; Withers, S. G. *Nature* **2001**, *412*, 835-838.
- (142) Gebler, J. C.; Aebersold, R.; Withers, S. G. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 11126-11130.
- (143) McIntosh, L. P.; Hand, G.; Johnson, P. E.; Joshi, M. D.; Körner, M.; Plesniak, L. Z.; Ziser, L.; Wakarchuk, W. W.; Withers, S. G. *Biochem.* **1996**, *35*, 9958-9966.
- (144) Juers, D. H.; Heightman, T. D.; Vasella, A.; McCarter, J. D.; Mackenzie, L.; Withers, S. G.; Matthews, B. W. *Biochem.* **2001**, *40*, 14781-14794.
- (145) Nilsson, K. G. I. *Tibtech* **1988**, *6*, 256-264.
- (146) Finch, P.; Yoon, J. H. *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 339-345.
- (147) Schramm, V. L. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 693-720.
- (148) Sauerbrei, B.; Thiem, J. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 201-204.

- (149) Treder, W.; Thiem, J.; Schlingmann, M. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5605-5608.
- (150) Nilsson, K. G. I. *Carbohydr. Res.* **1988**, *180*, 53-59.
- (151) Okahata, Y.; Mori, T. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **1998**, *56*, 931-939.
- (152) Chiffolleau-Giraud, V.; Spangenberg, P.; Rabiller, C. *Tetrahedron Asymm.* **1997**, *8*, 2017-2023.
- (153) Spangenberg, P.; André, C.; Langlois, V.; Dion, M.; Rabiller, C. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 221-228.
- (154) Herrmann, G. F.; Ichikawa, Y.; Wandrey, C.; Gaeta, F. C. A.; Paulson, J. C.; Wong, C.-H. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3091-3094.
- (155) Kren, V.; Thiem, J. *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 979-981; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 893-895.
- (156) Dudziak, G.; Bézay, N.; Schwientek, T.; Clausen, H.; Kunz, H.; Liese, A. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5865-5869.
- (157) Mackenzie, L. F.; Wang, Q.; Warren, R. A. J.; Withers, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5583-5584.
- (158) Malet, C.; Planas, A. *FEBS Lett.* **1998**, *440*, 208-212.
- (159) Mayer, C.; Jakeman, D. L.; Mah, M.; Karjala, G.; Gal, L.; Warren, R. A. J.; Withers, S. G. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 437-443.
- (160) Jakeman, D. L.; Withers, S. G. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2002**, *14*, 13-25.
- (161) Ajisaka, K.; Fujimoto, H.; Isomura, M. *Carbohydr. Res.* **1994**, *259*, 103-115.
- (162) Ajisaka, K.; Yamamoto, Y. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2002**, *14*, 1-11.
- (163) Montero, E.; Alonso, J.; Cañada, F. J.; Fernández-Mayoralas, A.; Martín-Lomas, M. *Carbohydr. Res.* **1997**, *305*, 383-391.
- (164) Murata, T.; Usui, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 1059-1066.
- (165) Yoon, J.-H.; Ajisaka, K. *Carbohydr. Res.* **1996**, *292*, 153-163.
- (166) Hedbys, L.; Larsson, P.-O.; Mosbach, K. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **1984**, *123*, 8-15.
- (167) Usui, T.; Morimoto, S.; Hayakawa, Y.; Kawaguchi, M.; Murata, T.; Matahira, Y.; Nishida, Y. *Carbohydr. Res.* **1996**, *285*, 29-39.
- (168) Hedbys, L.; Johansson, E.; Mosbach, K.; Larsson, P.-O.; Gunnarsson, A.; Svensson, S. *Carbohydr. Res.* **1989**, *186*, 217-223.
- (169) Murata, T.; Itoh, T.; Hayakawa, Y.; Usui, T. *J. Biochem.* **1996**, *120*, 851-855.
- (170) Usui, T.; Kubota, S.; Ohi, H. *Carbohydr. Res.* **1993**, *244*, 315-323.
- (171) Nilsson, K. G. I. *Carbohydr. Res.* **1987**, *167*, 95-103.
- (172) Nilsson, K. G. I. *Carbohydr. Res.* **1989**, *188*, 9-17.

- (173) Hedbys, L.; Johansson, E.; Mosbach, K.; Larsson, P. O.; Gunnarsson, A.; Svensson, S.; Lonn, H. *Glycoconj. J.* **1989**, *6*, 161-168.
- (174) Hart, J. B.; Falshaw, A.; Farkas, E.; Thiem, J. *Synlett* **2001**, 329-332.
- (175) Quioco, F. A. *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 287-315.
- (176) Lemieux, R. U. *Chem. Soc. Rev.* **1989**, *18*, 347-374.
- (177) Distler, J. J.; Jourdan, G. W. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 6772-6780.
- (178) Cunningham, J.; Gigg, R.; Warren, C. D. *Tetrahedron Lett.* **1964**, *5*, 1191-1196.
- (179) Jansson, K.; Frejd, T.; Kihlberg, J.; Magnusson, G. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 753-756.
- (180) Eichler, E.; Kihlberg, J.; Bundle, D. R. *Glycoconj. J.* **1991**, *8*, 69-74.
- (181) Biswas, K.; Coltart, D. M.; Danishefsky, S. J. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6107-6110.
- (182) Baek, M.-G.; Roy, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 11-17.
- (183) Wong, T. C.; Townsend, R. R.; Lee, Y. C. *Carbohydr. Res.* **1987**, *170*, 27-46.
- (184) Banoub, J.; Boullanger, P.; Lafont, D. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1167-1195.
- (185) Lemieux, R. U.; Ratcliffe, R. M., *Deutsch. Offenleg.* **1978**, DE 2816340; *Chem. Abstr.* **1979**, *90*, 87846.
- (186) Lemieux, R. U.; Ratcliffe, R. M. *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244-1251.
- (187) Somsák, L.; Németh, I. *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, *12*, 679-684.
- (188) Grundler, G.; Schmidt, R. R. *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1826-1847.
- (189) Schmidt, R. R.; Kinzy, W. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21-123.
- (190) Maunier, V.; Boullanger, P.; Lafont, D.; Chevalier, Y. *Carbohydr. Res.* **1997**, *299*, 49-57.
- (191) Brendel, K.; Gross, P. H.; Zimmermann Jr., H. K. *Liebigs Ann. Chem.* **1965**, *683*, 182-186.
- (192) Williams, J. M.; Richardson, A. C. *Tetrahedron* **1967**, *23*, 1369-1378.
- (193) Ljevakovic, D.; Tomic, S.; Tomašić, J. *Carbohydr. Res.* **1988**, *182*, 197-205.
- (194) Nashed, M. A. *Carbohydr. Res.* **1979**, *71*, 299-304.
- (195) Albert, R.; Dax, K.; Link, R. W.; Stütz, A. E. *Carbohydr. Res.* **1983**, *118*, C5-C6.
- (196) Nashed, M. A.; Anderson, L. *Carbohydr. Res.* **1983**, *114*, 53-61.
- (197) Lubineau, A.; Bienaymé, H. *Carbohydr. Res.* **1991**, *212*, 267-271.
- (198) El-Sokkary, R. I.; Silwanis, B. A.; Nashed, M. A.; Paulsen, H. *Carbohydr. Res.* **1990**, *203*, 319-323.
- (199) Lee, R. T.; Lee, Y. C. *Carbohydr. Res.* **1974**, *37*, 193-201.
- (200) Warren, C. D.; Jeanloz, R. W. *Carbohydr. Res.* **1977**, *53*, 67-84.
- (201) Nashed, M. A.; El-Sokkary, R. I.; Rateb, L. *Carbohydr. Res.* **1984**, *131*, 47-52.

- (202) Lay, L.; Nicotra, F.; Panza, L.; Russo, G.; Adobati, E. *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 509-514.
- (203) Sarkar, M.; Kabat, A. A. *Carbohydr. Res.* **1979**, *69*, 143-149.
- (204) Angyal, S. J. *Carbohydr. Res.* **1994**, *263*, 1-11.
- (205) Hobley, P.; Howarth, O.; Ibbett, R. N. *Magn. Resonance Chem.* **1996**, *34*, 755-760.
- (206) Flowers, H. M.; Shapiro, D. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2041-2043.
- (207) Galembo Jr., R. A.; Horton, D. *Carbohydr. Res.* **1983**, *119*, 231-240.
- (208) Shulman, M. L.; Khorlin, A. Y. *Carbohydr. Res.* **1973**, *27*, 141-147.
- (209) Rochepeau-Jobron, L.; Jacquinet, J.-C. *Carbohydr. Res.* **1998**, *305*, 181-191.
- (210) Fügedi, P.; Garegg, P. J. *Carbohydr. Res.* **1986**, *149*, C9-C12.
- (211) Garegg, P. J. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1997**, *52*, 179-205.
- (212) Singh, S.; Scigelova, M.; Critchley, P.; Crout, D. H. *Carbohydr. Res.* **1998**, *305*, 363-370.
- (213) Buskas, T.; Garegg, P. J.; Konradsson, P.; Maloisel, J.-L. *Tetrahedron Asymm.* **1994**, *5*, 2187-2194.
- (214) Wong, C.-H. *J. Chin. Chem. Soc.* **1999**, *46*, 271-281.
- (215) Kröger, L.; Henkensmeier, D.; Schäfer, A.; Thiem, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 73-75.
- (216) Cipolla, L.; Rescigno, M.; Leone, A.; Peri, F.; Ferla, B. L.; Nicotra, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1639-1646.
- (217) Togo, H.; He, W.; Waki, Y.; Yokoyama, M. *Synlett* **1998**, 700-717.
- (218) Giannis, A.; Sandhoff, K. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1479-1482.
- (219) Cipolla, L.; Lay, L.; Nicotra, F. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6678-6681.
- (220) Cipolla, L.; LaFerla, B.; Lay, L.; Peri, F.; Nicotra, F. *Tetrahedron Asymm.* **2000**, *11*, 295-303.
- (221) Keck, G. E.; Yates, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5829-5831.
- (222) Cui, J.; Horton, D. *Carbohydr. Res.* **1998**, *309*, 319-330.
- (223) Tarasiejska, Z.; Jeanloz, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6325-6327.
- (224) Röhrig, C. H.; Schmidt, R. R. *Eurocarb XI*: Lissabon, Portugal, 2001.
- (225) Roe, B. A.; Boojamra, C. C.; Griggs, J. L.; Bertozzi, C. R. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6442-6445.
- (226) SanMartin, R.; Tavassoli, B.; Walsh, K. E.; Walter, D. S.; Gallagher, T. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4051-4054.
- (227) Bamford, M. J.; Pichel, J. C.; Husman, W.; Patel, B.; Storer, R.; Weir, N. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1995**, 1181-1187.

- (228) Horton, D. *Org. Syn.* **1966**, *46*, 1-5.
- (229) Kirschning, A.; Bechtold, A. F.-W.; Rohr, J. *Top. Curr. Chem.* **1997**, *188*, 1-84.
- (230) Schene, H.; Waldmann, H. *Synthesis* **1999**, 1411-1422.
- (231) Marzabadi, C. H.; Franck, R. W. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8385-8417.
- (232) Ferrier, R. J.; Prasad, N. *J. Chem. Soc. C* **1969**, 570-575.
- (233) Tatsuta, K.; Fujimoto, K.; Kinoshita, M.; Umezawa, S. *Carbohydr. Res.* **1977**, *54*, 85-104.
- (234) Thiem, J.; Karl, H.; Schwentner, J. *Synthesis* **1978**, 696-698.
- (235) Thiem, J.; Schwentner, J. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 459-462.
- (236) Sabesan, S.; Neira, S. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5468-5472.
- (237) Bolitt, V.; Mioskowski, C.; Lee, S.-G.; Falck, J. R. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5812-5813.
- (238) Kaila, N.; Blumenstein, M.; Bielawska, H.; Franck, R. W. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4576-4578.
- (239) Wong, C.-H.; Look, G. C. (The Scripps Research Institute), *U. S. Patent* **1995**, 5.403.726; *Chem. Abstr.* **1995**, *122*, 313056.
- (240) Look, G. C.; Wong, C.-H. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4253-4256.
- (241) Danishefsky, S. J.; Bilodeau, M. T. *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1482-1522; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1380-1419.
- (242) Bashir, N. B.; Phythian, S. J.; Reason, A. J.; Roberts, S. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1995**, 2203-2222.
- (243) Kadereit, D.; Waldmann, H. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3367-3396.
- (244) Look, G. C.; Ichikawa, Y.; Shen, G.-J.; Cheng, P.-W.; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4326-4330.
- (245) Holla, E. W. *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 222-223; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 220-221.
- (246) Arita, H.; Fukukawa, K.; Matsushima, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1972**, *45*, 3614-3619.
- (247) Schmid, J.; Karrer, P. *Helv. Chim. Acta* **1949**, *32*, 1371-1378.
- (248) Barrette, E. P.; Goodman, L. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 176-178.
- (249) Barton, D. H. R.; McCombie, S. W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1975**, 1574-1585.
- (250) Rivera-Sagredo, A.; Jiménez-Barbero, J.; Martín-Lomas, M.; Solís, D.; Díaz-Mauriño, T. *Carbohydr. Res.* **1992**, *232*, 207-226.
- (251) Robins, M. J.; Wilson, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 932-933.
- (252) Rasmussen, J. R.; Slinger, C. J.; Kordish, R. J.; Newman-Evans, D. D. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4843-4846.

- (253) Paulsen, H.; Rutz, V.; Brockhausen, I. *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, 735-745.
- (254) Ichikawa, Y.; Lee, R. T.; Lee, Y. C. *J. Carbohydr. Chem.* **1990**, 9, 707-719.
- (255) Sybyl, Force Field; Tripos Inc.: St. Louis, 1999.
- (256) Card, P. J. *J. Carbohydr. Chem.* **1985**, 4, 451-487.
- (257) Schlosser, M. *Tetrahedron* **1978**, 34, 3-17.
- (258) Wilkinson, J. A. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 505-519.
- (259) Cox, D. P.; Terpinski, J.; Lawrynowicz, W. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 3216-3219.
- (260) Pilcher, A. S.; Ammon, H. L.; DeShong, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5166-5167.
- (261) Card, P. J. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 393-395.
- (262) Berkin, A.; Szarek, W. A.; Kisilevsky, R. *Carbohydr. Res.* **2000**, 326, 250-263.
- (263) Sharma, M.; Bernacki, R. J.; Paul, B.; Korytnyk, W. *Carbohydr. Res.* **1990**, 198, 205-221.
- (264) Rana, S. S.; Barlow, J. J.; Matta, K. L. *Carbohydr. Res.* **1983**, 113, 257-271.
- (265) Garegg, P. J.; Hultberg, H.; Wallin, S. *Carbohydr. Res.* **1982**, 108, 97-101.
- (266) Mampe, D. *Dissertation*, Universität Hamburg **2000**.
- (267) Kanie, O.; Crawley, S. C.; Palcic, M. M.; Hindsgaul, O. *Carbohydr. Res.* **1993**, 243, 139-164.
- (268) Ali, Y.; Richardson, A. C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1968**, 1764-1769.
- (269) Burger, P. J.; Nashed, M. A.; Anderson, L. *Carbohydr. Res.* **1983**, 119, 221-230.
- (270) Nadkarni, S.; Williams, N. R. *J. Chem. Soc.* **1965**, 3496-3498.
- (271) Richardson, A. C. *Carbohydr. Res.* **1969**, 10, 395-402.
- (272) Hasegawa, A.; Fletcher Jr., H. G. *Carbohydr. Res.* **1973**, 29, 209-222.
- (273) Hasegawa, A.; Fletcher Jr., H. G. *Carbohydr. Res.* **1973**, 29, 223-237.
- (274) Lindhorst, T. K. *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, 2000, 51.
- (275) Zehavi, U.; Sharon, N. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 3654-3658.
- (276) Alessandrini, A.; Schmidt, E.; Zilliken, F.; György, P. *J. Biol. Chem.* **1956**, 220, 71-78.
- (277) Distler, J. J.; Jourdian, G. W. *Methods Enzymol.* **1978**, 50, 514-520.
- (278) Nilsson, K. G. I. *Biotechnol. Lett.* **1996**, 18, 791-794.
- (279) Gambert, U.; Thiem, J. *Carbohydr. Res.* **1997**, 299, 85-89.
- (280) Gambert, U.; Gonzales Lio, R.; Farkas, E.; Thiem, J.; Verez-Bencomo, V.; Lipták, A. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 1285-1291.
- (281) Gonzales Lio, R.; Thiem, J. *Carbohydr. Res.* **1999**, 317, 180-190.

- (282) Gambert, U.; Conradt, H. S.; Nimtz, M.; Thiem, J. *J. Carbohydr. Chem.* **2000**, *19*, 621-629.
- (283) Wong-Madden, S. T.; Landry, D. *Glycobiol.* **1995**, *5*, 19-28.
- (284) Taron, C. H.; Benner, J. S.; Hornstra, L. J.; Guthrie, E. P. *Glycobiol.* **1995**, *5*, 603-610.
- (285) Blanchard, J. E.; Gal, L.; He, S.; Foisy, J.; Warren, R. A. J.; Withers, S. G. *Carbohydr. Res.* **2001**, *333*, 7-17.
- (286) Fujimoto, H. *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, *16*, 967-970.
- (287) Vetere, A.; Miletich, M.; Bosco, M.; Paoletti, S. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 942-949.
- (288) Ito, Y.; Sasaki, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 1270-1276.
- (289) Fujimoto, H.; Miyasato, M.; Ito, Y.; Sasaki, T.; Ajisaka, K. *Glycoconj. J.* **1998**, *15*, 155-160.
- (290) Naundorf, A.; Caussette, M.; Ajisaka, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 1313-1317.
- (291) Suzuki, K.; Fujimoto, H.; Ito, Y.; Sasaki, T.; Ajisaka, K. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1211-1214.
- (292) Derensy-Dron, D.; Krzewinski, F.; Brassart, C.; Bouquelet, S. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, *29*, 3-10.
- (293) Kitaoka, M.; Hayashi, K. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2002**, *14*, 35-50.
- (294) Farkas, E.; Thiem, J.; Krzewinski, F.; Bouquelet, S. *Synlett* **2000**, 728-730.
- (295) Lee, R. T.; Lee, Y. C. *Carbohydr. Res.* **1994**, *261*, 69-79.
- (296) Streicher, H. *Dissertation*, Universität Hamburg **1996**.
- (297) Gonzales Lio, R. *Dissertation*, Universität Hamburg **1998**.
- (298) Schmidt, D. *Dissertation*, Universität Hamburg **2000**.
- (299) Bornaghi, L.; Keating, L.; Binch, H.; Bretting, H.; Thiem, J. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2493-2497.
- (300) Danishefsky, S. J.; Behar, V.; Randolph, J. T.; Lloyd, K. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5701-5711.
- (301) Nam Shin, J. E.; Maradufu, A.; Marion, J.; Perlin, A. S. *Carbohydr. Res.* **1980**, *84*, 328-335.
- (302) Huber, R. E.; Gaunt, M. T. *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *220*, 263-271.
- (303) Holla, W.; Becker, G.; Stahl, W.; Schudok, M.; Sauerbrei, B.; Thiem, J., *Europ. Patent* **1993**, EP 0551107 A2; *Chem. Abstr.* **1993**, *119*, 179341.
- (304) Taubken, N.; Sauerbrei, B.; Thiem, J. *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, *12*, 657-667.
- (305) Petit, J.-M.; Paquet, F.; Beau, J.-M. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6125-6128.

- (306) Lehmann, J.; Zieger, B. *Carbohydr. Res.* **1977**, *58*, 73-78.
- (307) MacManus, D. A.; Grabowska, U.; Biggadike, K.; Bird, M. I.; Davies, S.; Vulfson, E. N.; Gallagher, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1999**, 295-305.
- (308) Kimura, T.; Takayama, S.; Huang, H.; Wong, C.-H.-. *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2503-2505; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2348-2350.
- (309) Cooper, J. A. D.; Smith, W.; Bacila, M.; Medina, H. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 445-448.
- (310) Whittaker, J. W. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2347-2363.
- (311) Mazur, A. W. In *Enzymes in Carbohydrate Synthesis*; Bednarski, M. D., Simon, E. S., Eds.; ACS Symposium Series: Washington, DC, 1991; Vol. 466, 99-110.
- (312) Tressel, P. S.; Kosman, D. J. *Methods Enzymol.* **1982**, *89*, 163-171.
- (313) Sharma, M.; Potti, G. G.; Simmons, O. D.; Korytnyk, W. *Carbohydr. Res.* **1987**, *163*, 41-51.
- (314) Liu, J. L.-C.; Shen, G.-J.; Ichikawa, Y.; Rutan, J. F.; Zapata, G.; Vann, W. F.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3901-3910.
- (315) Blair, M. G. *Methods Carbohydr. Chem.* **1963**, *2*, 415-418.
- (316) Weingarten, S. *Dissertation*, Universität Hamburg **2003**.
- (317) Withers, S. G.; Namchuk, M.; Mosi, R. In *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors*; Stütz, A. E., Ed.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 1999, 188-206.
- (318) Lehmann, J.; Schröter, E. *Carbohydr. Res.* **1972**, *23*, 359-368.
- (319) Brockhaus, M.; Lehmann, J. *Carbohydr. Res.* **1977**, *53*, 21-31.
- (320) Lehmann, J.; Schröter, E. *Carbohydr. Res.* **1977**, *58*, 65-72.
- (321) Micheel, F.; Klemer, A.; Baum, G. *Chem. Ber.* **1955**, *88*, 475-479.
- (322) Kitahata, S.; Brewer, C. F.; Genghof, D. S.; Sawai, T.; Hehre, E. J. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 6017-6026.
- (323) Schröder, S.; Schmidt, U.; Thiem, J.; Kowalczyk, J.; Kunz, M.; Vogel, M. *Tetrahedron* **2004**, im Druck.
- (324) Toshima, K.; Tatsuta, K. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1503-1531.
- (325) Davis, B. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2000**, 2137-2160.
- (326) Kröger, L.; Thiem, J. *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, *22*, 9-23.
- (327) Makosza, M. In *Compendium of Phase Transfer Reactions and Related Synthetic Methods*; 1 ed.; Keller, W. E., Ed.; Fluka AG: Buchs, 1979, XI-XIII.
- (328) Manning, W. B.; Khanna, P.; Choate, G. (Microgenics Corporation), *Europ. Patent* **1991**, EP 413561 A2; *Chem. Abstr.* **1991**, *115*, 130668.
- (329) Arenz, C.; Giannis, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 137-140.

- (330) Grabley, S.; Gareis, M.; Böckers, W.; Thiem, J. *Synth.* **1992**, 1078-1080.
- (331) Hanessian, S.; Lou, B. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4443-4464.
- (332) Hanessian, S.; Bacquet, C.; Lehong, N. *Carbohydr. Res.* **1980**, *80*, C17-C22.
- (333) Wagner, G.; Pischel, H. *Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges.* **1963**, *296*, 699-713.
- (334) Robinson, D.; Price, R. G.; Dance, N. *Biochem. J.* **1967**, *102*, 525-532.
- (335) Sernetz, M.; Willems, H.; Keiner, K. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, *613*, 333-337.
- (336) Komba, S.; Ito, Y. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8501-8505.
- (337) Vetere, A.; Novelli, L.; Paoletti, S. *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 515-521.
- (338) Yasukochi, T.; Inaba, C.; Fukase, K.; Kusumoto, S. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6585-6589.
- (339) Alemany, S.; Mato, J. M.; Strålfors, P. *Nature* **1987**, *330*, 77-79.
- (340) Larner, J.; Huang, L. C.; Schwartz, C. F.; Oswald, A. S.; Shen, T. Y.; Kinter, M.; Tang, G. Z.; Zeller, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *151*, 1416-1426.
- (341) Fonteles, M. C.; Huang, L. C.; Larner, J. *Diabetologia* **1996**, *39*, 731-734.
- (342) Romero, G.; Luttrell, L.; Rogol, A.; Zeller, K.; Hewlett, E.; Larner, J. *Science* **1988**, *240*, 509-511.
- (343) Rademacher, T. W.; Caro, H.; Kunjara, S.; Wang, D. Y.; Greenbaum, A. L.; McLean, P. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1994**, *27*, 327-341.
- (344) Ostlund Jr., R. E.; McGill, J. B.; Herskowitz, I.; Kipnis, D. M.; Santiago, J. V.; Sherman, W. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9988-9992.
- (345) Pak, Y.; Hong, Y.; Kim, S.; Piccariello, T.; Farese, R. V.; Larner, J. *Mol. Cells* **1998**, *8*, 301-309.
- (346) Asplin, I.; Galasko, G.; Larner, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5924-5928.
- (347) Kennington, A. S.; Hill, C. R.; Craig, J.; Bogardus, C.; Raz, I.; Ortmeier, H. K.; Hansen, B. C.; Romero, G.; Larner, J. *N. Engl. J. Med.* **1990**, *323*, 373-378.
- (348) Ortmeier, H. K.; Larner, J.; Hansen, B. C. *Obes. Res.* **1995**, *3*, 605S-608S.
- (349) Steadman, K. J.; Fuller, D. J.; Obendorf, R. L. *Carbohydr. Res.* **2001**, *331*, 19-25.
- (350) Ogawa, K.; Watanabe, T.; Ikeda, Y.; Kondo, S. *Carbohydr. Res.* **1997**, *302*, 219-222.
- (351) Schweizer, T. F.; Horman, I. *Carbohydr. Res.* **1981**, *95*, 61-71.
- (352) Quemener, B.; Brillouet, J.-M. *Phytochem.* **1983**, *22*, 1745-1751.
- (353) Steadman, K. J.; Burgoon, M. S.; Schuster, R. L.; Lewis, B. A.; Edwardson, S. E.; Obendorf, R. L. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2843-2847.
- (354) Horbowicz, M.; Brenac, P.; Obendorf, R. L. *Planta* **1998**, *205*, 1-11.
- (355) Berlin, W. K.; Zhang, W.-S.; Shen, T. Y. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1-20.

- (356) Cobb, J. E.; Johnson, M. R. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 21-30.
- (357) Martín-Lomas, M.; Flores-Mosquera, M.; Khiar, N. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1539-1545.
- (358) Jaenicke, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2962-2964.
- (359) Lind, D. L.; Daniel, R. M.; Cowan, D. A.; Morgan, H. W. *Enzyme Microb. Technol.* **1989**, *11*, 180-186.
- (360) Hart, J. B.; Kröger, L.; Falshaw, A.; Falshaw, R.; Farkas, E.; Thiem, J.; Win, A. L. *Carbohydr. Res.* **2003**, im Druck.
- (361) Kozikowski, A. P.; Fauq, A. H.; Powis, G.; Melder, D. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4528-4531.
- (362) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- (363) Falshaw, R.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.* **1995**, *269*, 183-189.
- (364) Lemieux, R. U. *Methods Carbohydr. Chem.* **1963**, *2*, 221-222.
- (365) Whitfield, D. M.; Meah, M.; Krepinsky, J. J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1993**, *58*, 159-172.
- (366) Horton, D.; Rodemeyer, G.; Saeki, H. *Carbohydr. Res.* **1977**, *59*, 607-611.
- (367) Stacey, M. *J. Chem. Soc.* **1944**, *146*, 272-274.
- (368) Wolfrom, M. L.; Yosizawa, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 3474-3476.
- (369) Castro-Palomino, J. C.; Schmidt, R. R. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5343-5346.
- (370) Shafizadeh, F. *Methods Carbohydr. Chem.* **1963**, *2*, 409-410.
- (371) Gryniewicz, G.; Priebe, W.; Zamojski, A. *Carbohydr. Res.* **1979**, *68*, 33-41.
- (372) Lin, T.-H.; Kovác, P.; Glaudemans, C. P. J. *Carbohydr. Res.* **1989**, *188*, 228-238.
- (373) Sabesan, S.; Paulson, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2068-2080.
- (374) Roth, W.; Pigman, W. *Methods Carbohydr. Chem.* **1963**, *2*, 405-408.
- (375) Hayashi, M.; Yamada, K.; Arikita, O. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 8331-8340.
- (376) Petersen, L.; Jensen, K. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2001**, 2175-2182.
- (377) Kominato, K.; Ogawa, S.; Suami, T. *Carbohydr. Res.* **1988**, *174*, 360-368.
- (378) Bukowski, R.; Morris, L. M.; Woods, R. J.; Weimar, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2697-2705.
- (379) Stevenson, D. E.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.* **1996**, *284*, 279-283.
- (380) Jansson, K.; Ahlfors, S.; Frejd, T.; Kihlberg, J.; Magnusson, G. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5629-5647.
- (381) Upreti, M.; Ruhela, D.; Vishwakarma, R. A. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6577-6584.
- (382) Farkas, E.; Thiem, J. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3073-3077.
- (383) Flowers, H. M.; Jeanloz, R. W. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 1377 - 1379.

- 
- (384) Ponpipom, M. M.; Bugianesi, R. L.; Shen, T. Y. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1717-1720.
- (385) Hwang, D. R.; Scott, M. E. *Bioorg. Chem.* **1993**, *21*, 284-293.
- (386) Kleine, H. P.; Weinberg, D. V.; Kaufman, R. J.; Sidhu, R. S. *Carbohydr. Res.* **1985**, *142*, 333-337.
- (387) Einhorn, A.; Pfyl, E. *Liebigs Ann. Chem.* **1900**, *311*, 26-77.
- (388) Hantzsch, A. *Liebigs Ann. Chem.* **1932**, *492*, 65-104.
- (389) Amaike, M.; Kobayashi, H.; Shinkai, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, *73*, 2553-2558.
- (390) Hanessian, S.; Saavedra, O. M.; Mascitti, V.; Marterer, W.; Oehrlein, R.; Mak, C.-P. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3267-3280.



**An dieser Stelle möchte ich herzlich allen danken, die direkt oder indirekt das Entstehen dieser Arbeit ermöglicht haben:**

Meinen Eltern und meiner Schwester, auf deren Unterstützung ich mich immer verlassen konnte und die mich auch in schwierigen Phasen geduldig ertragen haben.

Nico Nagorny, mit dem ich Lab 322, viele Ölpumpen und ungezählte Flaggen erobert habe und der mir ein sehr guter Freund wurde.

Joachim „ich schreib zusammen“ Reimer und Barbara Werschkun, die mich zur Kohlenhydrat-chemie und in den AK Thiem brachten, sowie Erzsébet Farkas und Raul Gonzales Lio, die mich mit ihrer Begeisterung für Galactosidasen infiziert haben.

Meinen Mitstreitern aus dem Sumpf 318: Saskia Weingarten für viele fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen und das Sightseeing in Lissabon, Dirk Schmidt, bei dem die Leitungen glühten, Karin Gorziza für ihre Ruhe und Ausgeglichenheit, Dirk Henkensmeier für tiefeschürfende Einblicke in absurde Theorien und seinen ungewöhnlichen Musikgeschmack und Angela Scheppokat, die australische Lebensfreude in den AK brachte und mir geduldig immer wieder die Dionex erklärte.

Den Bewohnern des Planeten 315: Dirk Mampe, mit dem ich den Himmel über Frankreich eroberte, René Suhr, der jede Literaturstelle schon kannte, Michael Ludewig, mit dem ich mitten in der Nacht Netzwirkabel verlegt habe, und Daniel Lazarevic für die köstlichen Emails als ich im Exil war.

Synke Rutschow für interessante nicht-chemische Gespräche und Björn Neubacher, der Labor 313 abwechslungsreich gestaltete und immer für ein Bierchen gut ist. Andreas Schäfer und Christian Sund, denen ich jederzeit in der Enklave 222 willkommen war.

Sven Schröder und Swantje Thiering, die beim gemeinsamen Sport Sorge trugen, dass mein Geist wenigstens einen halbwegs gesunden Körper bekommt.

Oliver Petermann und Collin von Lossow, die beide geflohen sind, mich aber trotzdem bei vielen Mensenbesuchen unterhaltsam vom Essen abgelenkt haben.

Kirsten Geisler, Lilia Marcienkiewicz und Joanna Krasowski, die mich immer mit Chemikalien, Geräten und Schokolade versorgt haben, sowie Angela Magirius und Martina Krasova für Unterstützung auf der administrativen Seite und Gundel Grasedyk, der guten Seele des AK.

Für ein immer offenes Labor mit Kuchen, Keksen und Cappuccino Volkmar Vill und seinem AK: Matthias „mach einen Kreis“ Paul, Gunnar Gesekus, der immer das letzte Wort hatte, Markus „Bond“ von Minden, Götz Milkereit, Gaja Peters, Sven „ich sehe hier kein Wettrüsten“ Gerber und Matthias Wulff, der mich nie zum Rudern bekehren konnte.

Thisbe Lindhorst und ihren Mitarbeitern Sven Kötter, Michael Dubber, Christoffer Kieburg und Ingo Aumüller, die uns ein tolles Labor vermacht haben. Aus dem AK Paulsen Frau Nürnberger, Nida Serttas und Meike Jungclaus für die Einweisung und Unterstützung bei der HPLC.

Richard Furneaux, Andrew Falshaw, Joanne Hart und allen anderen Kollegen im IRL für die interessante Zusammenarbeit in Wellington und Einblicke in die Inositolchemie.

Christian, Franck und besonders Dirk III, dem Lehrer und Nathalie für die unvergessene und abwechslungsreiche Freizeit in NZ, Susie für ein einzigartiges Xmas BBQ und meinen Flatmates Sarah, Kate, Steward und „Barney“, die es nicht geschafft haben, mir Cricket näher zu bringen.

Vladimir Křen und seinen Mitarbeitern für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis in Prag.

Da man von Kohlenhydraten alleine nicht leben kann, gilt mein Dank der DFG für die Förderung dieser Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 470 und des Graduiertenkollegs 464, sowie der Hanseatischen Stiftung zur Finanzierung meines Forschungsaufenthalts in Neuseeland.



## Lars Kröger

geboren am 18.01.1973 in Hamburg

### Schulbildung

08/79-07/83 Grundschule Frohmestraße, Hamburg  
08/83-07/92 Gymnasium Dörpsweg, Hamburg  
Abschluss: Abitur  
08/89-01/93 Berufsfachsschule für chemisch-technische Assistenz, Hamburg  
Abschluss: Staatlich geprüfter chemisch-technischer Assistent

### Studium

04/93-04/95 Chemie-Grundstudium an der Universität Hamburg  
Abschluss: Vordiplom  
04/95-07/98 Chemie-Hauptstudium an der Universität Hamburg  
Wahlpflichtfach Biochemie  
Abschluss: Diplom-Chemiker  
10/97-07/98 Diplomarbeit in Organischer Chemie im Arbeitskreis von Prof. Dr. J. Thiem, Universität Hamburg:  
Untersuchung zur Glycosylierung von Aromakomponenten und Darstellung von Glycoderivaten durch Amadori-Umlagerung  
seit 12/98 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. J. Thiem:  
Darstellung und chemoenzymatische Umsetzung modifizierter Substrate zur Synthese von Ligandbausteinen für Myelin-assoziiertes Glycoprotein  
01/99-12/01 Assoziiertes Mitglied im Graduiertenkolleg 464:  
Glycoconjugate: Darstellung, Analyse, Struktur und Funktion

### Auslandsaufenthalte

09/95-04/96 Erasmus-Studium an der University of Southampton, England  
09/00-10/00 Forschungsaufenthalt am Institut für Mikrobiologie, Tschechische Akademie der Wissenschaften in Prag, Tschechische Republik, Prof. Dr. V. Křen  
10/01-01/02 Forschungsaufenthalt im Carbohydrate Chemistry Team, Industrial Research Ltd., Lower Hutt, Neuseeland, Dr. R. H. Furneaux

### Beruflicher Werdegang

11/97-05/98: Studentische Hilfskraft zur Betreuung der NMR-Geräte im Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg  
08/98-09/99 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Sonderforschungsbereich 470: Glycostrukturen in Biosystemen – Darstellung und Wirkung  
09/99-09/00 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im integrierten Synthesepraktikum in anorganischer und organischer Chemie sowie im Fortgeschrittenenpraktikum in organischer Chemie  
10/00-06/03 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Organisch-chemischen Praktikum für Studierende mit Chemie im Nebenfach  
04/03-07/03 Forschungsprojekt im Auftrag der Fa. Glycom  
07/03-12/03 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Sonderforschungsbereich 470: Glycostrukturen in Biosystemen – Darstellung und Wirkung

