

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**

FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.

**DOTTORATO DI RICERCA
IN
SCIENZE CHIMICHE
(XXI CICLO)**

Sintesi ed utilizzazioni di bioligomeri macrociclici

Candidata:

*Dott.ssa
Cinzia Coppola*

Relatore:

Ch.mo Prof. Matteo Adinolfi

Tutore:

*Prof.ssa
Daniela Montesarchio*

*No painter would ever pretend to do better than Nature,
but no painter would stop painting for this reason.*

Stefan Matile

I RISULTATI DELLA RICERCA RIPORTATI IN QUESTA TESI DI DOTTORATO SONO STATI OGGETTO DELLE SEGUENTI PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE:

- D'Onofrio, J.; Coppola, C.; Di Fabio, G.; De Napoli, L.; Montesarchio, D.
“Novel cyclic phosphate-linked oligosaccharides (CyPLOS) covalently immobilized on solid supports for potential cation scavenging”
Eur. J. Org. Chem. **2007**, *23*, 3849-3858.
- Coppola, C.; Saggiomo, V.; Di Fabio, G.; De Napoli, L.; Montesarchio, D.
“Novel Amphiphilic Cyclic Oligosaccharides: Synthesis and Self-Aggregation Properties”
J. Org. Chem., **2007**, *72(25)*, 9679-9689.
- Coppola, C.; D'Onofrio, J.; Di Fabio, G.; De Napoli, L.; Montesarchio, D.
“Crown ether ring-fused nucleosides: synthesis and conformational properties”
Nucleic Acids Symposium Series No. 52, **2008**, 667-668.
- Licen, S.; Coppola, C.; D'Onofrio, J.; Montesarchio, D.; Tecilla P.
“CyPLOS: A new family of synthetic ionophores”
Org. Bio. Mol., inviato per la pubblicazione.
- Coppola, C.; Di Fabio, G.; De Napoli, L.; Montesarchio, D.
“A novel, versatile glucoside building block for multiply labelled glyco-architectures”
Manoscritto in preparazione.
- Coppola, C.; Vierno, A.; Randazzo, A.; Di Fabio, G.; De Napoli, L.; Montesarchio, D.
“Synthesis and conformational analysis of a novel carbohydrate-fused crown ether derivative (Crown-CyPLOS)”
Manoscritto in preparazione.

INDICE

	<i>Pag.</i>
PREMESSA	3
INTRODUZIONE	6
Ciclodestrine Modificate	9
Mimici di Oligosaccaridi Ciclici legati mediante ponti fosfodiesterici	12
Ciclodestrine Anfifiliche	14
Canali Ionici	18
Studio dei Canali Ionici	22

CAPITOLO

I

UNA NUOVA CLASSE DI OLIGOSACCARIDI CICLICI ANFIFILICI: SINTESI E PROPRIETÀ DI AUTOAGGREGAZIONE

1.0	Progettazione	25
2.0	Sintesi	27
3.0	Studi di aggregazione	32
3.1	Studio dell'Attività Ionofora	40
4.0	Parte Sperimentale	45

CAPITOLO II

UN *BUILDING BLOCK* VERSATILE PER LA PREPARAZIONE DI OLIGOSACCARIDI CICLICI ANFIFILICI

1.0	Progettazione	71
1.1	Sintesi dell'intermedio versatile	73
1.1.1	Uso di marcanti fluorescenti per studi di attività ionofora	77
2.0	Sintesi del CyPLOS tetradansilato	82
3.0	Studi di aggregazione	85
3.1	Spettri di fluorescenza	87
4.0	Parte sperimentale	89

CAPITOLO III

ETERI CORONA NELLA SINTESI DI IONOFORI ARTIFICIALI

1.0	Proprietà degli eteri corona	110
1.1	Ionofori artificiali contenenti eteri corona o ciclodestrine: una breve rassegna	112
2.0	Progettazione e sintesi del Crown-CyPLOS	115
3.0	Nucleosidi Crown: Sintesi e proprietà conformazionali	124
3.1	Strategia sintetica	126
4.0	Parte sperimentale	131

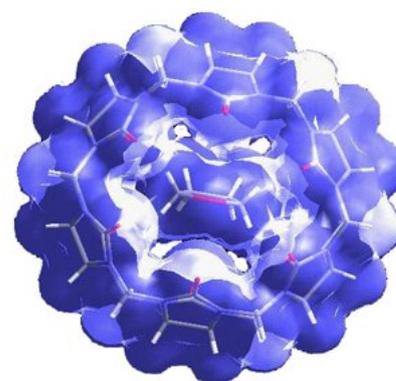
CONCLUSIONI	147
--------------------	-----

PREMESSA

“Atoms are letters, molecules are the words, supramolecules entities are the sentences and the chapters”

Questa sintetica frase di Jean-Marie Lehn racchiude in se l'importanza ed il grande fascino della chimica supramolecolare. Nel 1987, Jean-Marie Lehn insieme a Donald J. Cram e Charles J. Petersen vinceva il premio Nobel *“for their development and use of molecules with structure-specific interactions of high selectivity”*.

La chimica supramolecolare è stata definita come la “chimica dell'assemblamento molecolare e del legame intermolecolare”, nonché “la chimica dei legami non covalenti”.



Nata da geniali intuizioni e da casuali, fortunate combinazioni di prodotti di partenza non puri, la chimica supramolecolare¹ oggi riveste un ruolo di rilevante importanza in svariati ambiti della ricerca chimica e dell'industria. La chimica supramolecolare nasce come branca della chimica organica e lentamente si è sviluppata come materia altamente interdisciplinare che attrae non solo l'interesse dei chimici organici, inorganici e analitici, ma anche di biochimici, biologi, esperti in scienze ambientali, ingegneri, fisici dei materiali e teorici. Inoltre, occupa un ruolo cruciale nell'ambito delle nuove nanotecnologie.

Possiamo riassumere i principi fondamentali della chimica supramolecolare in:

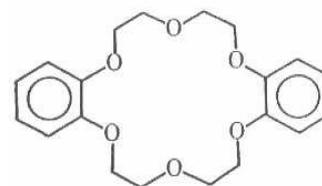
- *Concetto di recettore*: le molecole esplicano la loro funzione solo se sono legate tra loro.
- *Principio di riconoscimento molecolare*: la formazione di un complesso supramolecolare avviene tramite riconoscimento specifico tra la specie ospite (“*guest*”) ed il recettore (“*host*”). Tale recettore deve possedere, tra l'altro, una geometria strutturale complementare a quella dell'ospite.

¹ a) Votle, F., Ed. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Pergamon, Oxford, USA, 1996; b) Lehn, J.M. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, Wiley, Weinheim, 1995.

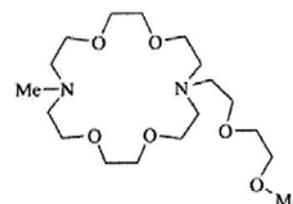
- *Legami non covalenti*: le specie che interagiscono formano complessi stabilizzati da interazioni di tipo non covalente. Tra le forze non covalenti si annoverano le interazioni ione-ione, ione-dipolo, dipolo-dipolo, legami idrogeno, interazioni di *stacking*, forze di van der Waals ed effetti idrofobici.
- *Pre-organizzazione*: la molecola “*host*” è rigidificata a priori in modo da assumere una conformazione adatta al riconoscimento di uno specifico “*guest*”. Questo determina un’elevata stabilità del complesso supramolecolare.
- *Auto-assemblaggio*: una nuova macrostruttura può essere generata dall’associazione spontanea, in determinate condizioni, di singole molecole o macromolecole.

Tra le numerose molecole potenziali “*host*” adatte a formare aggregati supramolecolari possiamo brevemente elencare:

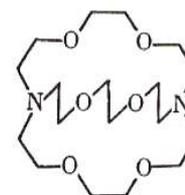
- Eteri corona: il dibenzo-[18]-crown-[6] è stata la prima molecola di origine sintetica a presentare un’elevata affinità di legame nei confronti di cationi, e più in particolare verso il potassio.



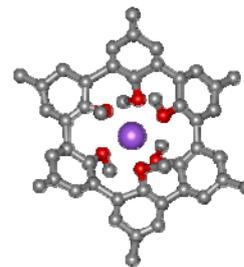
- Eteri lariati: queste molecole sono eteri corona, o macrocicli simili, che recano pendagli atti ad aumentarne la lipofilicità e ad offrire ulteriori siti di legame per cationi metallici. Tali pendagli conferiscono alla molecola una certa tridimensionalità e ne migliorano l’abilità complessante verso i cationi metallici.



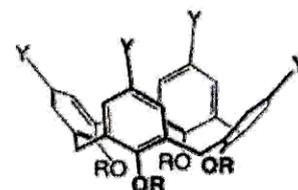
- Criptandi: versione tridimensionale degli eteri corona. Sintetizzati per la prima volta dal gruppo di ricerca di Jean-Marie Lehn, i criptandi presentano una maggiore selettività verso i cationi metallici e migliori capacità di trasporto paragonato rispetto agli eteri corona.



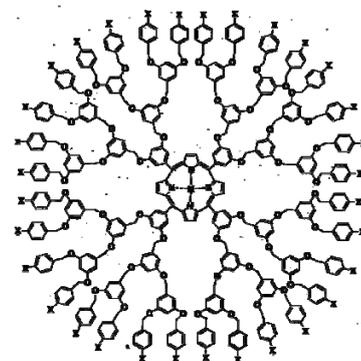
- Sferandi: sono molecole “*host*” rigide i cui siti donatori sono forzati a convergere verso una cavità centrale legante, anche in assenza di cationi metallici.



- Calixareni: hanno una forma toroidale simile a quella delle ciclodestrine e adottano varie conformazioni mostrando un comportamento dinamico. Adeguatamente funzionalizzate, tali molecole sono in grado di coordinare “*guest*” cationici, anionici e neutri.



- Dendrimeri: la loro rappresentazione grafica è molto simile alla ramificazione di un albero (*dendron* in greco significa albero). Anche in questo caso le proprietà della molecola variano molto a seconda dei gruppi funzionali presenti. Sono generalmente utilizzati come mimici di enzimi o per solubilizzare “*guest*” idrofobici.



INTRODUZIONE

Se analizziamo la *chimica supramolecolare* nel suo significato più semplice, come disciplina che studia aggregati stabilizzati da legami non covalenti o forme di complessazione, dobbiamo definire, innanzitutto, il tipo di interazioni in gioco. In questo contesto, generalmente si considera una molecola (“*host*”) che lega, in maniera specifica, un’altra molecola (“*guest*”) per generare una sovrastruttura o complesso “*host-guest*”² (Figura 1).

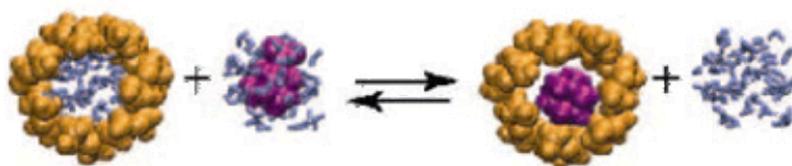


Figura 1 – *Complesso Host-Guest*

Generalmente l’“*host*” è una molecola, un aggregato o un complesso (ad esempio un enzima), oppure un composto di sintesi ciclico che possiede una cavità. Il “*guest*” può essere un catione monoatomico, un anione inorganico o una molecola più complessa (un ormone, un feromone, ecc.). Una definizione di complesso “*host-guest*” è stata data da Donald Cram nel 1986:

“I complessi sono composti da due o più molecole o ioni, tenuti insieme da forze elettrostatiche diverse dai legami covalenti...i complessi molecolari sono, generalmente, tenuti insieme da legami idrogeno, accoppiamento ionico, interazioni π -acide o π -basiche, legami ligando-metallo, forze di van der Waals e dalla parziale rottura e formazione di legami covalenti... L’alta organizzazione strutturale è generata da almeno un componente “*host*” e un componente “*guest*”...Una relazione “*host-guest*” coinvolge un arrangiamento stereoelettronico complementare dei siti di legame, sia della molecola “*host*” che del “*guest*”...”

Tra i numerosi macrocicli conosciuti, naturali o di sintesi, le ciclodestrine sono molecole “*host*” molto utilizzate, capaci di formare complessi stabili con un’ampia varietà di molecole “*guest*”.

Le ciclodestrine (CD) sono una classe di oligosaccaridi ciclici naturali in cui si individuano tre famiglie principali: le α -, β - e γ -ciclodestrine, formate rispettivamente da 6, 7 e 8 unità D-glucopiranosidiche, legate tra loro mediante legami α -(1→4)-*O*-glicosidici.

² Steed, J.W.; Atwood, J. *Supramolecular Chemistry*, Wiley, 2000.

Tridimensionalmente le CD vengono rappresentate come un toro rastremato a due facce, una primaria grande, da cui si affacciano i gruppi ossidrilici primari, e una secondaria più piccola, dalla quale emergono i gruppi ossidrilici secondari (*Figura 2*).

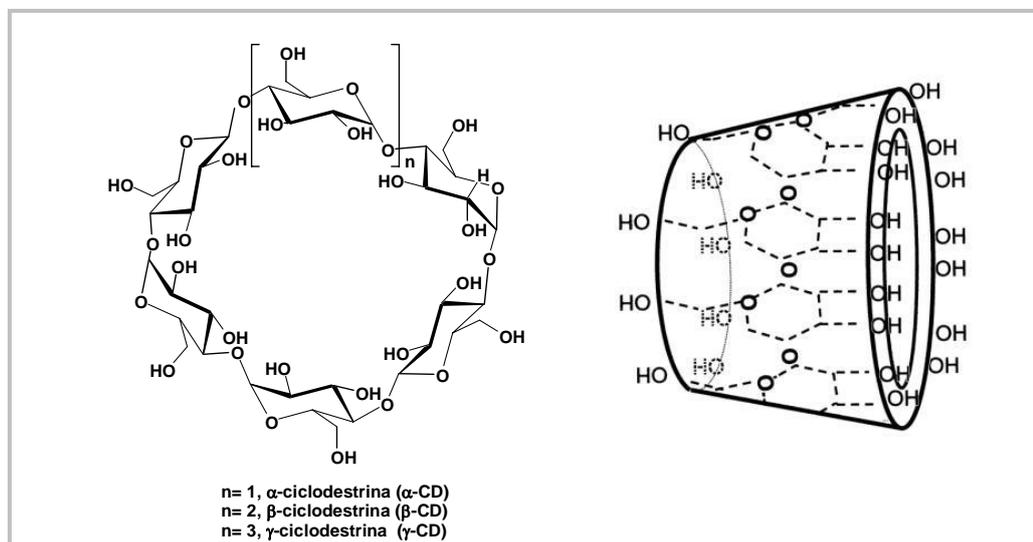


Figura 2 – Le Ciclodestrine (CD)

Tra gli ossidrili secondari in posizione 2 di un'unità saccaridica e quelli in posizione 3 dell'unità successiva si genera una fitta rete di legami idrogeno che rendono idrofobica la cavità interna, il che spiega la notevole capacità delle CD di complessare, in soluzione acquosa, sostanze apolari. Le dimensioni della cavità variano in funzione del numero di unità di glucosio presenti e il sistema altamente organizzato di legami idrogeno intramolecolari rende estremamente rigide queste strutture cicliche. Tale cavità rigida rappresenta un ottimo sito di ancoraggio per numerose specie “*guest*”, sia molecole neutre sia ioni.

La *driving force* della formazione del complesso è la sostituzione, all'interno della cavità idrofobica, di molecole d'acqua, cui è associata un'entalpia elevata, con una molecola “*guest*” di maggiore affinità, stabilizzata da forze di interazione non covalenti.

Tipicamente le CD formano con molecole apolari complessi di inclusione 1:1 in cui il “*guest*” è all'interno della cavità, ma talvolta si possono formare complessi di stechiometria 1:2, 2:2 e 2:1 (*Figura 3*).

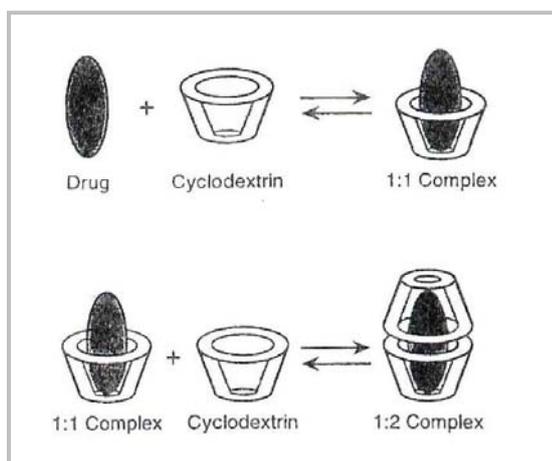


Figura 3 – Complessi “host–guest” di ciclodestrine

Nell’interazione ciclodestrina-ospite, si osservano variazioni di una serie di proprietà chimico-fisiche del “*guest*”³, alcune delle quali sono qui elencate:

- possono variare i *chemical shift* negli spettri NMR delle specie incluse, oppure specie “*guest*” non chirali, inserite nella cavità chirale delle ciclodestrine, mostrano attività ottica;
- in seguito alla formazione del complesso con la ciclodestrina, possono essere ampiamente minimizzati gli effetti tossici non desiderati;
- la reattività del “*guest*” generalmente può diminuire a seguito della formazione di un complesso stabile con la ciclodestrina; in altri casi, le ciclodestrine possono comportarsi come enzimi artificiali, incrementando la velocità delle reazioni o modificandone il decorso;
- una molecola ospite idrofobica, una volta complessata, diviene idrofilica, con modifiche nel comportamento cromatografico e aumento di solubilità in solvente acquoso;
- la diffusione e la volatilità del composto incluso diminuiscono drasticamente;
- la molecola “*guest*” viene protetta da reazioni di ossidazione o da effetti degradativi dovuti alla luce e/o al calore.

³ Freudenberg, K.; Cramer, F.; Plieninger, H. *Ger. Patent*, 895769, 1953.

CICLODESTRINE MODIFICATE

Nonostante siano innumerevoli le applicazioni delle CD naturali, queste presentano numerose limitazioni a causa della loro dimensione, forma prefissata e reattività dei gruppi funzionali. Le difficoltà nascono a causa della presenza della cavità idrofobica e dei numerosi gruppi ossidrilici presenti sul macrociclo.

Si può accedere ad una maggiore varietà di composti introducendo delle opportune modifiche chimiche sulla struttura di una ciclodestrina preformata. Le modifiche a carico delle ciclodestrine naturali possono essere molto utili per produrre, ad esempio, molecole dotate di elevata solubilità in acqua o in solventi organici, minimizzare o eliminare del tutto la già ridotta tossicità, migliorare la capacità complessante, aumentarne la biodegradabilità, ottenere degli opportuni *carrier* di specie ioniche o neutre attraverso le membrane biologiche, o anche, più in generale, modularne ed ottimizzarne le proprietà chimico-fisiche, nonché la loro capacità di complessazione e di veicolazione, in particolare di farmaci.

Essendo dei poli-idrossi composti, le CD possono essere facilmente trasformate, almeno in linea di principio, in un ampio numero di derivati mediante modifiche chimiche a carico dei gruppi ossidrilici. Variando la natura chimica delle CD, variano di conseguenza anche le proprietà chimico-fisiche della molecola, permettendo di generare, in questo modo, un ampio ventaglio di molecole con proprietà anche molto differenti.

Le prime e più semplici modifiche su ciclodestrine⁴ sono state eseguite sulle funzioni alcoliche, primarie e secondarie, presenti nel macrociclo glucopiranosidico. Una modifica necessaria per poter, poi, apportare le desiderate funzionalizzazioni è l'inserimento di un gruppo tosile su uno o più ossidrilici primari della CD. Le 6-tosil-ciclodestrine sono, infatti, importanti precursori di un gran numero di CD modificate, consentendo la sostituzione nucleofila del gruppo tosile con una gran varietà di nucleofili, come ad esempio ioduri, azidi, tioacetati, idrossilammine, alchil- o polialchil-ammine, a dare monoiodo-, azido-, tio-, idrossilammino- o alchilammino-ciclodestrine (*Figura 4*). Molti altri derivati, ottenuti dalla sostituzione del gruppo tosile, sono stati sintetizzati per studiarne le proprietà di complessazione e le principali caratteristiche chimico-fisiche.

⁴ Khan, A.R.; Forgo, P.; Stine, K.J.; D'Souza, V.T. *Methods for selective modification of cyclodextrins*. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977-1996.

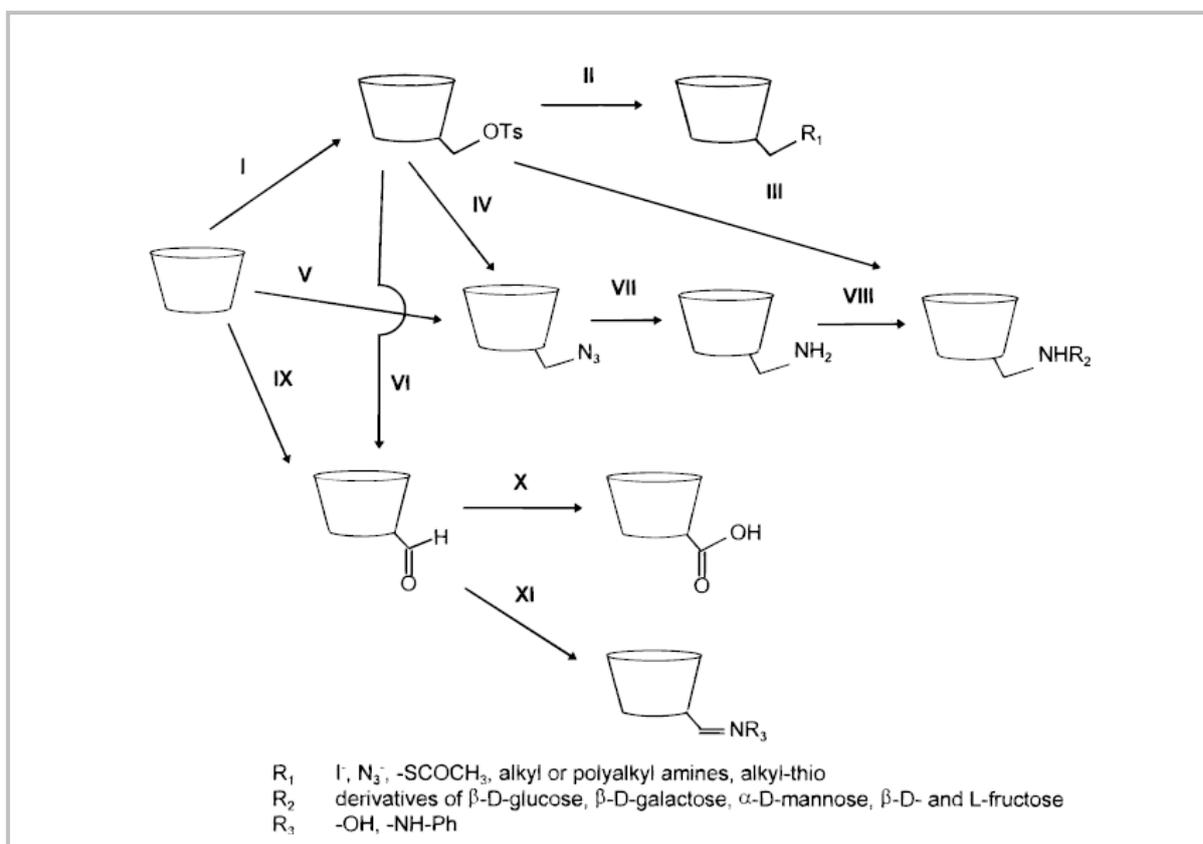


Figura 4 – Modifiche a partire di una ciclodestrina preformata

Una modulazione fine delle proprietà e della capacità di complessazione delle CD può essere ottenuta grazie a modifiche selettive dello scheletro oligosaccaridico. La sintesi totale, come strategia alternativa alla sintesi di CD modificate a partire da ciclodestrine naturali “preformate”, permette la “costruzione” di CD recanti motivi strutturali peculiari in specifiche posizioni. Negli ultimi anni, grande interesse è stato rivolto, da parte della comunità scientifica, alla sintesi *de novo* di mimici di ciclodestrine.

In letteratura esistono svariati esempi di ciclodestrine modificate a vari livelli. Esempi di modifiche possono riguardare il numero e la natura dei monosaccaridi costituenti il ciclo, ma anche il tipo di legame glicosidico fra le varie unità. La possibile esistenza di analoghi più piccoli delle CD naturali, contenenti fino a tre residui di α -D-glucopiranosio, è stata proposta da Lichtenthaler et al., sulla base di studi di *molecular modeling*⁵.

Oligosaccaridi ciclici di medie o grandi dimensioni possono essere sintetizzati a partire da unità di D-glucosio o altri derivati saccaridici mediante formazione di legami glicosidici alternativi ai classici legami α -(1 \rightarrow 4) glicosidici. Sono, infatti, riportati in letteratura⁶

⁵ a) Immel, S.; Brickmann, J.; Lichtenthaler, F.W. *Liebigs Ann.* **1995**, 929-942. b) Lichtenthaler, F.W.; Immel, S. In *Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins*, Budapest 1996; Szejtli, J., Szente, L., Eds.; Kluwer Academic: Dordrecht, 1996; pp 3-16.

⁶ Gattuso, G.; Nepogodiev, S.A.; Stoddart, J.F. *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1919-1958 e riferimenti ivi citati.

oligopiranosidi legati mediante legame glicosidico β -(1 \rightarrow 4) oppure legami glicosidici (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 6), ecc. (Figura 5).

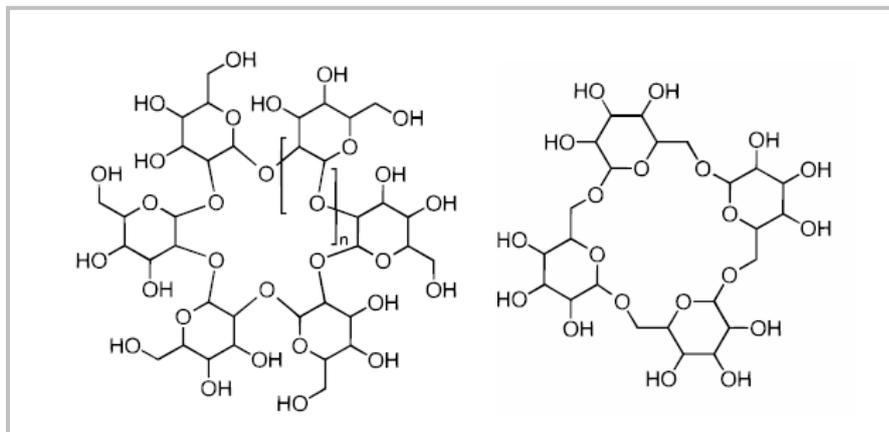


Figura 5 – Rappresentazione schematica di un oligosaccaride ciclico avente legami (1 \rightarrow 2) glicosidici, e di uno (1 \rightarrow 6) legato

La sintesi *de novo* risulta particolarmente vantaggiosa se all'interno del macrociclo si intende introdurre un nuovo motivo strutturale, quale un residuo saccaridico diverso da quelli costituenti le CD naturali; un esempio è costituito da un analogo della CD contenente un residuo di α -D-glucosammina (Figura 6).

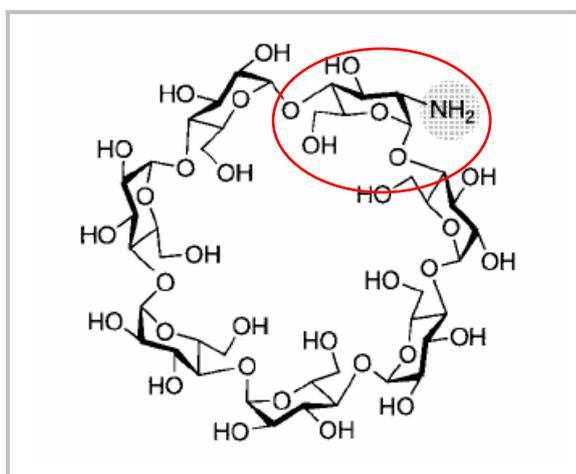


Figura 6 – Analogo della CD contenente un residuo di α -D-glucosammina

La sintesi *de novo* consente, inoltre di introdurre legami inter-residuo alternativi ai legami *O*-glicosidici, in modo da ottenere strutture più stabili nei confronti di idrolisi acide e degradazioni enzimatiche. Recentemente, sono infatti stati sintetizzati oligosaccaridi ciclici in

cui i legami glicosidici sono sostituiti da ponti butadiinici⁷, legami tio-glicosidici⁸, unità triazoliche⁹ (Figura 7).

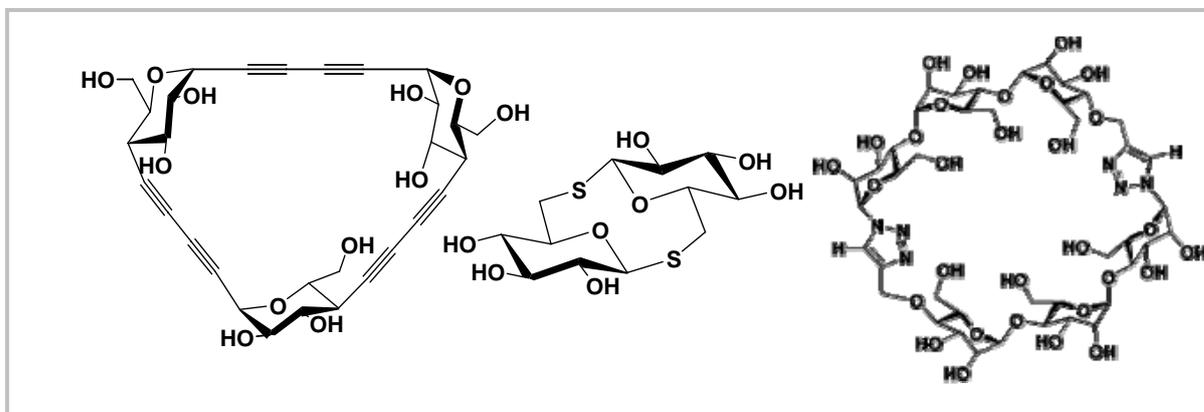


Figura 7 – Esempi di oligopiranosidi ciclici contenenti legami inter-residuo alternativi ai legami *O*-glicosidici; nell'ordine ponti butadiinici, legami tio-glicosidici, unità triazoliche

MIMICI DI OLIGOSACCARIDI LEGATI MEDIANTE PONTI FOSFODIESTEREI

Nell'ambito degli analoghi di oligosaccaridici ciclici contenenti unità glucopiranosidiche legate mediante legami alternativi al legame naturale (1→4)-*O*-glicosidico, recentemente, il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio lavoro ha messo a punto la sintesi di nuove strutture cicliche, definite **CyPLOS** (*Cyclic Phosphate-Linked Oligosaccharides*) contenenti residui di fenil-β-D-glucopiranoside legati mediante ponti 4,6-fosfodiesteri¹⁰.

Rispetto ai legami *O*-glicosidici, i ponti fosfodiesteri presentano diversi vantaggi¹¹, quali:

- notevole stabilità all'idrolisi acida ed alla degradazione enzimatica;
- facilità di sintesi per la possibilità di utilizzare una chimica ben nota ed ottimizzata nella sintesi classica in soluzione e in fase solida: la chimica del fosforamidito;

⁷ Hoffmann, B.; Bernet, B.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta*, **2002**, *85*, 265-287.

⁸ Fan, L.; Hindsgaul, O. *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 4503-4506.

⁹ Bodine, K. D.; Gin, D. Y.; Gin, M. S. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 20, 4479-4482.

¹⁰ a) Di Fabio, G.; Randazzo, A.; D'Onofrio, J.; Ausin, C.; Pedroso, E.; Grandas, A.; De Napoli, L.; Montesarchio, D. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*(9); 3395-3408. b) D'Onofrio, J.; Coppola, C.; Di Fabio, G.; De Napoli, L.; Montesarchio, D. *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 3849-3858.

¹¹ Nicolau, K.C.; Florke, H.; Egan, M.G.; Barth, T.; Estevez, V.A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1775-1778.

- a pH fisiologico i gruppi fosfato risultano carichi negativamente, per cui costituiscono siti di legame disponibili per complessare cationi di interesse biologico.

Dei **CyPLOS**, sono stati sintetizzati il dimero **1**, il trimero **2** ed il tetramero **3** (*Figura 8*) utilizzando sia una metodologia in fase solida, sia una classica strategia di sintesi in soluzione.

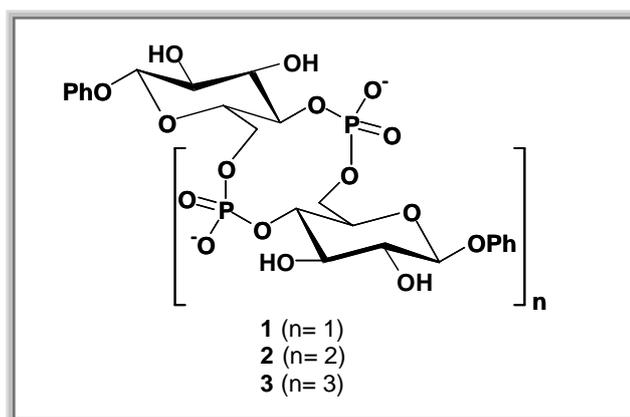


Figura 8 – *CyPLOS* sintetizzati

Questi macrocicli sono stati caratterizzati mediante analisi ^1H - e ^{31}P -NMR che, integrati con studi di meccanica e dinamica molecolare, hanno permesso di individuare le loro conformazioni sia in D_2O , sia in un solvente più strutturante, come il DMSO-d_6 .

L'analisi di questi dati ha mostrato che il dimero ciclico **1**, che possiede una simmetria C_2 , adotta in soluzione (sia in D_2O , sia in DMSO-d_6) una conformazione a “culla”, stabilizzata da forti legami idrogeno tra la carica negativa dei gruppi fosfato e gli adiacenti ossidrili in posizione 3 degli zuccheri (*Figura 9*).

Il trimero ciclico **2** invece, mostra comportamenti differenti a seconda della natura del solvente in cui è sciolto: in particolare, in D_2O , mostra una struttura molto flessibile, mentre in DMSO-d_6 sono presenti più famiglie di conformeri, in lento equilibrio sulla scala dei tempi NMR. Nel caso del tetramero ciclico, si osservano, in entrambi i solventi in cui è stato studiato, un ampio numero di famiglie di conformeri diversi in lento equilibrio tra loro, il che non ha consentito di svolgere un'accurata analisi strutturale.

Sulla base dei risultati ottenuti, è lecito attendersi che il ciclo formato dalle unità saccaridiche, alternate con i gruppi fosfato carichi negativamente, possa risultare un utile legante nei confronti di cationi, con il metallo coordinato all'interno della cavità formata dai gruppi fosfato e lo scheletro saccaridico.

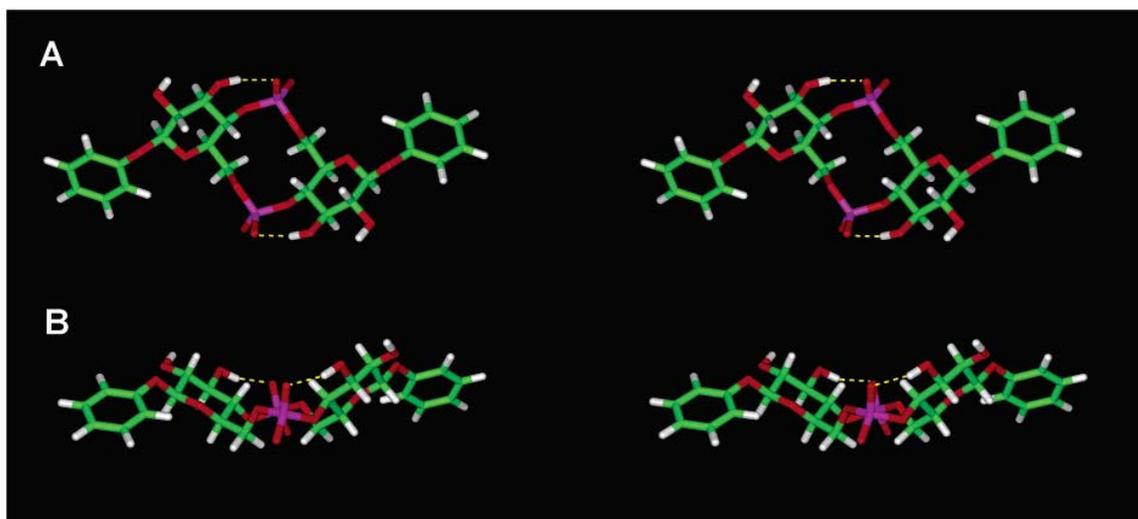


Figura 9 – In alto (A) e in basso (B), sono riportate le strutture tridimensionali del dimero CyPLOS, ricavate dagli studi NMR. Gli atomi di carbonio sono in verde, gli ossigeni in rosso, gli idrogeni in bianco, gli atomi di fosforo in magenta; i legami a idrogeno sono rappresentati con linee tratteggiate gialle

CICLODESTRINE ANFIFILICHE

Fin dalla loro scoperta ad opera di Villiers, e con la successiva dimostrazione delle loro capacità di inclusione, da parte di Schardinger e Pringsheim, le CD sono risultate protagoniste della chimica supramolecolare in acqua¹².

La possibilità di utilizzare le CD naturali per il trasporto di farmaci o di *targeting agent* è stato il primo stimolo per i ricercatori a studiare questi sistemi come incapsulatori molecolari¹³.

Purtroppo, però, da questo punto di vista non sono stati compiuti significativi progressi e il ruolo delle CD naturali si è ridotto, dal punto di vista farmaceutico, a quello di agenti solubilizzanti o additivi. La complessazione con farmaci, nella maggior parte dei casi, offre vantaggi solo per quanto riguarda una maggiore solubilità del farmaco in ambiente acquoso e una riduzione degli effetti collaterali. Inoltre, in generale, in un complesso con le CD, la costante di associazione è dell'ordine delle 10^2 - 10^4 M e questo valore non è particolarmente efficace per il trasporto di farmaci, dal momento che la dissociazione avviene velocemente in soluzioni diluite. Questo spiega perché, negli ultimi trent'anni, la ricerca ha posto l'attenzione sulle strategie adatte a modificare chimicamente le CD naturali così da avere cooperazione fra le cavità "host". La più semplice ed efficace cooperazione è stata ottenuta realizzando dei dimeri covalenti; viceversa, l'introduzione di CD all'interno di polimeri non ha fornito particolari vantaggi in termini di cooperazione.

¹² Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1753.

¹³ Sallas, F.; Darcy, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 957-969 e riferimenti ivi citati.

Nel caso di CD coniugate a polirotaxani, una migliore cooperazione è dettata dalla natura delle molecole “*guest*”: ad esempio, nel caso di un “*guest*” lineare, quale un polietere, le CD sono indotte a disporsi in una maniera che ricorda l’elica dell’amilosio complessato con gli acidi grassi.

Dal punto di vista strutturale è risultato vantaggioso l’inserimento di appropriati motivi che rendono la molecola complessivamente anfifilica (Figura 10)¹².

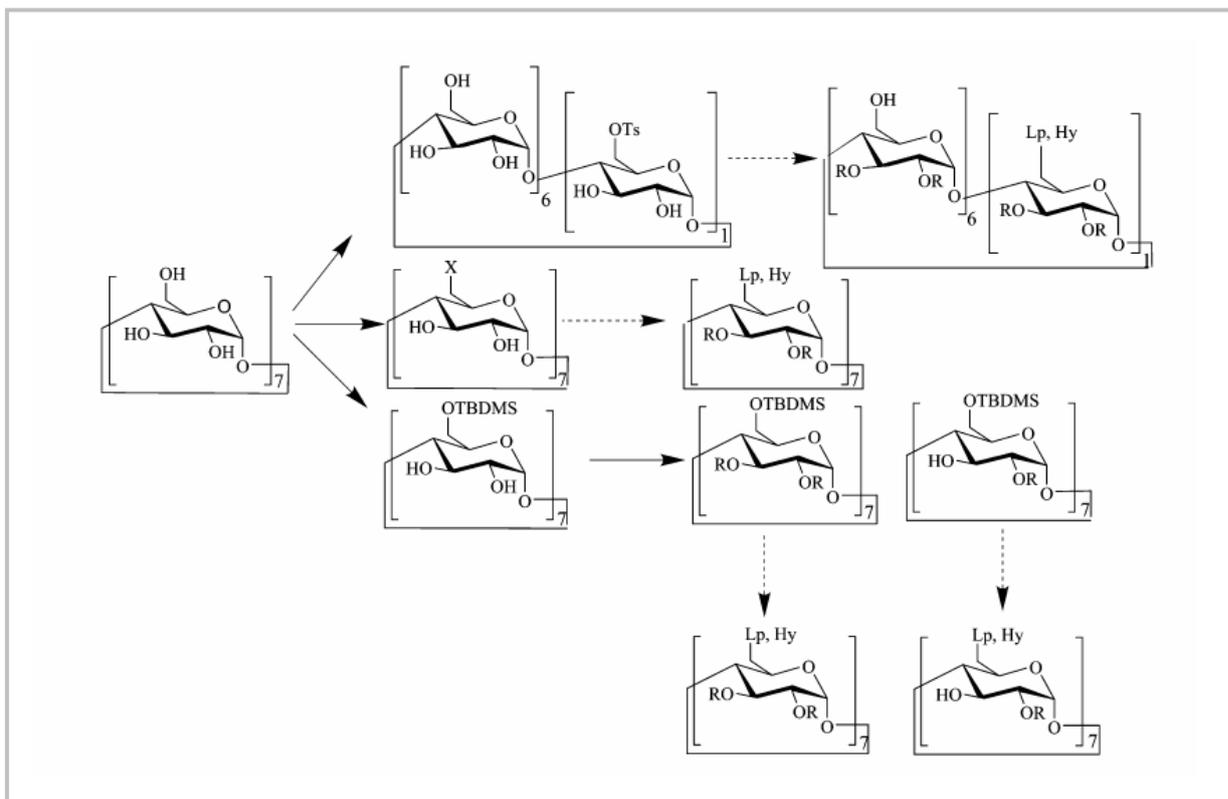


Figura 10 – Strategie sintetiche generali per la preparazione di Ciclodestrine anfifiliche; Lp =lipofila, Hy = idrofila; per Lp, R è un residuo idrofilo; per Hy, R è un residuo lipofilo

Le molecole anfifiliche, a seconda della concentrazione in acqua e della loro natura idrocarburica, passano per vari stati fisici. Presenti in forme monomeriche quasi completamente solvate a basse concentrazioni, con l’aumentare della concentrazione tendono a formare sistemi supramolecolari di varia complessità, stabilizzati da interazioni tra i vari monomeri per effetto solvofobico, e dalla disposizione dei monomeri all’interfaccia aria-acqua per ridurre l’energia libera del sistema. In seguito ad un ulteriore aumento della concentrazione del tensioattivo, si raggiunge un valore limite, definito concentrazione micellare critica (*c.m.c.*), in cui si osserva la formazione di aggregati micellari, ovvero supramolecole costituite da 50-200 unità, dalla forma approssimativamente sferica, il cui raggio è circa uguale alla lunghezza della catena alchilica. A concentrazioni molto superiori alla *c.m.c.* si passa alla formazione di aggregati ellissoidali e poi cilindrici, fino ad ottenere

strutture di tipo liquido-cristallino, che derivano da una disposizione parallela degli aggregati secondo un reticolo di micelle cilindriche, con l'acqua localizzata sulle superfici e nelle intercapedini.

In solventi organici apolari, le molecole anfifiliche danno luogo alla formazione di aggregati supramolecolari che prendono il nome di micelle inverse o rovesciate. In questo caso le code idrocarburiche del tensioattivo sono rivolte verso la fase organica, mentre le teste polari sono rivolte verso la parte interna della struttura, in maniera tale da minimizzare il contatto con il solvente. Le micelle inverse sono in grado di solubilizzare quantità relativamente grandi di acqua nel *core* della struttura, formando delle *water-pool* e offrendo, quindi, un microambiente ideale per la solubilizzazione di soluti polari o ionici in solventi apolari. Per queste caratteristiche le micelle inverse, attraversando il doppio strato lipidico costituente le membrane cellulari, potrebbero essere efficacemente utilizzate per l'ingresso di composti ionici in cellula. In questo ambito, le CD anfifiliche hanno mostrato risultati incoraggianti; queste infatti in acqua sono capaci di auto-organizzarsi a formare superstrutture quali monostrati, micelle, vescicole.

Il primo esempio di CD anfifiliche, riportato da Kawabata et al nel 1986¹³, ha previsto gli ossidrili primari della β -CD derivatizzati con gruppi alchil-sulfonici di varia lunghezza. Sono stati, così, ottenuti monostrati all'interfaccia aria-acqua in cui gli ossidrili secondari idrofilici sono rivolti alla fase acquosa ed è stato possibile studiare l'inclusione del colesterolo con il monostrato. Essendo capaci di formare aggregati e di interagire specificamente con molecole "guest", le ciclodestrine anfifiliche rappresentano un notevole potenziale nel campo della chimica supramolecolare.

Proprietà chimico-fisiche interessanti sono state ottenute derivatizzando le ciclodestrine con lunghi tentacoli lipofili, così da associare la spiccata capacità complessante delle CD con le caratteristiche idrofobiche di catene alchiliche¹⁴ o polieteree¹⁵ (Figura 11), dando origine a molecole anfifiliche con buone capacità di auto-aggregazione.

¹⁴ Mori, M.; Ito, Y.; Ogawa, T. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3029-3030.

¹⁵ Tabushi, I.; Kuroda, Y.; Yokota, K. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23(44)*, 4601-4604.

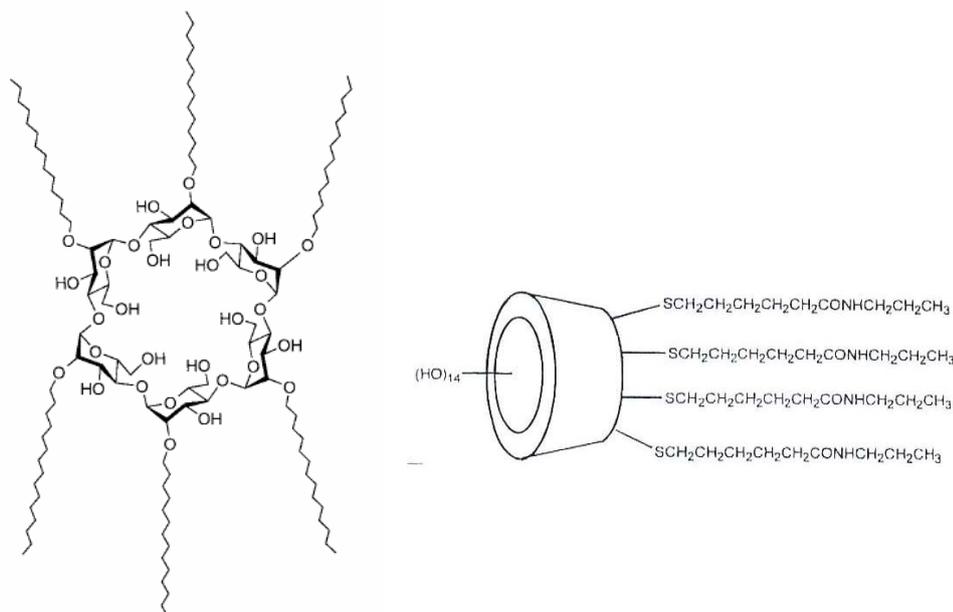


Figura 11 – *Ciclodestrine derivatizzate con catene alchiliche o con catene polieteree*

Ovviamente, il tipo di struttura supramolecolare che esse adottano dipende anche dalla natura del solvente; infatti, in un solvente polare formano strutture micellari, mentre in un solvente organico apolare le CD anfifiliche danno luogo alla formazione di micelle inverse. In questo secondo tipo di strutture possono essere inglobati svariati “*guest*” polari o ionici che risultano pertanto solubilizzati in solventi apolari. Data la loro struttura anfifilica, queste molecole sono solvate in soluzioni diluite, ma tendono a formare aggregati supramolecolari all’aumentare della concentrazione.

Con queste modifiche le CD, così come molti composti anfifilici, risultano in grado di formare aggregati micellari, pori artificiali o canali ionici secondo varie strutture supramolecolari tipo “*barrel-rosette*”, “*barrel-hoop*” o “*barrel-stave*”¹⁶ (Figura 12).

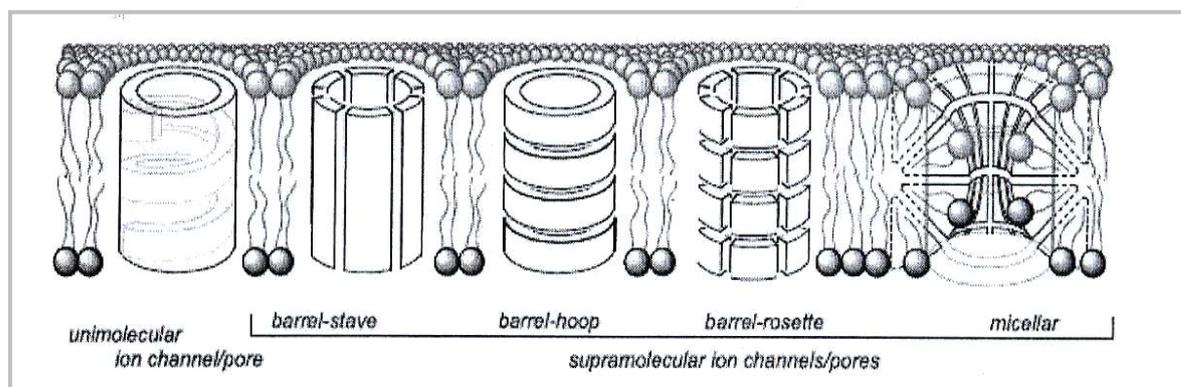
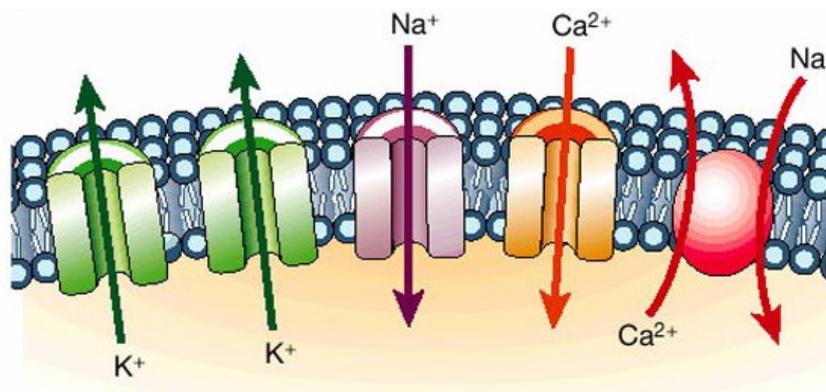


Figura 12 – *Strutture supramolecolari adottate da molecole anfifiliche*

¹⁶ Matile, S.; Som, A.; Sordè, N. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6405-6435.

I CANALI IONICI

Le membrane biologiche, e i numerosi componenti in queste dispersi, formano una barriera tra l'interno della cellula e l'ambiente esterno, attraverso la quale solo gas e piccole molecole neutre possono passare¹⁷. Il doppio strato lipidico, infatti, è impermeabile alle molecole di grosse dimensioni, alle molecole polari e agli ioni. Trasportatori di membrana sono, quindi, fondamentali affinché specie cariche, e in particolare ioni minerali, possano attraversare il doppio strato fosfolipidico. Il trasporto di ioni, in natura, avviene o sfruttando degli appositi canali ionici o per mezzo di pompe ioniche.



I canali ionici sono “trasportatori passivi”; il flusso di ioni attraverso il canale è regolato da un gradiente di concentrazione degli ioni. Le pompe ioniche, invece, sono “trasportatori attivi”; il flusso degli ioni avviene contro il loro gradiente di concentrazione creando così un gradiente elettrochimico attraverso le membrane. L'energia richiesta per attivare le pompe è fornita da una sorgente di energia esterna, come ad esempio l'idrolisi di ATP (Figura 13).

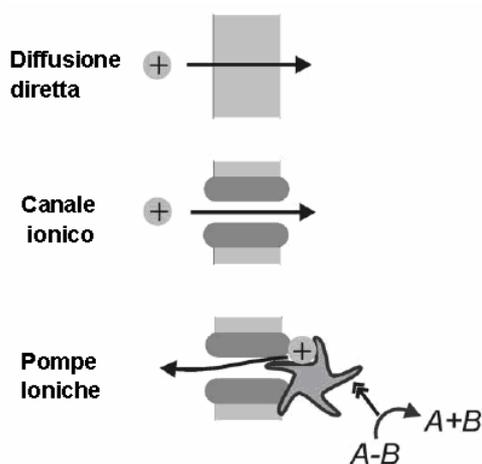


Figura 13 – Schema generico del trasporto di ioni attraverso una membrana, mediante diffusione diretta (in alto) o mediata da canale ionico (al centro). Entrambi i processi sono guidati da un gradiente di concentrazione. Le pompe ioniche (in basso) utilizzano l'energia liberata da una reazione (rottura del legame tra A-B) per mediare il trasporto di ioni contro il loro gradiente di concentrazione

¹⁷ Simons, K.; Vaz, W.L.C. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, *33*, 269.

In particolare, la selettività nel processo di trasporto (“specificità”) è essenziale affinché la concentrazione e il bilanciamento ionico sia mantenuto costante all’interno della cellula¹⁸. Un’ importante caratteristica, fondamentale nella funzione fisiologica dei canali ionici, è proprio la selettività nei confronti degli ioni. I canali ionici possono essere, infatti, classificati come canali anionici o cationici in base alla loro capacità di discriminare le varie specie ioniche¹⁹.

I canali ionici naturali sono stati ampiamente studiati negli ultimi decenni, ma solo recentemente ne sono stati compresi i dettagli strutturali, mentre il loro meccanismo d’azione rimane, in alcuni casi, oggetto solo di plausibili ipotesi. La chimica supramolecolare è stata a lungo ispirata dal funzionamento dei canali e pompe ioniche naturali e ha prodotto un ampio numero di sistemi biomimetici per il trasporto di ioni, in modo da riprodurre la funzione di trasporto mediante piccole molecole e composti di sintesi²⁰. Questa sfida è motivata dalla curiosità di comprendere a fondo, a livello molecolare, la funzione biologica di questi sistemi di membrana, poiché i trasportatori di ioni sono coinvolti in un gran numero di processi utili in contesti farmaceutici o tecnologici. Infatti, molti ionofori sintetici mostrano attività antimicrobica e antiproliferativa. Altra potenziale applicazione è il trasporto di farmaci, e notevoli utilizzazioni possono essere previste anche nel campo della sensoristica.

Forte ispirazione per il *design* di canali ionici artificiali è la gramicidina, un pentadecapeptide formato da un’alternanza di D- ed L-amminoacidi che in membrana forma delle β -eliche con la porzione idrofila rivolta verso l’interno e le catene laterali, lipofile, rivolte verso l’esterno. La lunghezza dell’elica generata dalla gramicidina è circa la metà dello spessore del doppio strato lipidico; le molecole di gramicidina formano un dimero stabilizzato da sei legami idrogeno intermolecolari. La struttura risultante crea un “tunnel” attraverso la membrana, fornendo un ottimo canale per i cationi alcalini (*Figura 14*). Anche l’anfotericina, un noto antibiotico, è capace di formare un canale all’interno del doppio strato fosfolipidico, consentendo così il passaggio di ioni.

¹⁸ Gokel, G.W.; Daschbach, M.M. *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, *252*, 886-902.

¹⁹ a) Ashcroft, F.M. *Ion Channels and Disease*, Academic Press, California, **2000**, pp. 1-2; b) Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed., Sinauer, Sunderland, MA, **2001**, pp. 1-5.

²⁰ Fyles, T.M. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 335-347 e riferimenti ivi citati.

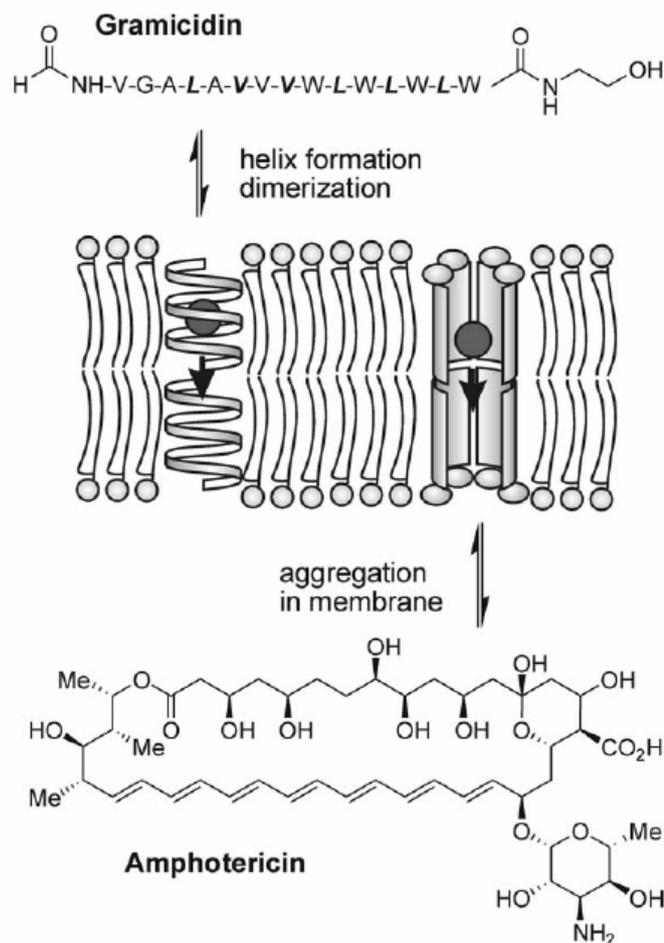


Figura 14 – Esempi di canali ionici formati da composti naturali, quali la gramicidina e l'anfotericina

Canali ionici selettivi per il trasporto di cationi e anioni, sono stati, quindi, ampiamente studiati negli ultimi anni e sono stati sviluppati molti analoghi di sintesi nei quali sono presenti motivi strutturali anche molto diversi fra loro, quali gli eteri corona (**a**, *Figura 15*)²¹, i peptidi (**b**, *Figura 15*)²² e i calixareni (**c**, *Figura 15*)²³.

²¹ Fyles, T.M.; James, T.D.; Kaye, K.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12315-12321.

²² Clark, T.D.; Buehler, L.K.; Ghadiri, M.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651-656.

²³ Matthews, S.E.; Schmitt, P.; Felix, V.; Drew, M.G.B.; Beer, P.D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1341-1353.

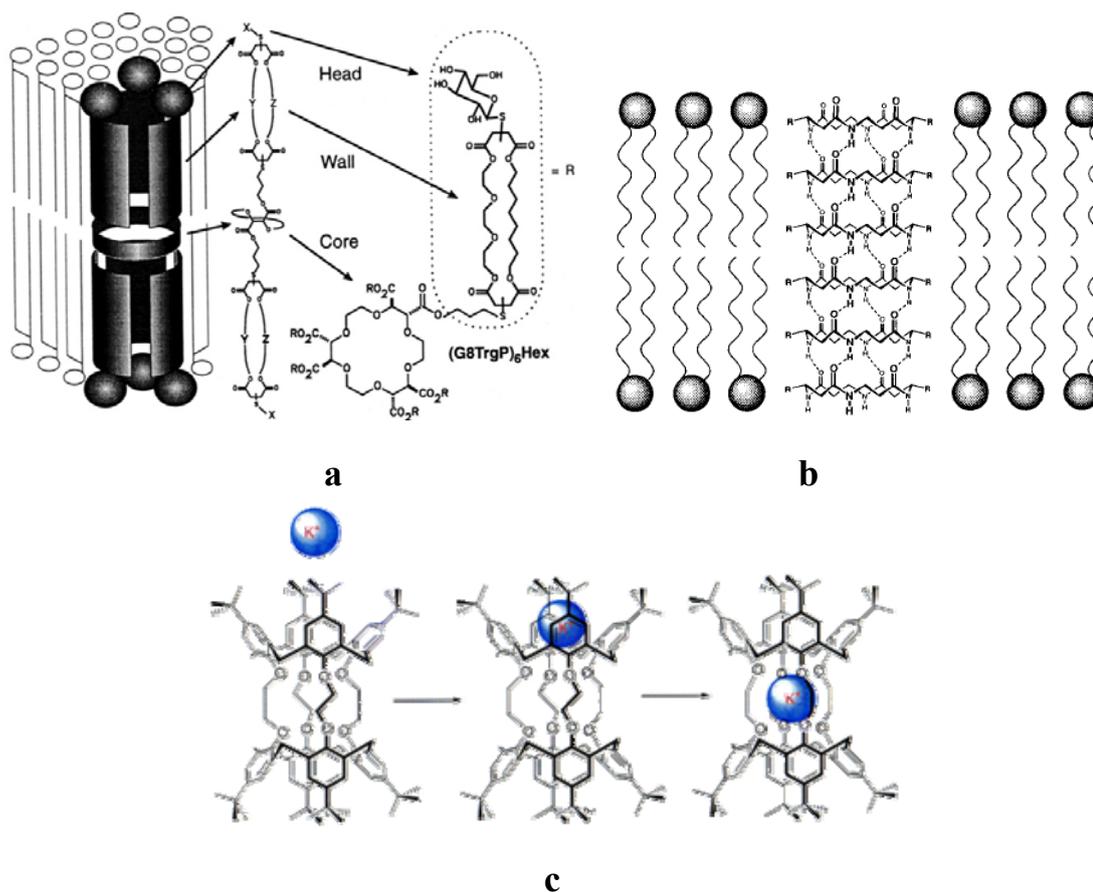


Figura 15 – Canali ionici di sintesi

In un recente lavoro, il gruppo di ricerca di Mary S. Gin ha descritto la sintesi di un canale ionico (Figura 16) attivo, basato su una β -ciclodestrina derivatizzata con catene polieteree legate agli ossidrili primari della CD²⁴. Questa molecola ha mostrato non solo selettività nei confronti di anioni rispetto ai cationi, ma è anche in grado di discriminare gli ioni alogenuro ($\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$). Il macrociclo crea un poro sulla superficie della membrana funge da porta d'ingresso, mentre le catene idrofobiche si inseriscono nella membrana e consentono il trasporto degli ioni. Le catene sono sufficientemente lipofile da permettere l'inserzione del macrociclo all'interno del doppio strato fosfolipidico e sufficientemente lunghe da permettere al canale ionico di attraversare completamente la membrana (ca. 35-40-Å).

²⁴ Gin, M.; Madhavan, N.; Robert, E.C. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl* **2005**, *44*, 7584-7587.

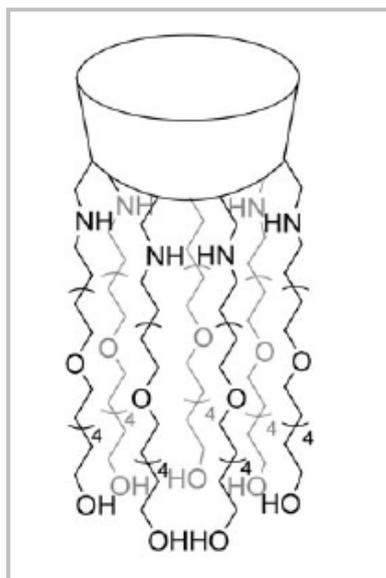


Figura 16 – Canale ionico ottenuto derivatizzando una β -ciclodestrina con catene polieteree

STUDIO DEI CANALI IONICI

Un' importante sfida per i ricercatori impegnati nel campo dei canali ionici è l'aspetto della caratterizzazione. Negli ultimi anni sono stati sviluppati ed adottati diversi metodi analitici²⁵ per caratterizzare il trasporto di ioni. In questo paragrafo sono brevemente descritti i principali metodi utilizzati in questo tipo di studi.

- *Trasporto di protoni seguiti via fluorescenza*

Un metodo ampiamente utilizzato per studiare l'attività di ionofori artificiali sfrutta il saggio dell' HPTS¹⁸ (sale trisodico dell'acido trisolfonico dell'8-idrossipirene), un colorante fluorescente sensibile al pH (pK_a 7.3). Le vescicole sono preparate in modo da inglobare all'interno questo sale, lo ionoforo è introdotto nella vescicola e si realizza, poi, un gradiente di pH mediante aggiunta di una base forte alla soluzione esterna (*Figura 17*). Il collasso del gradiente di pH viene monitorato seguendo la variazione di fluorescenza dell'indicatore all'interno della vescicola, che può trovarsi nella sua forma acida o nella corrispondente base coniugata, a seconda del passaggio di ioni H^+ .

²⁵ Gokel, G.W.; Carasel, I.A. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 378-389.

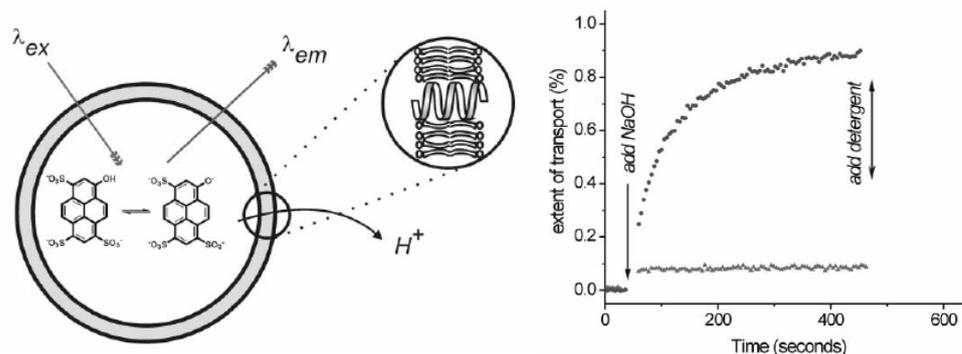


Figura 17 – Trasporto di protoni seguiti via fluorescenza

In alternativa, *marker* fluorescenti possono essere introdotti direttamente nella struttura dello ionoforo in modo da poter determinare, così, la posizione e il meccanismo d'azione dello ionoforo in analisi: molti *marker* fluorescenti sono altamente sensibili al microambiente in cui sono dispersi e danno chiare risposte anche a basse concentrazioni.

Grazie alla presenza di gruppi fluorescenti sulle strutture ionofore è possibile, ad esempio, sfruttare la microscopia confocale ottica per visualizzare la posizione dello ionoforo all'interno di un batterio e verificare, in questo modo, se lo ionoforo tende a disporsi sulla superficie o all'interno della membrana²⁶.

- *Spettroscopia al ²³Na-NMR*

Un metodo per misurare il trasporto di metalli alcalini attraverso le membrane cellulari è stato studiato da Riddell²⁷ e i suoi collaboratori ed è spesso utilizzato per studiare il trasporto degli ioni Na⁺.

Le vescicole sono preparate con una soluzione contenente NaCl: l'analisi della sospensione effettuata mediante spettroscopia ²³Na-NMR mostra un unico picco relativo ai nuclei ²³Na⁺, essendo gli ioni all'interno ed all'esterno della vescicola magneticamente equivalenti. Con l'aggiunta di un reagente lantanide di *shift* si osserva uno spostamento del segnale dovuto ai cationi Na⁺ all'esterno della membrana.

²⁶ Leevy, W.M.; Donato, G.M.; Ferdani, R.; Goldman, W.E.; Schlesinger, P.H.; Gokel, G.W. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9022-9023.

²⁷ Riddell, F.G.; Tompsett, S.J. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *990*, 193.

Data l'abbondanza, il segnale relativo agli ioni Na^+ esterni alla vescicola è nettamente più intenso rispetto a quello degli Na^+ interni. Quando lo ionoforo viene aggiunto alla sospensione, esso si ripartisce in membrana e consente il trasporto di ioni. In questo modo il flusso di ioni Na^+ può essere monitorato seguendo la variazione nel tempo dei segnali del ^{23}Na , determinando così la costante di velocità per il trasporto (Figura 18).

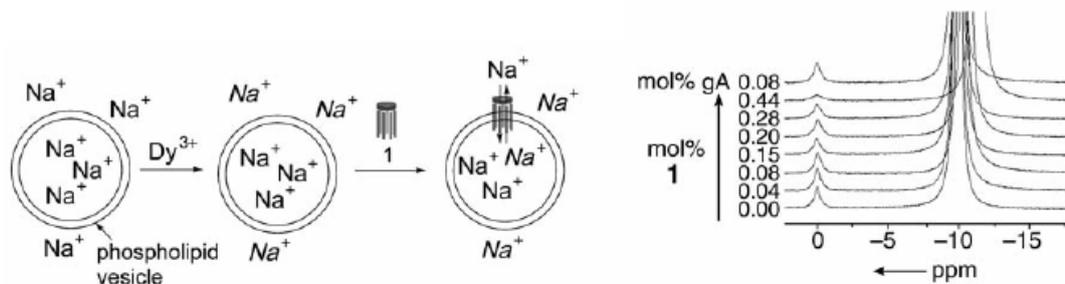


Figura 18 – Attività ionofora monitorata mediante spettroscopia ^{23}Na -NMR

- *Elettrodi ioni-selettivi*

Questo metodo permette di valutare la selettività dello ionoforo in esame nei confronti di Na^+ o Cl^- . Le vescicole vengono preparate in presenza dello ione d'interesse (quindi Na^+ o Cl^-) e poi lavate con una soluzione in cui non sia presente lo ione di interesse. Un microelettrodo viene inserito nell'ambiente in cui è disposta la vescicola, dopodiché è aggiunto lo ionoforo e misurata la variazione di concentrazione dello ione in esame in funzione del tempo.

CAPITOLO I

UNA NUOVA CLASSE DI OLIGOSACCARIDI CICLICI ANFIFILICI: SINTESI E PROPRIETÀ DI AUTO-AGGREGAZIONE

1.0 PROGETTAZIONE

Nel progettare un modello di canale ionico artificiale, si deve tenere conto di numerose caratteristiche quali la forma, le dimensioni e la polarità della struttura molecolare nel suo complesso. Quest'ultimo aspetto è particolarmente cruciale, poiché è necessario considerare la polarità su specifiche posizioni all'interno della struttura dello ionoforo; infatti le membrane fosfolipidiche presentano regioni a differenti polarità, a partire dalle teste polari esposte all'ambiente acquoso esterno, fino a raggiungere il *core* idrofobico. Affinchè una molecola funzioni come canale ionico, una volta dispersa in una soluzione acquosa, deve essere, poi, capace di inserirsi nel doppio strato e quindi deve mostrare proprietà anfifiliche²⁸.

Con lo scopo di esplorare nuovi oligosaccaridi ciclici anfifilici, abbiamo utilizzato i **CyPLOS** precedentemente sintetizzati¹⁰ come piattaforme sintetiche per la preparazione di nuovi analoghi in cui gli ossidrili secondari in C-2 e C-3 dei monosaccaridi costituenti il ciclo sono sfruttati per l'inserimento di specifiche derivatizzazioni. In particolare, ci siamo posti l'obiettivo di sintetizzare disaccaridi ciclici, legati mediante ponti fosfodiesteri, derivatizzati in posizione C-2 e C-3 con tentacoli a vario grado di lipoficità (*Figura 1*).

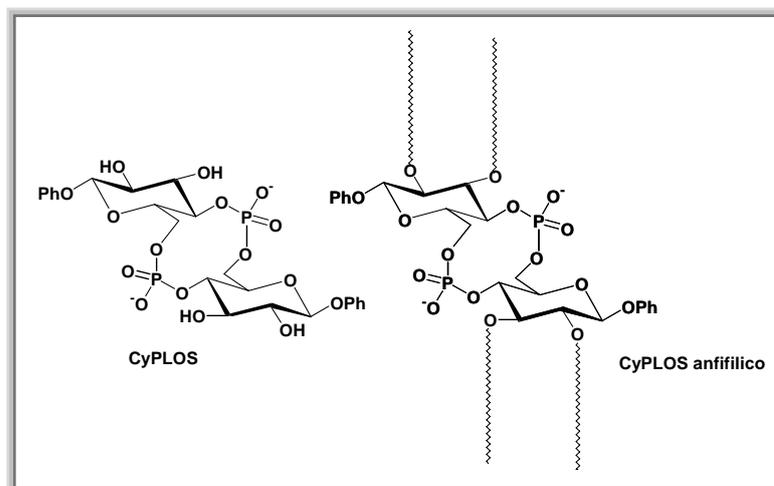


Figura 1 – Derivatizzazione degli OH in posizione 2 e 3 del disaccaride CyPLOS, al fine di renderlo anfifilico

²⁸ Gokel, G.W.; Daschbach, M.M. *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, 252, 886-902.

Questo tipo di modifica non solo consente di ottenere molecole anfifiliche, ma introduce anche una maggiore libertà conformazionale nel macrociclo. Infatti, gli OH in posizione 3 del residuo piranosidico, una volta derivatizzati, non sono più disponibili per formare legami idrogeno intramolecolari con i gruppi fosfato adiacenti. In assenza di queste forti interazioni, il macrociclo è capace di assumere conformazioni variabili in funzione degli “stimoli ambientali”.

In questo contesto, sono stati legati agli ossidrili in posizione 2 e 3 del glucosio, i seguenti tentacoli lipofili:

- catene idrocarburiche a 11 atomi di carbonio;
- catene polieteree, in particolare unità di tetraetilenglicole (TEG).

Queste derivatizzazioni sono state prescelte in quanto introducono dei residui altamente flessibili a partire da reattivi di basso costo, facile reperibilità, e facilmente manipolabili chimicamente, che possono essere sfruttati per l’aggancio allo zucchero mediante formazione di legami eterei stabili. Tali residui sono stabili a tutte le condizioni di reazione previste dallo schema sintetico nel suo complesso; inoltre, conferiscono ai *target* sintetici finali solubilità in un ampio numero di solventi organici tali da permettere interazioni con ambienti lipofili diversi che, ad esempio, possono mimare le membrane lipidiche e/o indurre la formazione di aggregati stabilizzati da interazioni solvofobiche (in sistemi acquosi) o da interazioni tipo van der Waals (in sistemi organici apolari).

In particolare, la catena di TEG in conformazione totalmente estesa copre una lunghezza di circa 17 \AA ²⁹, lunghezza utile, qualora dovesse strutturarsi a dare sistemi tipo micelle inverse o pori molecolari, ai fini di una possibile interazione con il doppio strato lipidico delle membrane cellulari.

Sono stati così sintetizzati i tre macrocicli mostrati in *Figura 2*, in cui il primo (**1a**) è derivatizzato con 4 catene alchiliche, il secondo (**1b**) con 4 catene polieteree, mentre il terzo (**1c**) presenta entrambi i tipi di derivatizzazioni.

²⁹ Rummery, S.; Kool, E.T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5635-5646.

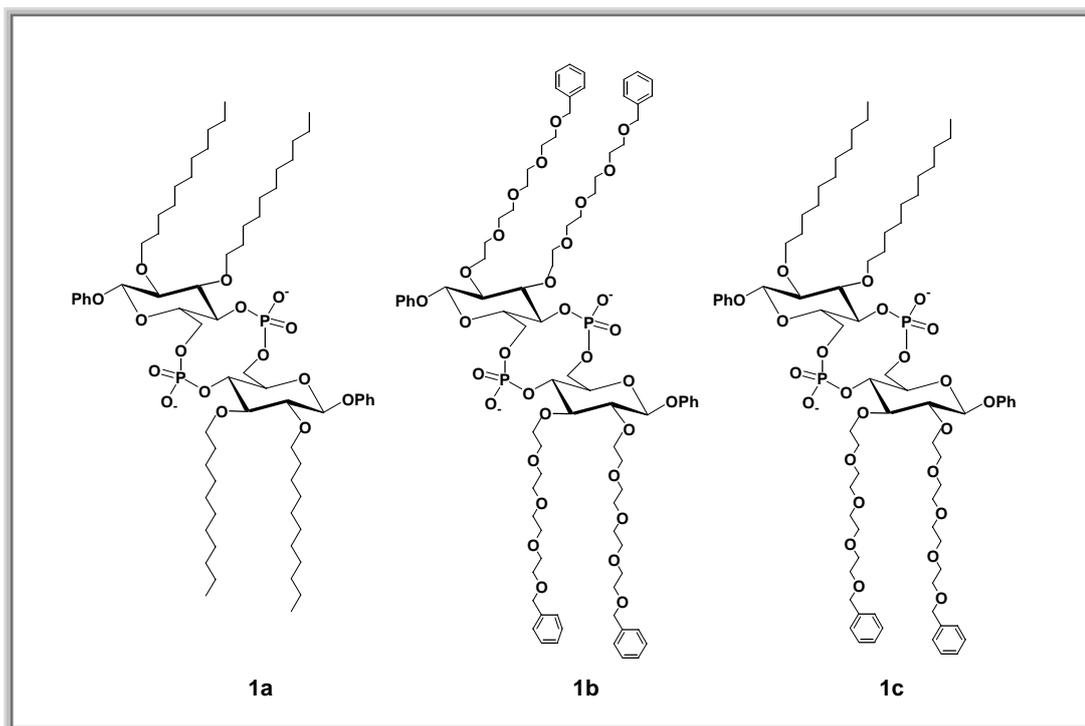


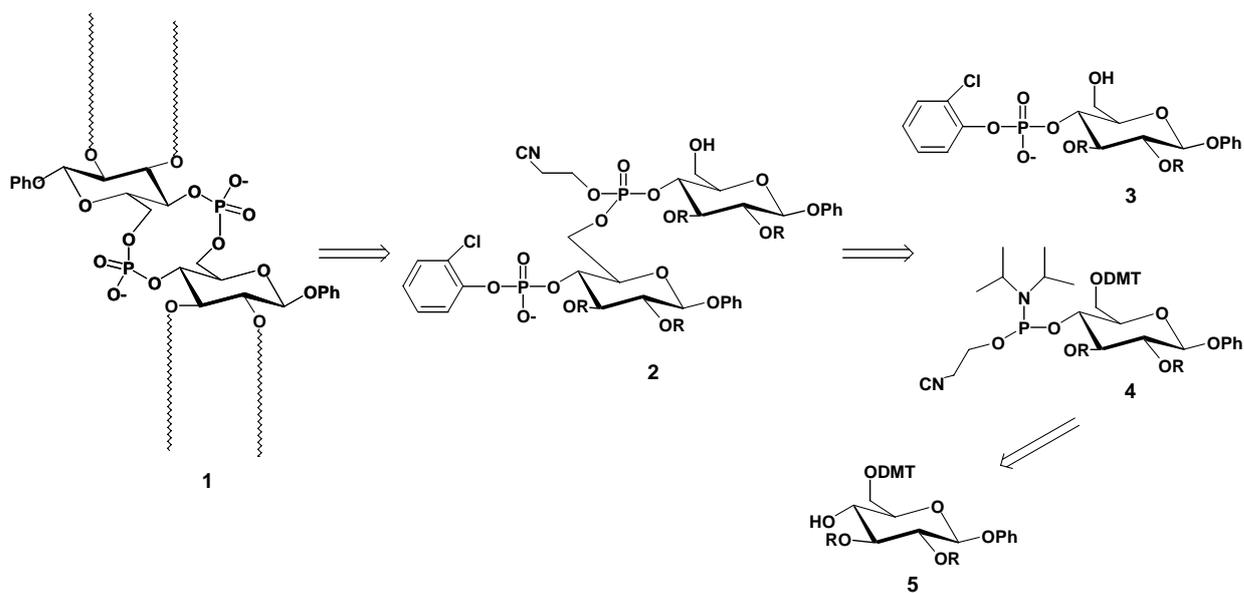
Figura 2 – CyPLOS anfifilici sintetizzati

2.0 SINTESI

I composti **1a**, **1b** e **1c** sintetizzati sono molecole anfifiliche, enantiopure con una simmetria pseudo- C_2 , progettati allo scopo di formare, in sistemi lipidici, aggregati quali micelle inverse, potenziali *carrier* di cationi di interesse biologico (quali Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , ecc.) attraverso le membrane o all'interfaccia acqua-solvente organico³⁰.

Dall'analisi retrosintetica (*Schema 1*), la molecola ciclica **1** può essere ottenuta mediante condensazione intramolecolare del precursore lineare **2**, che porta ad una estremità un gruppo fosfato suscettibile di attacco nucleofilo, e all'altra un gruppo ossidrilico libero. A sua volta, il dimero lineare può essere ottenuto facendo reagire il derivato fenil- β -D-glucopiranoside-4-*O*-(2-cloro-fenilfosfato) **3** con il derivato 4-fosforammidito **4**, entrambi facilmente ottenibili dal comune precursore 6-*O*-DMT-fenil- β -D-glucopiranoside **5**.

³⁰ Coppola, C.; Saggiomo, V.; Di Fabio, G.; De Napoli, L.; Montesarchio, D. *J. Org. Chem.* **2007**, 72(25), 9679-9689.

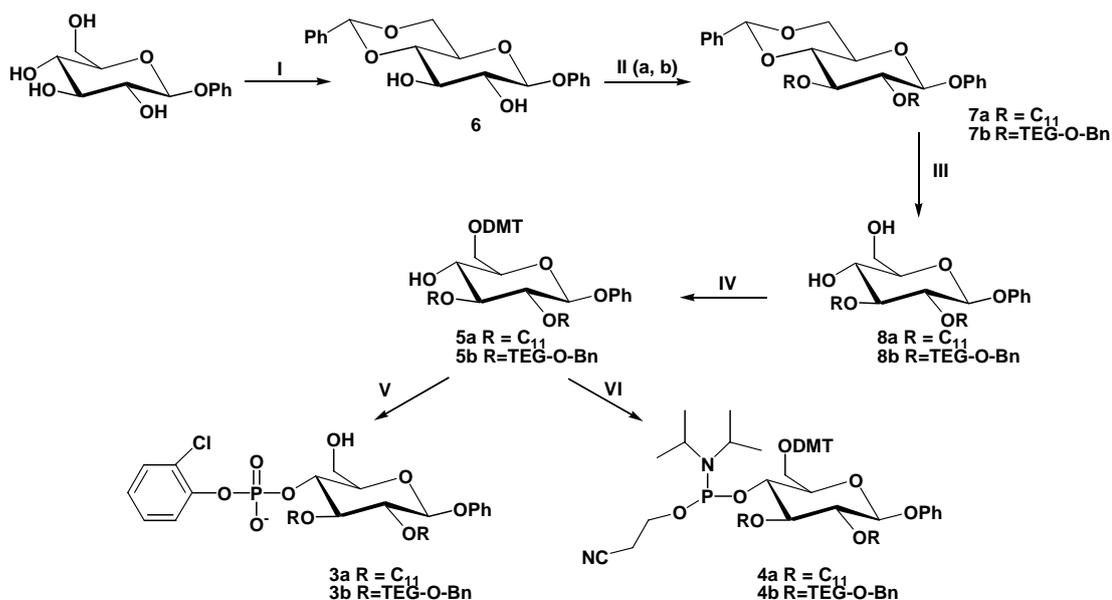


Schema 1 – *Analisi retrosintetica*

Questo composto può essere sintetizzato a partire dal fenil- β -D-glucopiranoside, disponibile commercialmente, in 4 stadi sintetici nei quali gli ossidril in posizione 4 e 6 dello zucchero sono simultaneamente protetti affinché le catene lipofile possano essere introdotte selettivamente nelle posizioni 2 e 3 dello zucchero.

La strategia sintetica complessiva ha previsto, quindi, come primo stadio la protezione del fenil- β -D-glucopiranoside come 4,6-benzilidene, ottenendo così il derivato **6** nel quale gli ossidril in posizione 2 e 3 sono disponibili per la reazione di alchilazione (*Schema 2*).

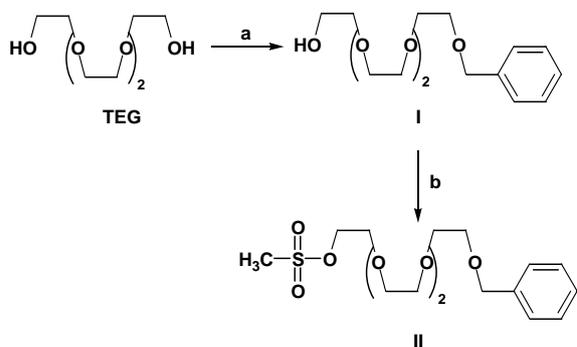
Nel caso del derivato di tipo **a**, le catene alchiliche sono state inserite mediante una classica reazione di alchilazione di *Williamson* tra lo zucchero protetto **6** e 1-bromoundecano in presenza di NaH e NaI in DMF, fornendo il composto **7a** con una resa del 90%.



- I.** benzaldeide dimetilacetale, PTSA, DMF, 0 °C, 48 h, (90%);
II. a) 1-bromoundecano, NaI, NaH, DMF, r.t., 4 h (90%); b) *Ms-O-TEG-O-Bn*, NaH, DMF, r.t., 4 h (85%);
III. TFA/CH₂Cl₂/H₂O 1:10:0.5, v/v/v, 0 °C, 4 h, quant; **IV.** DMTCl, Py, r.t., 12 h, quant;
V. 2-clorofenil-dicloro-fosfato, 1,2,4-triazolo, Et₃N, Py, 0 °C→r.t., 3 h (95%);
VI. 2-cianoetil-N,N-diisopropilclorofosforamidito, DIPEA, CH₂Cl₂, r.t., 2 h, (90%).

Schema 2 – Sintesi dei building block 3a, 3b, 4a e 4b

L'analogo stadio di sintesi per ottenere il composto **7b**, derivatizzato con catene di tetraetilenglicole, ha richiesto dapprima una elaborazione sintetica del TEG, il quale è stato protetto ad una estremità con un gruppo UV-visibile, il benzile (Bn), che ha fornito il composto **I**, che è stato successivamente attivato all'altra estremità con il gruppo mesile (Ms) ottenendo il derivato **II** (Schema 3). Il gruppo benzile all'estremità del "tentacolo" TEG è stato introdotto sia al fine di bloccare e quindi rendere chimicamente stabile l'altro terminale reattivo del residuo polietereo, sia al fine di disporre di un gruppo UV-visibile che funga da marcante per studi su eventuali processi di auto-aggregazione.



Schema 3 – Schema sintetico per la preparazione della catena di TEG

- a.** NaH, BnBr, THF, 12 h, t.a., (65%)
b. MsCl, DIPEA, CH₂Cl₂ 12 h, t.a., (95%)

I composti **7a** e **7b** sono stati trattati con una soluzione di TFA/CH₂Cl₂/H₂O, 1:10:0.5 (v/v/v) per rimuovere il benzilidene, ottenendo così i derivati **8a** e **8b** con una resa pressochè quantitativa. La successiva reazione di questi substrati con DMTrCl in piridina ha fornito i composti **5a** e **5b** desiderati, anche in questo caso con una resa pressochè quantitativa. Il gruppo DMTr è tradizionalmente utilizzato, sia nella sintesi in soluzione sia in fase solida, come gruppo protettore degli alcoli primari dei nucleosidi nell'ambito della sintesi chimica di oligonucleotidi. Facile da inserire su ossidrili primari, il DMT forma eteri molto resistenti alle condizioni basiche, ma facilmente rimossi in seguito ad un blando trattamento acido.

La fosforilazione dell'OH in posizione 4 dei composti **5**, seguita da un *work-up* acido delle miscele di reazione, è stata ottenuta utilizzando una classica reazione di sostituzione nucleofila con 2-clorofenil-diclorofosfato in piridina in presenza di TEA e triazolo³¹ ed ha fornito direttamente i composti detritilati **3a** e **3b** con rese medie del 92-95%.

I derivati 4-fosforammidito **4a** e **4b** sono stati ottenuti con rese del 90% seguendo, essenzialmente, i protocolli ben ottimizzati per l'elaborazione dei *building-block* per la sintesi degli oligonucleotidi. In questa reazione, l'ossidrile in posizione 4 è stato derivatizzato con un gruppo contenente P(III), particolarmente reattivo, mediante fosfitilazione con *N,N*-diisopropil-2-cianoetilclorofosforammidito in presenza di DIPEA e CH₂Cl₂.

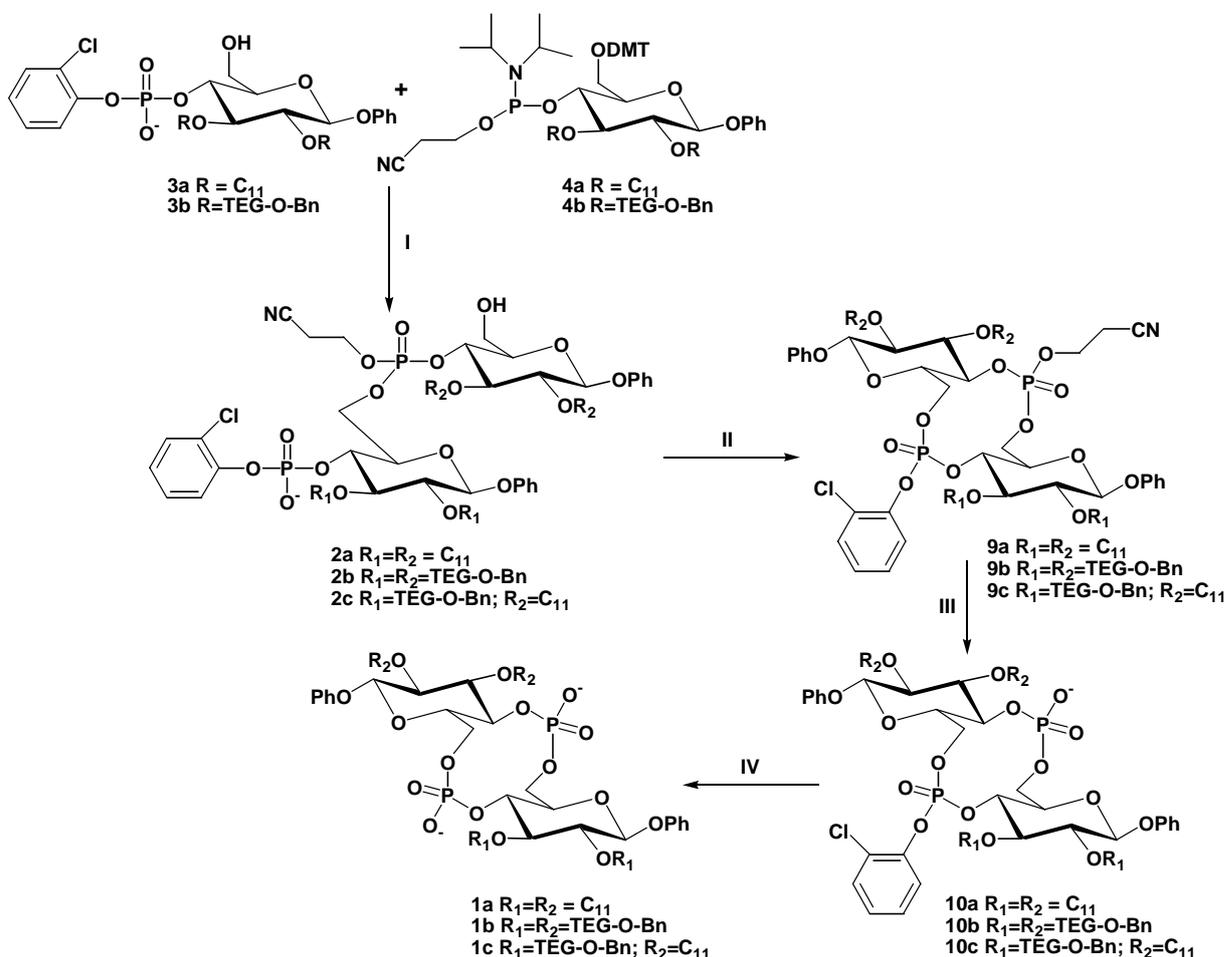
La sintesi dei dimeri lineari è stata condotta sfruttando la ben nota chimica del fosforammidito, come descritto nello *Schema 4*. Il *coupling* di **3a** con **4a**, mediante attivazione con una soluzione 0.45 M di tetrazolo in CH₃CN, seguita da ossidazione, ha portato alla formazione di **2a** ottenuto come composto detritilato dopo cromatografia su colonna di gel di silice, con una resa dell'75% per i tre step di sintesi.

Invece, per la sintesi dei derivati **2b** e **2c** (quest'ultimo ottenuto dall'accoppiamento di **3b** con **4a**) i *building-block* utilizzati non hanno reagito in modo soddisfacente seguendo le condizioni di reazione standard ed è stato necessario procedere ad una ottimizzazione del processo di attivazione. I composti lineari desiderati sono stati ottenuti con rese più elevate utilizzando come attivante una soluzione 0.25 M di 4,5-dicianoimidazolo (DCI) in CH₃CN a 45° C. Dopo ossidazione, i composti sono stati isolati come composti detritilati con una resa complessiva del 75% per i tre step di sintesi.

La reazione di ciclizzazione è stata realizzata sfruttando la chimica classica del fosfotriestere (*Schema 4*), utilizzando come agente condensante l' 1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazolo (MSNT). Mediante la formazione di un'anidride mista al fosfato, il gruppo fosfodiesterico in posizione 4 è reso suscettibile di attacco nucleofilo da parte del gruppo

³¹ Reese, C. B.; Song, Q. *Nucleic Acids Res*, **1999**, *27*, *13*, 2672-2681.

ossidrilico libero in posizione 6 dell'altro residuo saccaridico, facendo avvenire, in questo modo, la condensazione desiderata. La reazione di ciclizzazione è stata effettuata in elevate condizioni di diluizione (10^{-3} M) per minimizzare possibili eventi di polimerizzazione non desiderati, mantenendo l'ambiente di reazione estremamente anidro.



- I.** a) accoppiamento di **8a**, caso **a**: **9a**, 0.45 M tetrazolo in CH_3CN , t.a., 2 h (75%); accoppiamento di **8b**, caso **b**: **9b**, 0.25 M DCI in CH_3CN , 40 °C, 2 h, (75%); accoppiamento di **8b**, caso **c**: **8a**, 0.25 M DCI in CH_3CN , 40 °C, 2 h, (75%); b) ossidazione: 5 M t-ButOOH in decano, t.a., 30 min, (resa quantitativa)
II. Caso **a** e **b**: MSNT, Py, r.t., 12 h (78%); Caso **c**: DMAP, MSNT, Py, t.a., 12 h, (78%).
III. Caso **a** e **b**: Et_3N/Py , 1:1, v/v, 50 °C, 12 h, (resa quantitativa); Caso **c**: piperidina/DMF, 1:5, 70 °C, 12 h, (resa quantitativa);
IV. LiOH/diossano, 5:1, v/v, 50 °C, 12 h (resa quantitativa).

Schema 4 – Sintesi dei dimeri ciclici **1a**, **1b** e **1c**

Le molecole cicliche, completamente protette ai gruppi fosfato (**9a–c**, *Schema 4*), sono state deprotette in due stadi:

il primo consiste in un trattamento basico con un'ammina anidra, che attraverso un meccanismo di β -eliminazione rimuove il gruppo 2-cianoetile (per i composti **9a** e **9b** è stata

utilizzata la trietilammina, mentre per il derivato **9c** si è rivelato efficace il trattamento con una base più forte, come la piperidina); il secondo prevede una reazione di idrolisi basica con attacco diretto al fosfato fosfotriestereo, per rimuovere il gruppo 2-clorofenile.

Quest'ultimo stadio nella sintesi dei CyPLOS ha richiesto un trattamento con ammoniaca acquosa a 55° C, per una notte; nel caso dei CyPLOS anfifilici, invece è stato necessario adottare condizioni più drastiche per ottenere totale deprotezione. Condizioni ottimali sono state trovate lasciando, per la notte, i composti ciclici **10a-c** a contatto con una soluzione satura di LiOH in diossano/acqua (1:1, v/v).

Seguendo quindi la procedura descritta, i derivati **1a-c** sono stati sintetizzati in quattro step con una resa complessiva del 50-58% a partire dai *building-block* **3** e **4**, a loro volta ottenibili dal fenil- β -glucopiranoside in cinque step di sintesi con rese del 62-67%.

3.0 STUDI DI AGGREGAZIONE

Nonostante la presenza dei due gruppi fosfato carichi negativamente, i dimeri ciclici ottenuti sono risultati molto lipofili; in particolare, il derivato **1a** è solubile solo in CH₂Cl₂ e CHCl₃, mentre i composti **1b** e **1c** sono risultati solubili anche in altri solventi organici, quali CH₃OH e CH₃CN.

Data la natura anfifilica delle molecole sintetizzate, sono state dapprima esplorate le loro capacità a formare strutture di tipo gel. La capacità di piccole molecole organiche di autoaggregare dando origine a gel supramolecolari in solventi organici (organogel) o in acqua (idrogel) è un fenomeno molto interessante. Piccole molecole organiche biocompatibili, come derivati saccaridici o amminoacidici, in grado di fornire gel stabili, sono molto interessanti poiché possono trovare applicazioni nel campo del *drug delivery*, nella bio-ingegneria e bio-fisica, nonché nelle applicazioni di nuovi materiali. I polisaccaridi, ad esempio, sono stati ampiamente utilizzati sotto forma di gel polimerici per la separazione e l'immobilizzazione degli enzimi³².

Pur provando una serie di solventi e di condizioni diverse, però, nessuno dei macrocicli sintetizzati ha mostrato una significativa tendenza a formare organogel stabili a temperatura ambiente.

³² a) Jung, J.H.; John, G.; Masuda, M.; Yoshida, K.; Shinkai, S.; Shimizu, T. *Langmuir* **2001**, *17*, 7229-7232. b) Nie, X.; Wang, G. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4734-4741. c) John, G.; Li, J.; Dordick, J.S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 4772-4775.

Le capacità di autoaggregazione dei macrocicli sintetizzati sono state studiate mediante spettroscopia NMR. Come solvente in cui effettuare le analisi è stato scelto il CDCl_3 solvente ideale per i tre derivati in analisi (**1a-c**) che, approssimativamente, ha una polarità molto simile alla regione idrofobica interna del doppio strato lipidico ed è, quindi, in grado di fornire informazioni preliminari circa il comportamento di questi macrocicli anfifilici, una volta sintetizzati, in sistemi mimici di membrane cellulari.

In linea di principio, una netta semplificazione degli spettri NMR è attesa quando un dimero asimmetrico è trasformato in una molecola che possiede un asse di simmetria C_2 , che tipicamente mostra lo spettro di un monomero come risultato di equilibri veloci tra le varie conformazioni flessibili che la molecola può assumere.

Contrariamente alle nostre aspettative, nel caso dei derivati **a** e **b**, è stata osservata una significativa variazione negli spettri NMR quando i dimeri ciclici **10a** e **10b**, ancora parzialmente protetti al fosfato con il gruppo 2-clorofenile, sono stati convertiti nei dimeri ciclici finali **1a** e **1b**. In *Figura 15* è riportato lo spettro $^1\text{H-NMR}$, e nel riquadro lo spettro $^{31}\text{P-NMR}$, del derivato **10b** (parzialmente deprotetto) in confronto a quelli del derivato **1b** (completamente deprotetto).

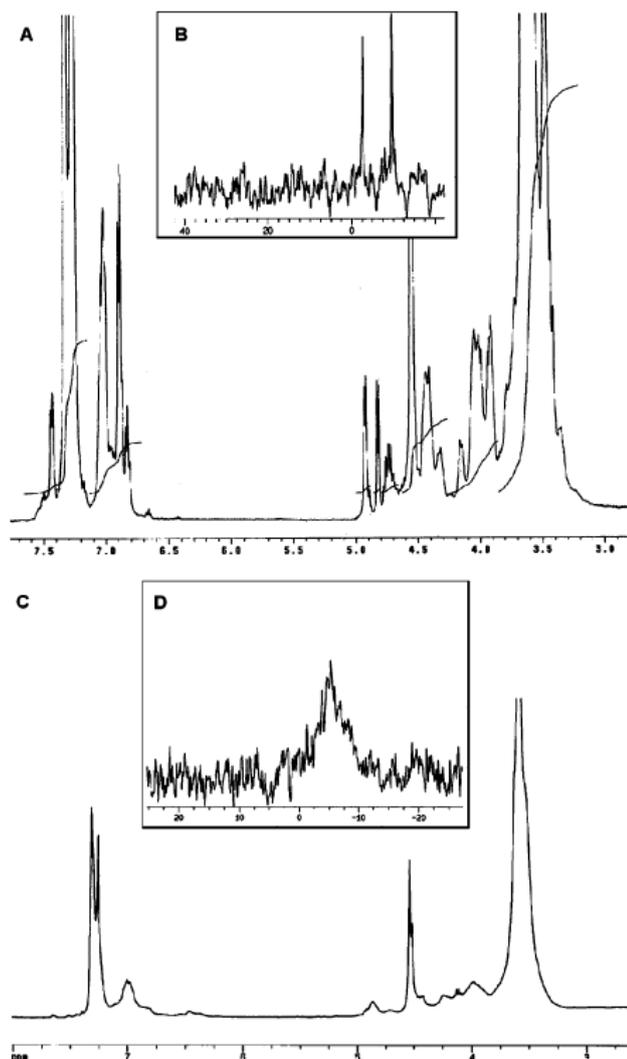


Figura 15 – Spettri $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, CDCl_3) e nel riquadro, $^{31}\text{P-NMR}$ (161.98 MHz, 298 K, CDCl_3) del derivato **10b** (pannello A e B), e di **1b** (pannello C e D, rispettivamente) alla concentrazione 10 mM

I composti ciclici finali **1a**, **1b** e **1c** mostrano comportamenti differenti, ma in tutti e tre i casi l'aspetto degli spettri NMR risulta dipendente dalla concentrazione, come atteso in presenza di forti interazioni intermolecolari. Il composto **1a** presenta spettri con due distinguibili set di segnali, ad indicare la presenza di due specie principali distinte in soluzione. Gli spettri NMR di **1b**, invece, si presentano con linee molto slargate, diagnostiche di lenti equilibri conformazionali sulla scala dei tempi NMR, che possono essere spiegati solo assumendo la formazione di aggregati in CDCl_3 . Un simile comportamento si riscontra anche nei derivati della serie **c**: segnali slargati e poco risolti si hanno già negli spettri NMR del dimero lineare **2c**, a dimostrazione del fatto che tale molecola ha una maggiore propensione all'auto-aggregazione.

Studi per valutare le proprietà di autoaggregazione di questi macrocicli anfifilici sono stati condotti analizzando i segnali NMR al variare della temperatura e della concentrazione. Il dimero **1a**, alla concentrazione di 14 mM, mostra nello spettro $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, 298 K) due segnali distinti dei protoni anomerici, in rapporto 1:1.2, e due segnali distinti, ben risolti nello spettro $^{31}\text{P-NMR}$ (Figura 16).

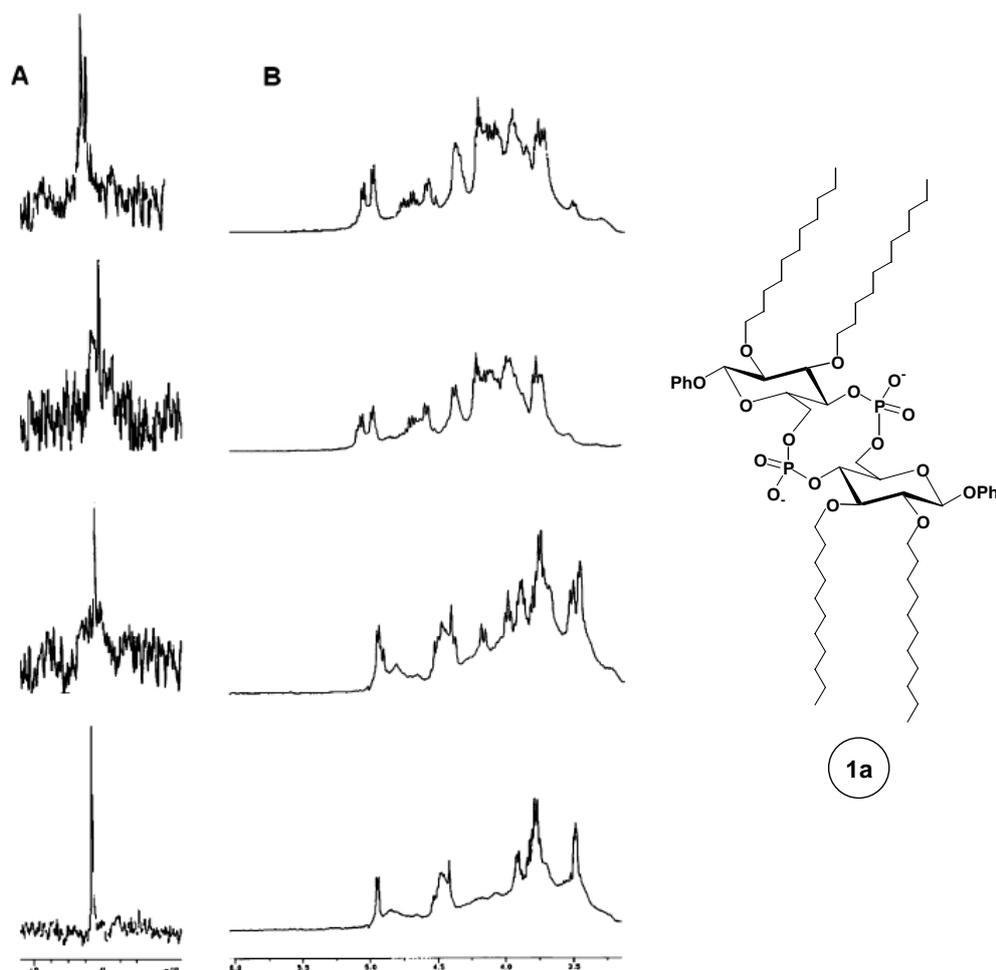


Figura 16 – Spettri $^{31}\text{P-NMR}$ (161.98 MHz, 298 K, CDCl_3) e $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, CDCl_3) (pannello A e B rispettivamente), del composto **1a** registrati a differenti concentrazioni (dall'alto verso il basso: 14.0, 7.5, 3.5 e 1.8 mM, rispettivamente)

Al diminuire della concentrazione, i due segnali negli spettri $^{31}\text{P-NMR}$ collassano in un unico picco *sharp* alla concentrazione di 7 mM. In questo caso l'analisi $^1\text{H-NMR}$ è stata maggiormente informativa, mostrando che i due segnali relativi ai protoni anomerici progressivamente si sovrappongono al diminuire della concentrazione.

Un unico segnale, ben risolto, si ottiene al valore di concentrazione di 1.8 mM: questo comportamento è indicativo di equilibri veloci tra le varie specie presenti in soluzione, con il prevalere di una sola conformazione flessibile ad una concentrazione compresa tra 2 e 3 mM.

Queste caratteristiche spettrali sono consistenti con la formazione di aggregati di piccole dimensioni, ma non supportano la presenza di larghi aggregati.

Negli esperimenti NMR su **1a**, condotti sul sistema più concentrato da noi preso in esame (14 mM), al variare della temperatura non è emersa nessuna differenza tra gli spettri registrati nell'intervallo di temperatura tra 273-323 K. Alla temperatura di 328 K si è, invece, osservata una netta semplificazione del sistema, con un solo segnale nella regione dei protoni anomeric (Figura 17).

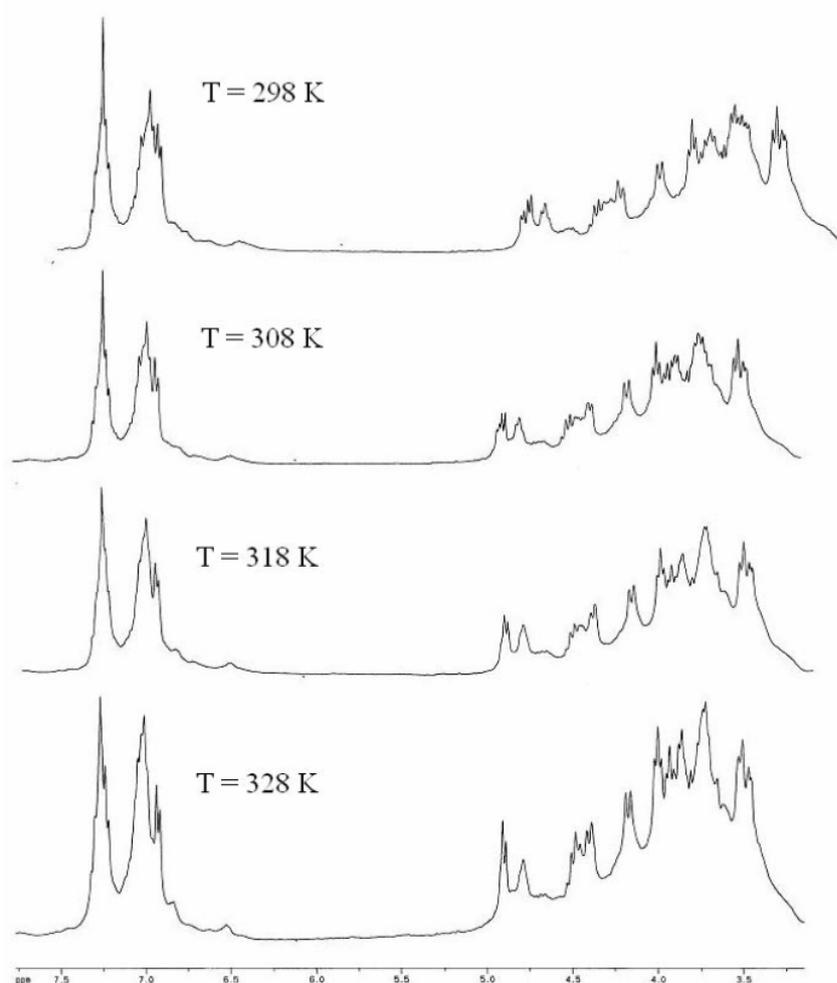


Figura 17 – Spettri ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) del composto **1a**, alla concentrazione di 14 mM, registrati a differenti temperature (dall'alto in basso: 298 K, 308 K, 318 K e 328 K, rispettivamente)

Gli spettri ^1H -NMR e ^{31}P -NMR dei derivati **1b** e **1c** chiaramente mostrano bande molto slargate con notevole anisotropia di *chemical shift*, indicative della presenza di sistemi fortemente aggregati. In nessun caso, però, gli spettri ^1H -NMR hanno mostrato una semplificazione delle linee spettrali al diminuire della concentrazione e/o all'aumentare della temperatura.

Invece, gli spettri ^{31}P -NMR registrati al variare della temperatura e della concentrazione, hanno consentito una più approfondita analisi del comportamento di questi derivati.

In dettaglio, nello spettro ^{31}P -NMR di **1b** alla concentrazione di 10 o 9 mM, sono presenti segnali slargati distribuiti in una regione che copre 10 ppm, centrata a 0 ppm. Questa banda tende ad assottigliarsi a concentrazioni intorno a 5 mM e si semplifica sempre più per effetto di ulteriori diluizioni, mostrando così un valore di concentrazione di aggregazione critica (*c.a.c.*) compreso tra i 6 e gli 8 mM (Figura 18).

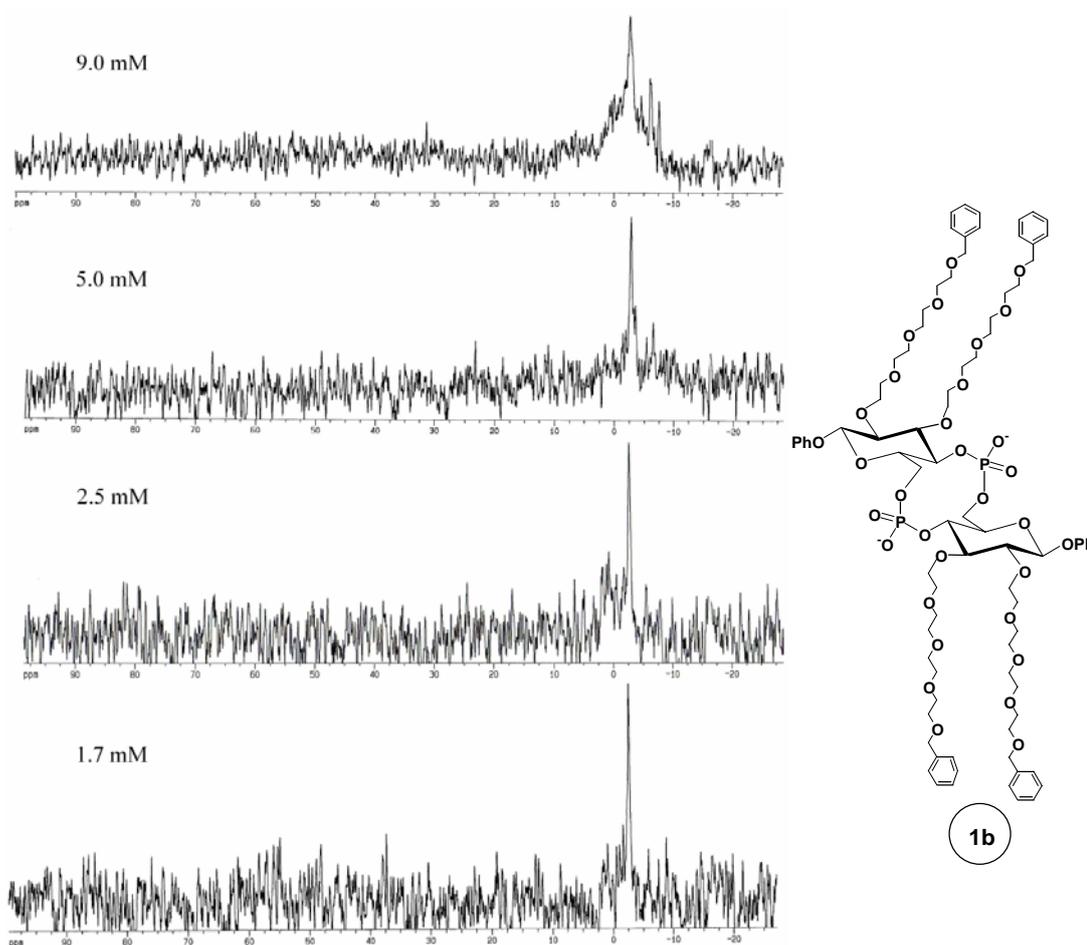


Figura 18 – Spettri ^{31}P -NMR (161.98 MHz, 298 K, CDCl_3) del composto **1b** registrati a differenti concentrazioni (dall'alto verso il basso: 9.0, 5.0, 2.5, e 1.7 mM, rispettivamente)

Lo stesso comportamento è stato osservato per il derivato **1c** (Figura 19), per il quale lo spettro ^{31}P -NMR, registrato alla concentrazione di 9 mM, mostra una fitta serie di risonanze ravvicinate che occupano densamente una regione di 10 ppm, centrata a circa 0 ppm.

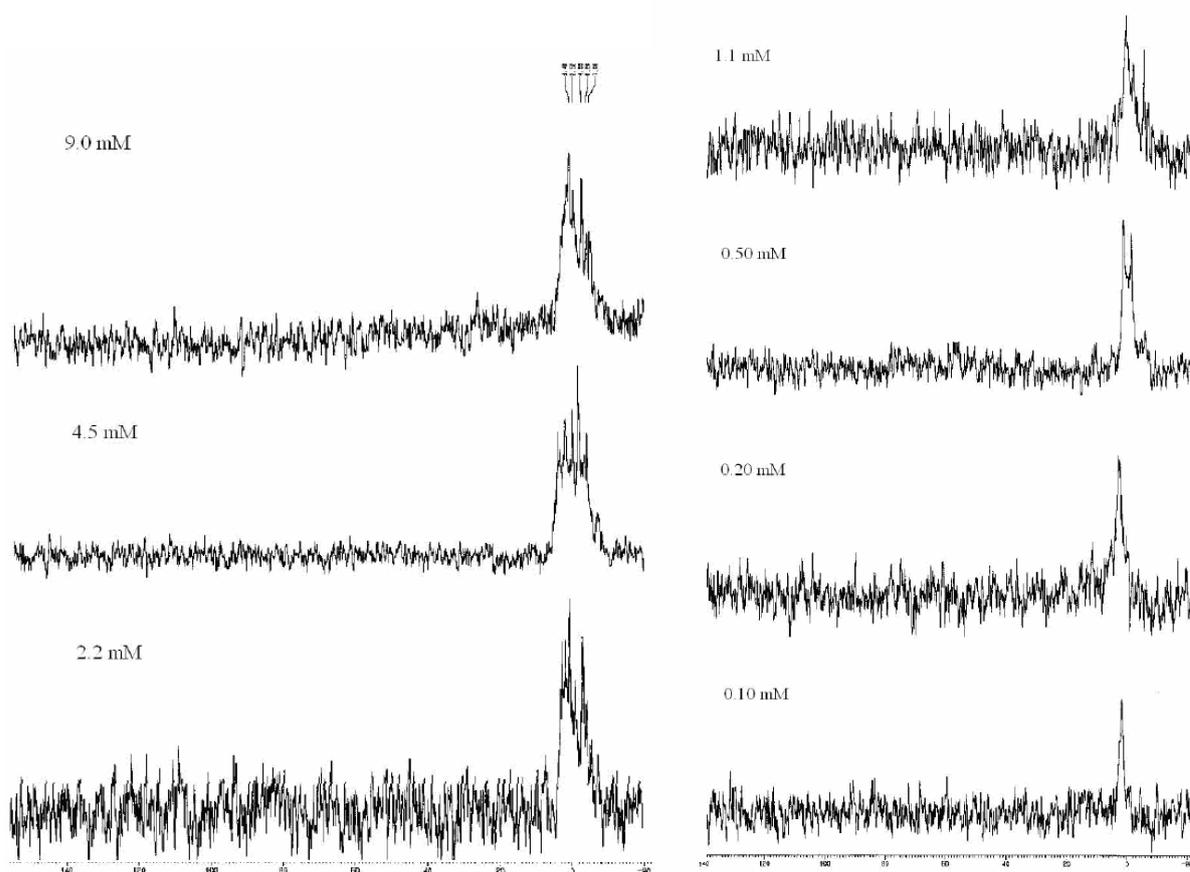


Figura 19 – Spettri ^{31}P -NMR (161.98 MHz, 298 K, CDCl_3) del composto **1c** registrati a differenti concentrazioni (dall'alto verso il basso: 9.0, 4.5, 2.2, 1.1, 0.50, 0.2 e 0.1 mM, rispettivamente)

Con il diminuire della concentrazione, l'anisotropia dei segnali dello spettro progressivamente si riduce a concentrazioni inferiori a 1 mM, con un valore di *c.a.c.* determinato tra i 300 e i 400 μM .

Gli studi NMR condotti a temperatura variabile, nell'intervallo 278-338 K, mostrano per entrambi i derivati **1b** e **1c** solo una lieve semplificazione delle bande spettrali all'aumentare della temperatura, dato indicativo della presenza di aggregati termicamente stabili (Figura 20).

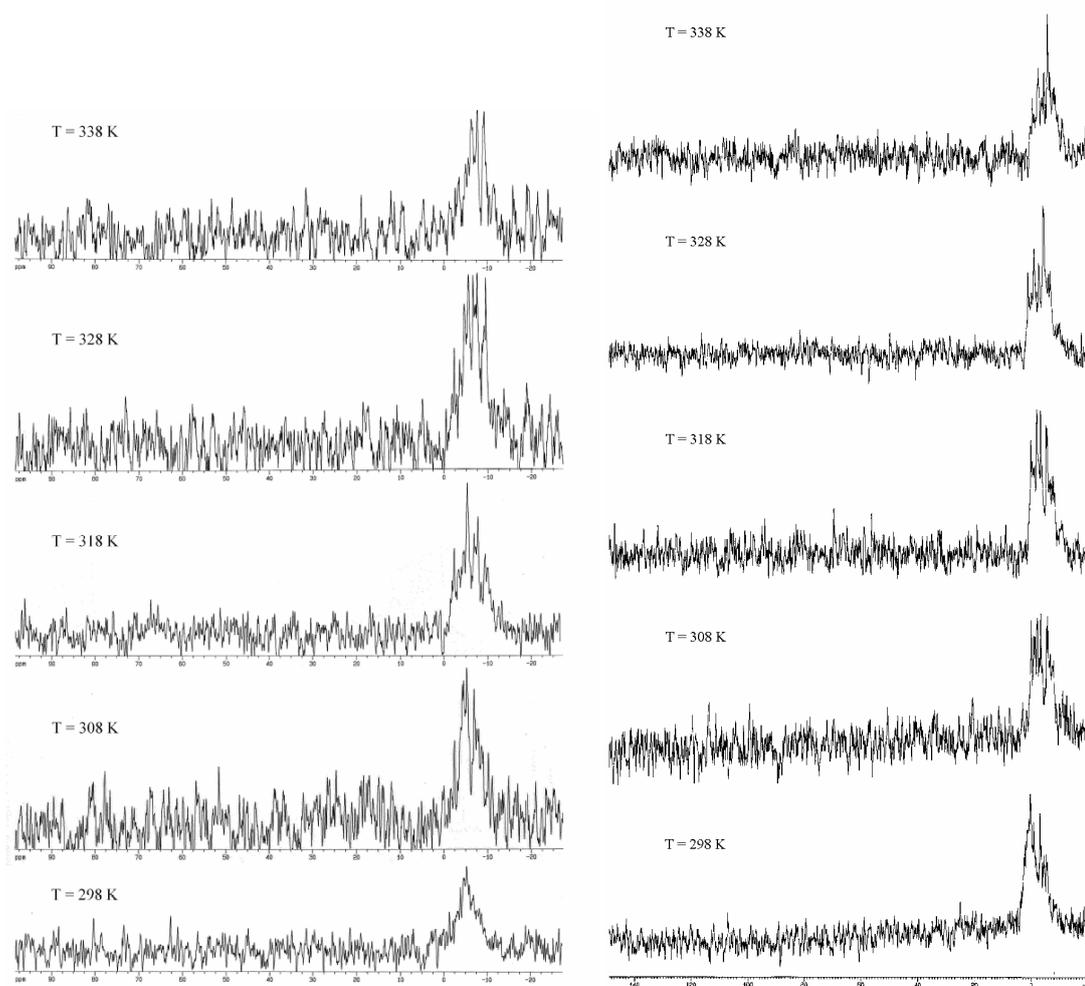


Figura 20 – Spettri ^{31}P -NMR (161.98 MHz, 298 K, CDCl_3) del composto **1b** (a sinistra) e del composto **1c** (a destra) registrati a differenti temperature (dall'alto verso il basso: 338 K, 328 K, 318 K, 308 K, 298 K rispettivamente)

Dall'esame complessivo di questi risultati è possibile concludere che i nuovi macrocicli sintetizzati mostrano tendenza ad autoaggregarsi in CDCl_3 crescente nella serie **1a** < **1b** < **1c**. In particolare, gli ultimi due derivati sono capaci di generare aggregati di maggiori dimensioni, in cui la ridotta flessibilità conformazionale è responsabile dello slargamento delle linee spettrali e di anisotropia magnetica negli spettri NMR.

La *driving force* per l'auto-aggregazione in solventi organici, quali il CDCl_3 , può essere attribuita, in tutti i casi, a forze di van der Waals che si generano tra i tentacoli lipofili legati allo scheletro disaccaridico, con i residui di TEG più efficienti rispetto alle catene alchiliche nel promuovere la formazione di aggregati stabili in sistemi organici.

3.1 STUDIO DELL'ATTIVITÀ IONOFORA

In considerazione della natura anfifilica e delle capacità di auto-aggregazione dei nuovi macrocicli sintetizzati, ne abbiamo studiato la capacità di inserirsi in un doppio strato fosfolipidico e funzionare come ionofori. Una semplice analisi della struttura dei CyPLOS anfifilici suggerisce che la porzione anionica del macrociclo possa disporsi sulla superficie polare della membrana, mentre i tentacoli lipofili possono inserirsi all'interno del *core* idrofobico della membrana.

I composti **1a**, **1b** e **1c** (Figura 21) presentano, in comune, un macrociclo dianionico e differiscono per la natura delle catene lipofile legate allo scheletro disaccaridico.

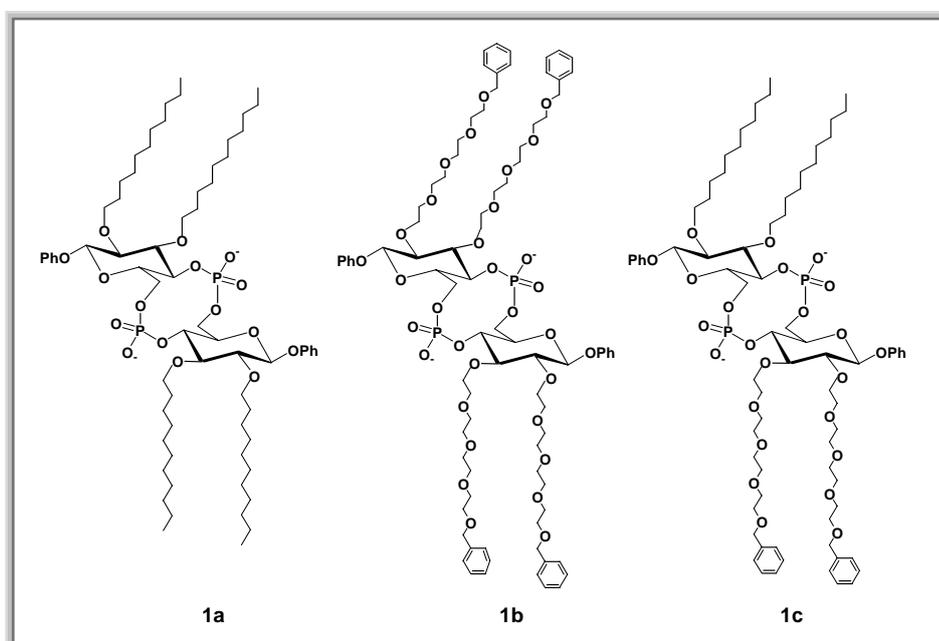
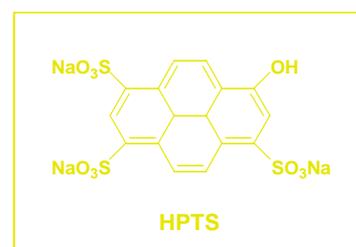


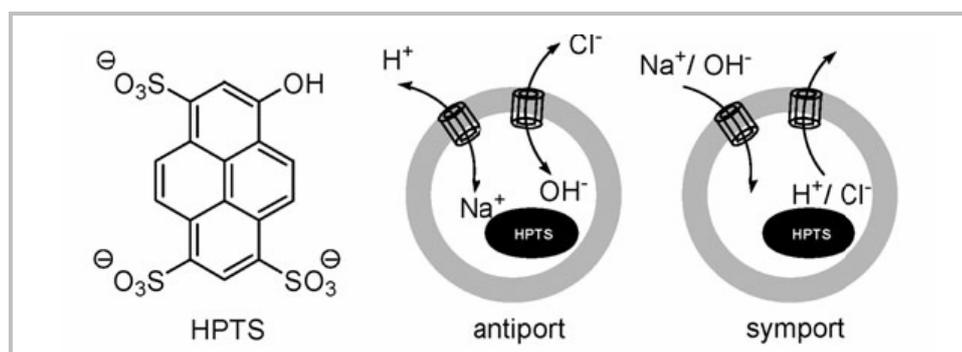
Figura 21 – CyPLOS anfifilici

L'attività ionofora dei derivati CyPLOS anfifilici **1a**, **1b** e **1c** è stata analizzata utilizzando il saggio HPTS (sale trisodico dell'acido trisolfonico dell'8-idrossipirene).

In questo tipo di esperimento l'HPTS, un colorante fluorescente sensibile al pH (pK_a 7.3), viene introdotto all'interno di vescicole unilamellari (LUVs, 100 nm). La sospensione del liposoma è preparata in HEPES [acido 4-(2-idrossietil-1-piperazinil)-etansolfonico] contenente NaCl 100 mM [o MCl e NaX negli esperimenti per la selettività di cationi (M) e anioni (X), rispettivamente] e, dopo l'aggiunta dello ionoforo, il pH esterno è portato al valore di 7.6 mediante l'aggiunta di NaOH (o MOH



negli esperimenti di selettività di cationi). L'aumento della fluorescenza dell'HPTS in risposta al gradiente di pH indica una basificazione dell'ambiente interno alla vescicola, che può essere dovuto o alla fuoriuscita di ioni H^+ o all'ingresso di ioni OH^- . Questa variazione di carica, naturalmente, deve essere controbilanciata; pertanto si possono ipotizzare quattro possibili processi: scambio H^+/Na^+ , scambio OH^-/Cl^- , ingresso di H^+/Cl^- e ingresso di Na^+/OH^- (Schema 5).



Schema 5 – Rappresentazione schematica dei quattro possibili meccanismi per il trasporto di ioni attraverso le membrane cellulari

L'attività ionofora dei derivati CyPLOS **1a**, **1b** e **1c** è stata studiata utilizzando questo sistema ed i dati ottenuti sono riportati in *Figura 22*.

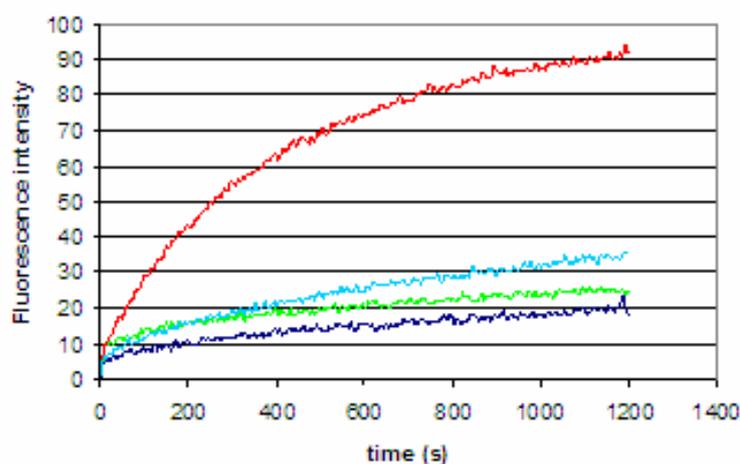


Figura 22 – Variazione della fluorescenza di HPTS (FI , λ_{ex} 460 nm, λ_{em} 510 nm) in funzione del tempo dopo l'aggiunta della base (50 μ L di NaOH 0.5M) in presenza degli ionofori **1a**, **1b** e **1c** al 2%.

Di tutti e tre i derivati CyPLOS anfifilici, il derivato **1b** (curva rossa) mostra la più significativa attività ionofora. Questa deve essere strettamente correlata alla presenza dei quattro residui di TEG, come mostrato dalla minore efficacia del derivato **1c** (curva azzurra),

che reca due catene di TEG e due catene alchiliche, e dalla ridotta attività di **1a** (curva verde), derivato tetra-alchilato privo di tentacoli polieterei.

Una volta stabilita l'importanza della presenza delle catene polieteree ai fini dell'attività, è stato preso in esame il precursore ciclico completamente protetto **9b**, per valutare l'importanza delle cariche negative sul macrociclo, e di un derivato lineare **11b**, con lo stesso numero di cariche, per valutare l'importanza della presenza del ciclo (*Figura 23*).

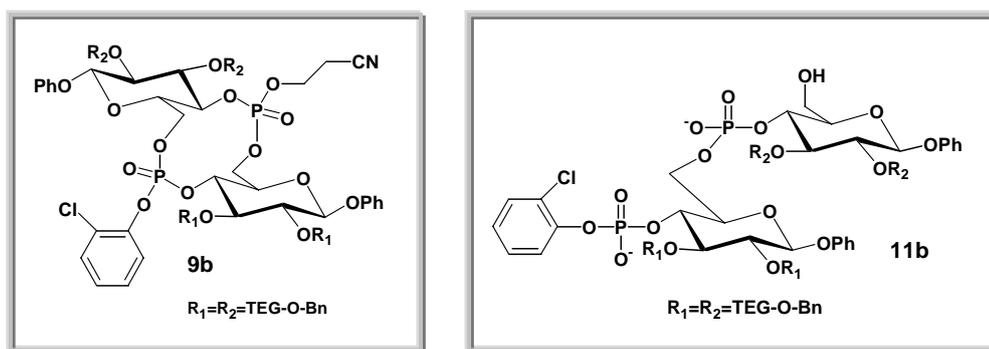


Figura 23 – Strutture degli analoghi del macrociclo **1b**, **9b** e **11b**

Dal confronto dei dati ottenuti su **1b** con quelli di **9b** e di **11b**, si deduce che il carattere anionico del macrociclo, così come la presenza stessa del macrociclo, non sono prerequisiti indispensabili per l'attività ionofora, tuttavia garantiscono un incremento di tale attività più che doppio.

Sulla base di questi risultati, la nostra attenzione si è rivolta al derivato **1b**. In grafico è riportata la variazione dell'intensità di fluorescenza nel tempo all'aumentare della concentrazione dello ionoforo **1b**. Aumentando la concentrazione dello ionoforo, l'attività cresce linearmente evidenziando, così che la specie coinvolta nel processo di trasporto di ioni H^+ è monomeric³³ (*Figura 24*).

³³ Il profilo lineare dell'attività/concentrazione è stato osservato anche in presenza di un equilibrio monomero/aggregato completamente spostato a favore dell'aggregato. Ad ogni modo, la *c.a.c.* di **1b** in $CHCl_3$ è compresa tra i 6 e 8 mM, un valore di conc. molto più alto di quelli utilizzati negli esperimenti di trasporto.

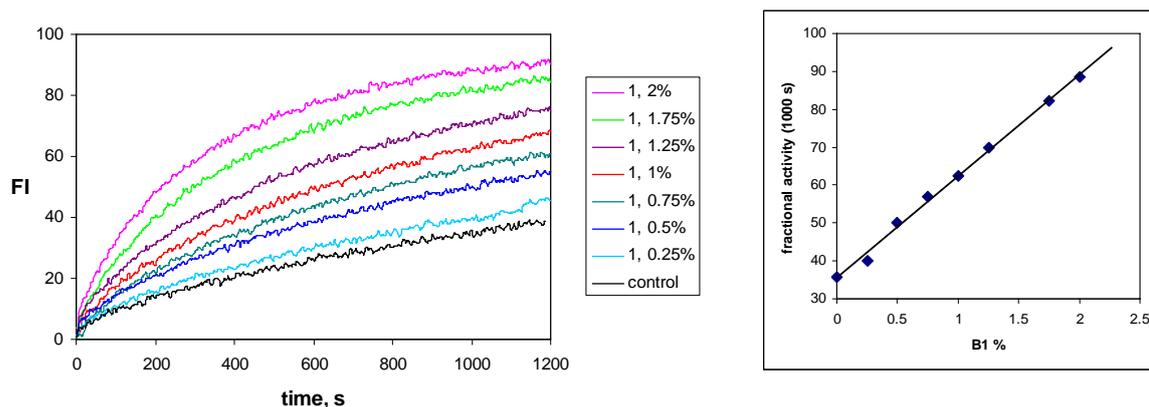


Figura 24 – Variazione dell'intensità di fluorescenza nel tempo all'aumentare della concentrazione dello ionoforo **1b**

Sullo ionoforo **1b** è stato condotto anche uno studio di selettività d'azione nei confronti di cationi e anioni.

Variando la natura dei cationi presenti in soluzione (metalli alcalini appartenenti al gruppo I), lo ionoforo non mostra capacità di discriminazione.

Per quanto riguarda, invece, l'analisi degli anioni, lo ionoforo ha mostrato buona attività nei confronti degli alogenuri (Br^- , I^- , Cl^-), NO_3^- e ClO_4^- , mentre fluoruro, acetato, glutammato e solfato vengono trasportati poco o niente.

Questi dati dimostrano che il trasporto selettivo coinvolge solo gli anioni escludendo, così i meccanismi di scambio H^+/Na^+ e di ingresso di Na^+/OH^- .

Sulla base di questi risultati, il meccanismo d'azione dello ionoforo **1b**, può essere rappresentato schematicamente come riportato in *Figura 25*.

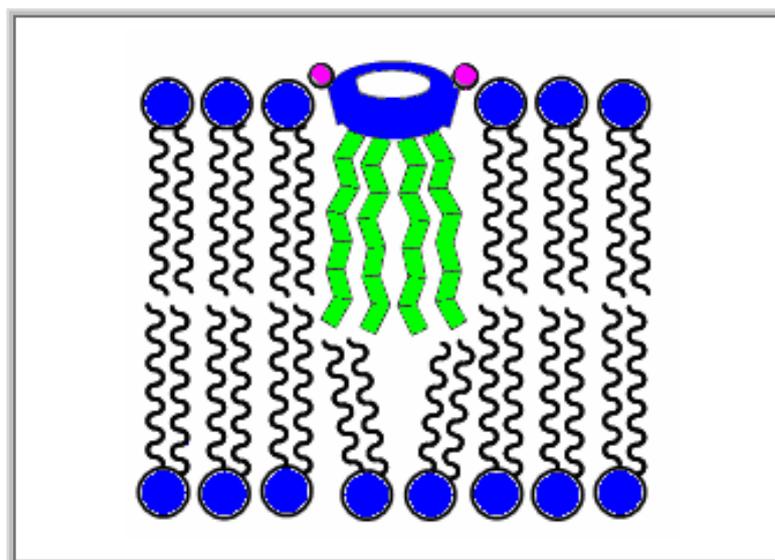


Figura 25 – Rappresentazione schematica di un CyPLOS anfifilico inserito in membrana

La porzione macrociclica polare è posizionata sulla superficie della membrana a contatto con la fase acquosa esterna, con le quattro catene anfifiliche che affondano nel doppio strato lipidico. Il macrociclo rappresenta la “bocca” del canale, mentre le catene di tetraetilenglicole destabilizzano lo strato fosfolipidico sottostante, formando un condotto polare che consente il passaggio degli ioni. Le dimensioni, in conformazione estesa, del composto **1b** sono chiaramente insufficienti per attraversare l'intero doppio strato, ma l'attività è comunque osservata in quanto si forma un “canale corto”³⁴. Probabilmente, il disordine causato dalle catene di tetraetilenglicole all'interno del doppio strato lipidico, genera un difetto in tutta la membrana e gli ioni vengono, così, aiutati nel loro passaggio. Sulla base dei dati disponibili non è possibile definire più in dettaglio il meccanismo d'azione, in particolare se gli ioni sono in grado di attraversare la “bocca” del canale, il cui diametro è circa 3 Å, o se il ruolo del macrociclo è semplicemente quello di destabilizzare l'interfaccia della membrana. Ad ogni modo, è stato osservato che il composto **1b** non è capace di trasportare la calceina (un *probe* anionico spesso utilizzato per gli studi di trasporto attraverso i liposomi), e questa selettività nei confronti di ioni di grosse dimensioni è consistente con l'ipotesi che i CyPLOS anfifilici forniscono un sistema di ingresso nelle membrane solo per specie cariche di piccole dimensioni.

³⁴ Si veda come esempio: Djedovic, N.; Ferdani, R.; Harder, E.; Pajewska, J.; Pajewski, R.; Weber, M.E.; Schlesinger, P.H.; Gokel, G.W. *New. J. Chem.*, **2005**, *29*, 291-305.

2.0 PARTE SPERIMENTALE

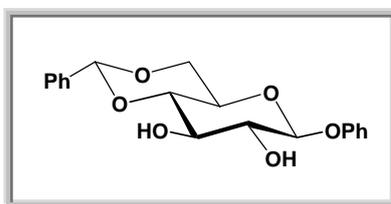
PROCEDURE GENERALI

Le analisi TLC sono state effettuate su lastre di gel di silice Merck (60, F254). I prodotti di reazione sono stati evidenziati mediante luce UV e poi per trattamento con una soluzione acida ossidante (acido acetico/acqua/acido solforico 10:4:5: v/v). Per le cromatografie su colonna è stata utilizzata gel di silice Merck (Kieselgel 40, 0.063-0.2000 mm). Sono stati utilizzati setacci molecolari 3 Å in perle. Gli spettri NMR sono stati eseguiti su spettrometri Bruker WM-400, Varian Gemini 300, Varian Gemini 200 and Varian Inova 500. I chemical shifts sono espressi in ppm utilizzando come riferimento il segnale residuo del solvente ($\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm, $\text{CD}_3\text{OD} = 3.31$ ppm); i chemical shifts degli spettri al ^{13}C sono riferiti al segnale del solvente ($\text{CDCl}_3 = 76.9$ ppm, $\text{CD}_3\text{OD} = 45.9$ ppm); i valori di J sono espressi in Hz. Gli spettri ^{31}P -NMR sono stati registrati utilizzando come riferimento esterno una soluzione all'85% di H_3PO_4 contenente alcune gocce di D_2O . L'assegnazione dei picchi è stata effettuata con esperimenti di ^1H - ^1H COSY e HSQC. Gli spettri di massa ESI (ioni positivi e/o negativi) sono stati eseguiti con uno spettrometro Waters Micromass ZQ. Gli spettri di massa MALDI-TOF sono stati eseguiti con uno spettrometro PerSeptive Biosystems Voyager-De Pro MALDI, utilizzando come matrice l'acido 3,4-diidrossibenzoico.

SINTESI DI 6. Il fenil- β -D-glucopiranoside (3.00 g, 12.0 mmol, 1 equiv) è stato sciolto in 25 mL di *N,N*-dimetilformamide (DMF) anidra. L'acido *p*-toluensolfonico (PTSA, 110 mg, 0.60 mmol, 0.05 equiv) e, goccia a goccia, la benzaldeide dimetilacetale (4.0 mL, 26.0 mmol, 2.2 equiv) sono stati aggiunti alla miscela. Questa è stata tenuta sotto agitazione a 0 °C per 48 ore. La miscela di reazione è stata poi diluita con CHCl_3 , trasferita in un imbuto separatore e lavata due volte con acqua. La fase organica, seccata su Na_2SO_4 anidro e filtrata, è stata poi concentrata a pressione ridotta e purificata mediante cristallizzazione da CHCl_3 , ottenendo così il composto **6** in forma pura (3.92 g, 11.4 mmol) con il 95 % di resa.

6: polvere bianca, p.f. (da etanolo/acetone): 191-193 °C (194-195 °C);

$R_f = 0.4$ [$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 98:2 (v/v)].



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.52-7.00 (segnali complessi, 10H, protoni aromatici); 5.54 [s, 1H, (Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$)]; 5.02 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1); 4.36 (dd, $J = 6.6$ e 10 Hz, 1H, H-3); 3.96-3.54 (segnali sovrapposti, 5H, H-2, H-4, H-5, H-6_a e H-6_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ 156.7, 129.5, 129.3, 128.3, 126.9, 126.2, 123.2 e 116.8 (carboni aromatici); 101.9 (Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$); 101.0 (C-1); 80.2 (C-5); 74.2 (C-3); 73.1 (C-2); 68.5 (C-4); 66.4 (C-6).

ESI-MS (ioni positivi): calc. per $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_6$, 344.126; m/z , trovato 367.19 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 383.25 ($\text{M} + \text{K}^+$).

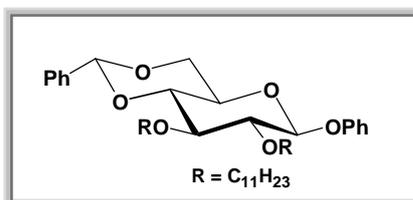
HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc.. per $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{Na}$: 367.1158; trovato 367.1209 ($\text{M} + \text{Na}^+$).

SINTESI DI 1a

SINTESI DI 6-*O*-(4,4'-*O*-DIMETOSSITRIFENILMETIL)-2,3-DI-*O*-UNDECIL-FENIL- β -D-GLUCOPIRANOSIDE, 5a

SINTESI DI 7a. Il composto **6** (1.9 g, 5.65 mmol, 1 equiv), sciolto in 35 mL di *N,N*-dimetilformammide anidra, è stato trattato con idruo di sodio (sospensione al 60% in olio minerale, 540 mg, 22.5 mmol, 4 equiv). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione per 10 min; sono stati aggiunti, in sequenza, 1-bromoundecano (5.0 mL, 22.5 mmol, 4 equiv) e ioduro di sodio, (425 mg, 2.82 mmol, 0.5 equiv). La reazione, lasciata a temperatura ambiente sotto agitazione per 4 ore, è stata bloccata per aggiunta di CH₃OH e concentrata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è stato, poi, diluito con CHCl₃, trasferito in un imbuto separatore, lavato due volte con acqua, concentrato e purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice. L'eluizione della colonna con *n*-esano, contenente percentuali crescenti di acetato di etile (da 1 a 10 %) ha fornito il composto puro **7a** (3.3 g, 5.08 mmol) con il 90 % di resa.

7a: polvere bianca, $R_f = 0.8$ [*n*-esano/acetato di etile, 4:1 (v/v)].



¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.50-7.03 (segnali complessi, 10H, protoni aromatici); 5.56 (s, 1H, Ph-CH); 5.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-1); 4.36 (dd, $J = 10.0$ Hz e 4.5 Hz, 1H, H-6_a); 3.91-3.83 [m, 2H, (CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 3.81-3.71 [m, 3H, H-6_b e (CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 3.64 (t, $J = 9.0$ Hz e 9.5 Hz, 1H, H-4); 3.55 (tripletto apparente, $J = 8.5$ Hz e 9.0 Hz, 1H, H-3); 3.50 (m, 1H, H-5); 3.45 (t, $J = 8.5$ Hz e 8.5 Hz, 1H, H-2); 1.61-1.52 [m, 4H, 2x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 1.31-1.24 [segnali sovrapposti, 32H, 2x(-CH₂-)₈]; 0.88 [t, 6H, 2x(CH₃)].

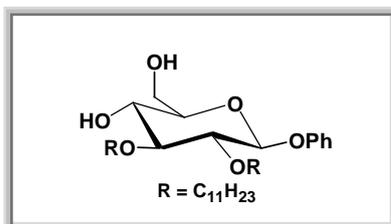
¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 157.1, 138.3, 129.4, 128.8, 128.1, 125.9, 122.8 e 116.8 (carboni aromatici); 102.1 (CH-Ph); 101.1 (C-1); 82.1 (C-5); 81.2 e 81.0 [2x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 73.6 (C-3); 73.5 (C-2); 68.7 (C-4); 66.2 (C-6); 31.8, 30.2, 29.6 e 26.0 [2x(-CH₂-)₈]; 22.6 [2x(CH₂-CH₃)]; 14.0 [2x(CH₃)].

ESI-MS (ioni positivi): calc. per $C_{41}H_{66}O_6$, 654.476; m/z , trovato 677.49 ($M + Na^+$), 693.44 ($M + K^+$).

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calcd. per $C_{41}H_{66}O_6Na$: 677.4757; trovato 677.4720 ($M+Na^+$).

SINTESI DI 8a. Il composto **7a** (3.3 g, 5.08 mmol) è stato trattato con 50 mL di una soluzione di TFA/ CH_2Cl_2 / H_2O 1:10:0.5 (v/v/v). La reazione è stata lasciata sotto agitazione a 0 °C. Dopo 4 ore, la miscela di reazione è stata diluita con CH_2Cl_2 . La fase organica è stata lavata con una soluzione satura di Na_2CO_3 e concentrata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice. L'eluizione della colonna con $CHCl_3$, contenente percentuali crescenti di CH_3OH (da 1 a 5 %) ha fornito il composto **8a** in forma pura (2.4 g, 4.3 mmol) con 85 % di resa.

8a: polvere bianca, $R_f = 0.5$ [$CHCl_3/CH_3OH$, 95:5 (v/v)].



1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ 7.32-6.99 (segnali complessi, 5H, protoni aromatici); 4.97 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1); 3.97-3.91 [segnali sovrapposti, 3H, H-6_a e (CH_2-CH_2-O -Zucchero)]; 3.78 (m, 1H, H-5); 3.71-3.63 [segnali sovrapposti, 3H, H-6_b e (CH_2-CH_2-O -Zucchero)]; 3.50 (m, 1H, H-4); 3.38 (tripletto apparente, $J = 8.5$ Hz e 8.0 Hz 1H, H-3); 3.30 (t, $J = 9.0$ Hz e 9.0 Hz, 1H, H-2); 2.42 (segnale slargato, 1H, 4-OH); 2.01 (segnale slargato, 1H, 6-OH); 1.61-1.52 [m, 4H, $2x(CH_2-CH_2-O$ -Zucchero)]; 1.31-1.23 [segnali sovrapposti, 32H, $2x(-CH_2-)_8$]; 0.88 [t, 6H, $2x(CH_3)$].

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ 157.2, 129.5, 122.6 e 116.6 (carboni aromatici); 101.7 (C-1); 84.2 [$2x(CH_2-CH_2-O$ -Zucchero)]; 81.9 (C-5); 75.2 (C-3); 73.5 (C-2); 72.9 (C-4); 62.7 (C-6); 31.8, 30.3, 29.5, 29.2 e 26.1 [$2x(-CH_2-)_8$]; 22.6 [$2x(CH_2-CH_3)$]; 13.9 [$2x(CH_3)$].

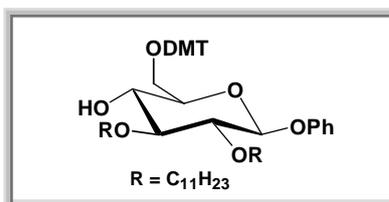
ESI-MS (ioni positivi): calc. per $C_{34}H_{60}O_6$, 564.439; m/z , trovato 587.20 ($M + Na^+$), 603.20 ($M + K^+$).

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per $C_{34}H_{60}O_6Na$: 587.4288; trovato 587.4301 ($M+Na^+$).

SINTESI DI 5a. Il composto **8a** (2.4 g, 4.3 mmol, 1 equiv), sciolto in piridina anidra (12 mL), è stato fatto reagire con DMTrCl (1.9 g, 5.6 mmol, 1.3 equiv). La miscela di reazione, lasciata a temperatura ambiente, sotto agitazione per una notte, è stata poi diluita con CH_3OH

e concentrato. Il grezzo di reazione, successivamente, è stato purificato su colonna di gel di silice eluita con CH_2Cl_2 contenente percentuali crescenti di CH_3OH (dall' 1 al 5 %) in presenza di poche gocce di piridina. Il prodotto **5a** (3.5 g, 4.1 mmol) è stato ottenuto, puro, con una resa del 95 %.

5a: composto cristallino, $R_f = 0.7$ [$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 98:2 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.45-6.77 (segnali complessi, 18H, protoni aromatici), 4.91 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1); 3.91-3.82 [segnali sovrapposti, 3H, H-6_a e ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-Zucchero}$)]; 3.77 [s, 6H, 2x(OCH_3) del gruppo *DMTr*]; 3.70-3.64 [segnali sovrapposti, 3H, H-6_b e ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-Zucchero}$)]; 3.60-3.25 (segnali sovrapposti, 4H, H-4, H-5, H-2 e H-3); 1.62-1.50 [m, 4H, 2x($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-Zucchero}$)]; 1.37-1.20 [segnali sovrapposti, 32H, 2x($-\text{CH}_2-$)₈]; 0.88 [t, 6H, 2x(CH_3)].

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 158.3, 144.7, 135.8, 123.0, 129.5, 129.3, 129.0, 128.7, 128.1, 127.7, 127.0, 126.6, 124.9, 122.4, 116.9 e 113.0 (carboni aromatici); 101.6 (C-1); 85.0 (C quaternario del gruppo *DMTr*); 84.4 [2x($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-Zucchero}$)]; 81.8 (C-5); 73.6 (C-3); 73.0 (C-2); 71.2 (C-4); 63.8 (C-6); 55.1 [2x(OCH_3) del gruppo *DMTr*]; 31.8, 30.3, 29.5, 29.5, 29.2 e 26.1 [2x($-\text{CH}_2-$)₈]; 22.6 [2x($\text{CH}_2\text{-CH}_3$)]; 14.0 [2x(CH_3)].

ESI-MS (ioni positivi): calc. per $\text{C}_{55}\text{H}_{78}\text{O}_8$, 866.570; m/z , trovato 889.20 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 905.18 ($\text{M} + \text{K}^+$).

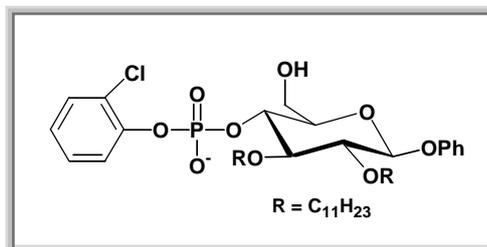
HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per $\text{C}_{55}\text{H}_{78}\text{O}_8\text{Na}$: 889.5594; trovato 889.5623 ($\text{M} + \text{Na}^+$).

SINTESI DI 2,3-DI-O-UNDECIL-FENIL- β -D-GLUCOPIRANOSIDE-4-O-(2-CLOROFENILFOSFATO), **3a**.

Il 2-clorofenil-diclorofosfato (715 μL , 4.4 mmol, 4 equiv) è stato aggiunto, goccia a goccia, ad una soluzione contenente **5a** (1.0 g, 1.1 mmol, 1 equiv), 1,2,4-triazolo (607 mg, 8.8 mmol, 8 equiv) e trietilammina (1.2 mL, 8.8 mmol, 8 equiv) in piridina anidra (11 mL) e la soluzione risultante è stata tenuta a 0 °C sotto agitazione. La miscela di reazione è stata, poi, portata a temperatura ambiente e dopo 3 ore è stata concentrata a pressione ridotta. Il residuo è stato diluito con CHCl_3 , trasferito in un imbuto separatore, lavato due volte con acqua, concentrato e purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice, eluendo con

CH₂Cl₂ contenente percentuali crescenti di CH₃OH (dall' 1 al 10 %) in presenza di alcune gocce di TFA. Il composto **3a** (785 mg, 1.0 mmol) è stato ottenuto puro con una resa del 95 %.

3a: olio, sale di trietilammonio $R_f = 0.3$ [CH₂Cl₂/CH₃OH, 95:5 (v/v)].



¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 7.60-6.96 (segnali complessi, 9H, protoni aromatici); 5.00 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-1); 4.35 (m, 1H, H-4); 3.96-3.92 [segnali sovrapposti, 3H, H₂-6 e 1x(CH₂-CH-O-Zucchero)]; 3.77-3.58 [segnali sovrapposti, 3H, 3x(CH₂-CH-O-Zucchero)]; 3.54-3.46 (segnali sovrapposti, 2H, H-3 e H-5); 3.34 (t, 1H, H-2); 1.60-1.52 [m, 4H, 2x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 1.37-1.18 [segnali sovrapposti, 32H, 2x(-CH₂-)₈]; 0.90-0.88 [m, 6H, 2x(CH₃)].

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 157.5, 148.5, 146.8, 129.9, 129.4, 127.6, 123.9, 122.7, 121.2 e 116.6 (carboni aromatici); 102.2 (C-1); 83.4 [2x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 81.4 (C-5); 75.2 (C-4); 74.0 (C-3); 73.1 (C-2); 60.6 (C-6); 31.8, 30.3, 29.5, 29.4, 25.9 e 25.7 [2x(-CH₂-)₈]; 22.6 [2x(CH₂-CH₃)]; 13.9 [2x(CH₃)].

³¹P NMR (CD₃OD, 161.98 MHz): δ -6.5.

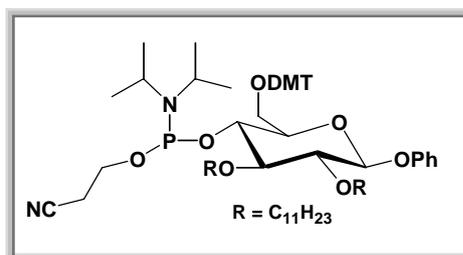
ESI-MS (ioni negativi): calc. per C₄₀H₆₄ClO₉P, 754.398; m/z , trovato 753.18 (M - H)⁻.

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per C₄₀H₆₃ClO₉P: 753.3898; trovato: 753.3945 (M-H)⁻.

SINTESI DI 6-O-(4,4'-O-DIMETOSSITRIFENILMETIL)-2,3-DI-O-UNDECIL-FENIL- β -D-GLUCOPIRANOSIDE-4-O-(2-CIANOETIL-N,N-DIISOPROPIL)FOSFORAMMIDITO, 4a.

Ad una soluzione di **5a** (1.0 g, 1.1 mmol, 1 equiv), sciolto in CH₂Cl₂ anidro (9.4 mL) sono stati aggiunti *N,N*-diisopropiletilammina (DIPEA) (765 μ L, 4.4 mmol, 4 equiv) e 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforammidito (490 μ L, 2.2 mmol, 2 equiv), sotto agitazione a temperatura ambiente. Dopo 2 ore, la miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è stato cromatografato su colonna di gel di silice, eluita con *n*-esano contenente percentuali crescenti di acetato di etile (dal 20 al 50 %) in presenza di gocce di trietilammina, fornendo il composto desiderato **4a** (1.0 g, 0.99 mmol) con una resa del 90 %.

4a: olio, miscela di diastereoisomeri, $R_f = 0.5$ [*n*-esano/acetato di etile, 4:1 (v/v)].



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.45-6.70 (segnali complessi, 36H, protoni aromatici); 4.94 [m, 2H, 2x(H-1)]; 3.98-3.96 [m, 2H, 2x(H-6_a)]; 3.84-3.70 {segnali sovrapposti, 18H, 2xN[CH(CH₃)₂]₂, 2x(H-6_b) e 4x(OCH₃) del gruppo *DMTr*}; 3.67-3.26 [segnali sovrapposti, 20H, 2x(O-CH₂-CH₂-CN), 4x(CH₂-O-Zucchero), 2x(H-4), 2x(H-5), 2x(H-2) e 2x(H-3)]; 2.64 e 2.53 [due t, 2H ognuno, 2x(-O-CH₂-CH₂-CN)]; 1.62-1.24 [segnali complessi, 64H, 4x(-CH₂-)₈]; 1.20-1.05 {segnali complessi, 24H, 2xN[CH(CH₃)₂]₂}; 0.90, 0.88 e 0.86 [s, 12H, 4x(CH₃)].

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 158.2, 130.1, 129.3, 128.2, 127.6, 126.5, 122.3, 116.7 e 112.9 (carboni aromatici); 101.3 (C-1); 84.5 (C quaternari del gruppo *DMTr*); 82.0 (C-5); 81.8 [2x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 75.4 e 75.3 (C-4); 73.4 e 73.1 (C-3); 72.5 (C-2); 63.9 (C-6); 60.7 (-O-CH₂-CH₂-CN); 55.0 (OCH₃ del gruppo *DMTr*); 43.0 {N[CH(CH₃)₂]₂}; 31.8, 30.3, 29.6, 29.3 e 26.1 [2x(-CH₂-)₈]; 24.3 {N[CH(CH₃)₂]₂}; 22.6 [2x(CH₂-CH₃)]; 14.0 [2x(CH₃) e -O-CH₂-CH₂-CN].

$^{31}\text{P NMR}$ (CDCl_3 , 161.98 MHz): δ 151.4 e 150.2.

ESI-MS (ioni positivi): calc. per C₆₄H₉₅N₂O₉P, 1066.678; *m/z*, trovato 1067.84 (M + H⁺); 1105.61 (M + K⁺); 1168.74 (M + Et₃NH⁺).

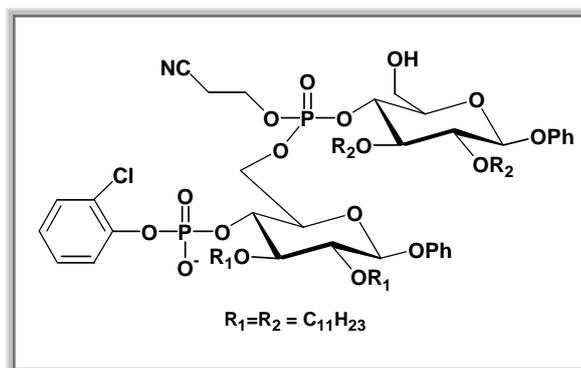
HRMS (Maldi-TOF): *m/z*: calc. per C₆₄H₉₅N₂O₉PNa: 1089.6673; trovato 1089.6684 (M+Na⁺).

SINTESI DEL DIMERO LINEARE **2a**.

Il derivato **3a** (150 mg, 0.198 mmol, 1 equiv) e il derivato **4a** (255 mg, 0.240 mmol, 1.2 equiv), previamente anidrificati mediante ripetute coevaporate con CH₃CN anidro e tenuti a seccare sotto pressione, sono stati fatti reagire con una soluzione 0.45 M di tetrazolo in CH₃CN anidro (5.0 mL). La reazione è stata tenuta sotto agitazione a temperature ambiente e seguita mediante TLC utilizzando come sistema eluente CH₂Cl₂/CH₃OH, 95:5 (v/v). Dopo 2 ore, alla miscela di reazione è stata aggiunta una soluzione 5.5 M di *tert*-butilidroperossido

(*t*-BuOOH) in decano (1.0 mL). Dopo 30 min la miscela di reazione è stata concentrata, diluita con CHCl₃ e lavata con acqua. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice, eluendo con CH₂Cl₂ contenente percentuali crescenti di CH₃OH (dall' 1 al 10 %) in presenza di alcune gocce di TFA. Il derivato **2a** (225 mg, 0.158 mmol) è stato ottenuto in forma pura con una resa dell'80 %.

2a: olio, *R_f* = 0.4 [CH₂Cl₂/CH₃OH, 95:5 (v/v)].



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.58-6.80 (segnali complessi, 14H, protoni aromatici); 4.92 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-1); 4.81 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-1'); 4.45-4.22 [segnali sovrapposti, 13H, H₂-6-O-P, (-O-CH₂-CH₂-CN), 1xH-4 e 4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 3.92-3.32 [segnali sovrapposti, 9H, H₂-6-OH, 1x(H-4), 2x(H-2), 2x(H-5) e 2x(H-3)]; 2.57-2.51 [m, 2H, (-O-CH₂-CH₂-CN)]; 1.60-1.54 [m, 8H, 4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 1.34-1.26 [segnali sovrapposti, 64H, 4x(-CH₂-)]; 0.87 [t, 12H, 4x(CH₃)].

³¹P NMR (CDCl₃, 161.98 MHz): δ -2.7 e -8.5.

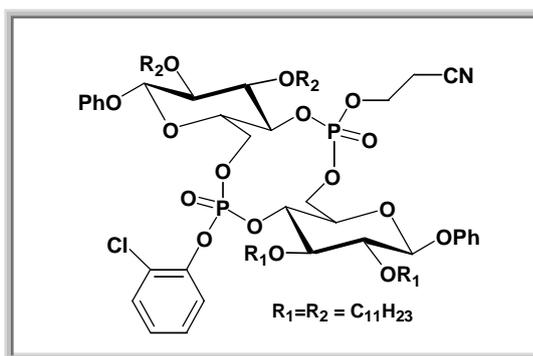
ESI-MS (ioni negativi): calc per C₇₇H₁₂₆ClNO₁₇P₂, 1433.819; *m/z*, trovato 1433.56 (M - H)⁻.

HRMS (Maldi-TOF): *m/z*: calc. per C₇₇H₁₂₅ClNO₁₇P₂: 1432.8116; trovato: 1432.8139 (M - H)⁻.

SINTESI DEL DIMERO CICLICO **1a**.

Il composto **2a** (35 mg, 0.024 mmol, 1 equiv), anidrificato mediante ripetute coevaporate con piridina anidra, e l'agente condensante MSNT (213 mg, 0.72 mmol, 30 equiv) sono stati sciolti in piridina anidra (24 mL) e lasciati sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte. La miscela di reazione è stata poi concentrata a pressione ridotta, diluita con CH₂Cl₂, trasferita in un imbuto separatore e lavata due volte con acqua, concentrata e purificata mediante colonna cromatografica. L'eluizione con CH₂Cl₂ contenente percentuali crescenti di CH₃OH (dall' 1 al 10 %) ha fornito il composto puro **9a** (25 mg, 0.018 mmol) con una resa del 75 %.

9a: olio, $R_f = 0.5$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 97:3 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.35-6.53 (segnali complessi, 14H, protoni aromatici); 5.02 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-1); 4.81 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-1'); 4.70 (m, 1H, H-4); 4.58 (m, 1H, H-4'); 4.46-4.16 [segnali sovrapposti, 6H, H₂-6, (-O-CH₂-CH₂-CN), H-3 e H-3']; 3.98-3.85 (segnali sovrapposti, 2H, H₂-6'); 3.77 [(t, 8H, 4x(-CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 3.68 (m, 1H, H-5); 3.54 (segnali sovrapposti, 2H, H-5' e H-2); 3.42 (m, 1H, H-2'); 2.70-2.61 [m, 2H, (-O-CH₂-CH₂-CN)]; 1.63-1.57 [m, 8H, 4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 1.38-1.17 [segnali sovrapposti, 64H, 4x(-CH₂-)]; 0.90-0.85 [m, 12H, 4x(CH₃)].

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 156.7, 131.7, 131.7, 130.5, 129.7, 129.4, 127.6, 126.3, 123.0, 122.7, 122.1, 116.6 e 116.3 (carboni aromatici); 117.1 (CN); 101.3 e 101.3 (C-1 e C-1'); 82.0 e 81.7 (C-5 e C-5'); 81.4 [4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 74.6 e 74.5 (C-4 e C-4'); 73.6 e 73.5 (C-2 e C-2'); 72.4 e 72.1 (C-3 e C-3'); 66.1 e 65.4 (C-6 e C-6'); 62.2 (-O-CH₂-CH₂-CN); 31.8, 30.2, 30.0, 29.5, 29.5 e 29.2 [4x(-CH₂-)]; 22.6 [4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 19.1 (-O-CH₂-CH₂-CN); 14.0 [4x(CH₃)].

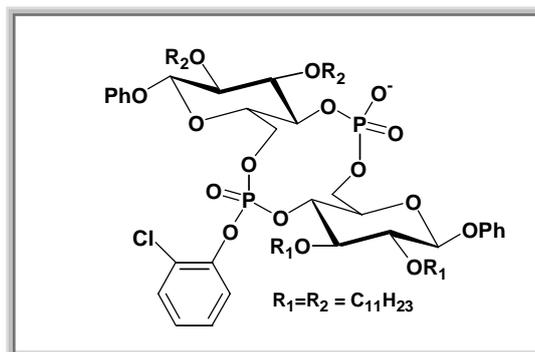
^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz): δ -4.9 e -9.4.

ESI-MS (ioni positivi): calc. per $\text{C}_{77}\text{H}_{124}\text{ClNO}_{16}\text{P}_2$, 1415.808; m/z , trovato 1438.60 (M + Na⁺), 1454.61 (M + K⁺).

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per $\text{C}_{77}\text{H}_{124}\text{ClNO}_{16}\text{P}_2\text{Na}$: 1438.7982; trovato 1438.8019 (M+Na⁺).

Per rimuovere selettivamente il gruppo 2-cianoetile, il composto **9a** (25 mg, 0.018 mmol) è stato trattato con Et₃N/piridina (3 mL, 1:1, v/v) sotto agitazione a 50 °C per una notte. La reazione è stata interrotta portando a secco, a pressione ridotta, il solvente. La miscela di reazione è stata purificata mediante colonna cromatografica eluita con CH_2Cl_2 contenente percentuali crescenti di CH_3OH (dall' 1 al 10 %), fornendo il composto **10a** in forma pura (23 mg, 0.018 mmol) con una resa quasi quantitativa.

10a: olio, $R_f = 0.3$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 97:3 (v/v)].



1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.70-6.83 (segnali complessi, 14H, protoni aromatici); 4.96 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1); 4.81 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1'); 4.75 (m, 1H, H-4); 4.45- 4.02 (segnali sovrapposti, 5H, H₂-6, H-4', H-3 e H-3'); 3.94-3.50 (segnali sovrapposti, 11H, 4x(-CH₂-CH₂-O-Zucchero), H₂-6' e H-5); 3.48-3.23 (segnali sovrapposti, 3H, H-5', H-2 e H-2'); 1.67-1.55 [m, 8H, 4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 1.40-1.09 [segnali sovrapposti, 64H, 4x(-CH₂-)₈]; 0.87 [m, 12H, 4x(CH₃)].

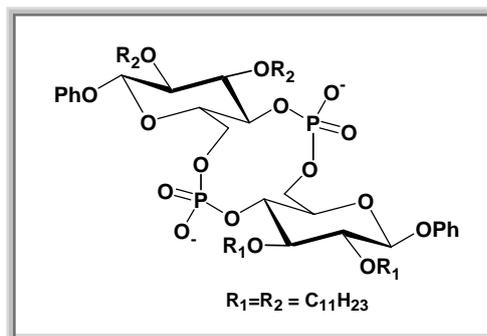
^{31}P NMR (CDCl₃, 161.98 MHz): δ -2.5 e -9.9.

ESI-MS (ioni negativi): calc. per C₇₄H₁₂₁ClO₁₆P₂, 1362.781; m/z , trovato 1361.92 (M - H)⁻.

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per C₇₄H₁₂₀ClO₁₆P₂: 1361.7740; trovato: 1361.7865 (M-H)⁻.

Il composto **10a** (23 mg, 0.013 mmol), sciolto in diossano (200 μ L), è stato fatto reagire con 1 mL di una soluzione acquosa satura di LiOH e, la miscela risultante, lasciata per una notte a 50 °C. Quindi la miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta, il residuo ridisciolto in CH₂Cl₂, trasferito in un imbuto separatore e lavato con una soluzione acquosa satura di NH₄Cl. La fase organica è stata, poi, concentrata e purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice. L'eluizione con CH₂Cl₂ contenente percentuali di CH₃OH (fino al 15 %) ha portato ad ottenere il dimero ciclico **1a** (22 mg, 0.013 mmol) con una resa pressochè quantitativa.

1a: olio, $R_f = 0.5$ [CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1 (v/v)].



1H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K, 14 mM): δ 7.30-6.93 (segnali complessi, 10H, protoni aromatici); 4.91 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-1); 4.83 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-1'); 4.61-4.33 (m, 2H, H-4 e H-4'); 4.20-4.09 (m, 4H, H₂-6 e H₂-6'); 4.03-3.98 [segnali sovrapposti, 8H, 4x(-CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 3.90-3.40 (segnali sovrapposti, 6H, H-3 e H-3', H-5 e H-5', H-2 e H-2'); 1.66-1.53 [m, 8H, 4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 1.34-1.09 [segnali sovrapposti, 64H, 4x(-CH₂-)₈]; 0.87 [m, 12H, 4x(CH₃)].

^{31}P NMR (CDCl₃, 161.98 MHz, 298 K, 14 mM): δ 0.3 e -0.3.

1H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K, 1.7 mM): δ 7.32-6.98 (segnali complessi, 10H, protoni aromatici); 4.94 [d, $J = 7.0$ Hz, 2H, 2x(H-1)]; 4.60-4.40 [segnali sovrapposti, 6H, 2x(H-4) e 2x(H₂-6)]; 4.00-3.74 [segnali sovrapposti, 10H, 2x(H-3) e 4x(-CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 3.51-3.45 [segnali sovrapposti, 4H, 2x(H-5) e 2x(H-2)]; 1.86-1.50 [m, 8H, 4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 1.34-1.07 [segnali sovrapposti, 64H, 4x(-CH₂-)₈]; 0.91 [m, 12H, 4x(CH₃)].

^{31}P NMR (CDCl₃, 161.98 MHz, 298 K, 1.7 mM): δ -0.4.

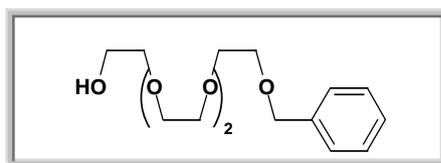
ESI-MS (ioni negativi): calc. per C₆₈H₁₁₈O₁₆P₂, 1252.789 m/z , trovato 1251.97 (M - H)⁻, 625.21 (M - 2H)²⁻.

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per C₆₈H₁₁₇O₁₆P₂: 1251.7817; trovato: 1251.7885 (M-H)⁻.

SINTESI DI **1b**SINTESI DI **BnO-TEG-OMs (II)**

SINTESI DI BnO-TEG-OH (I). Il tetraetilenglicole (TEG) (2.82 g, 14.5 mmol, 1 equiv), sciolto in THF anidro (8 mL), è stato messo a reagire con NaH (sospensione al 60% in olio minerale, 208 mg, 8.7 mmol, 1.6 equiv). La miscela è stata lasciata sotto agitazione per 10 min, quindi è stato aggiunto benzilbromuro (1.5 mL, 8.7 mmol, 1.6 equiv). La miscela di reazione, dopo 12 ore, è stata diluita con CH₃OH per spegnere l'eccesso di NaH, filtrata su celite e purificata mediante colonna cromatografica eluendo con acetato di etile. Il composto **I** è stato recuperato in forma pura con una resa del 65 % (2.69 g, 9.47 mmol).

I: olio, $R_f = 0.5$ [acetato di etile].



¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.35-7.32 (m, 5H, protoni aromatici); 4.56 [s, 2H, (-CH₂-Ph)]; 3.75-3.62 [segnali sovrapposti, 14H, 3x(-O-CH₂-CH₂-O-) e (-O-CH₂-CH₂-OH)]; 3.59 (t, $J = 4.5$ e 4.5 Hz, 2H, -CH₂OH).

¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 138.1, 128.2, 127.6 e 127.4 (carboni aromatici); 73.1 (-CH₂-Ph); 72.4, 70.5, 70.2 e 69.3 [(-O-CH₂-CH₂-O-)]; 61.6 (O-CH₂-CH₂-OH).

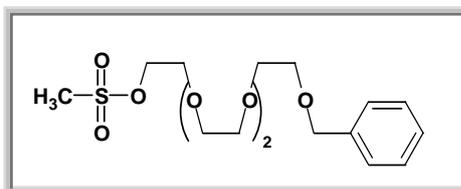
ESI-MS (ioni positivi): calc. per C₁₅H₂₃O₅, 283.154; m/z , trovato 306.69 (M + Na⁺), 322.65 (M + K⁺).

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per C₁₅H₂₃O₅Na: 306.1443; trovato 306.1460 (M+Na⁺).

SINTESI DI BnO-TEG-OMs (II). A 2.69 g di composto **I** (9.47 mmol, 1 equiv), sciolto in 22 mL di CH₂Cl₂ anidro, sono stati aggiunti, nell'ordine, DIPEA (3.3 mL, 18.9 mmol, 2 equiv) e mesilcloruro (MsCl) (875 μ L, 11.4 mmol, 1.2 equiv). La miscela risultante è stata lasciata sotto agitazione, a temperatura ambiente per una notte, quindi concentrata a pressione ridotta, trasferita in un imbuto separatore e lavata con una soluzione satura di NaCl. La fase organica, seccata su Na₂SO₄ anidro, è stata filtrata, concentrata e cromatografata su colonna di gel di silice. L'eluizione con acetato di etile/*n*-esano 9:1 (v/v), aumentando progressivamente

la percentuale di acetato di etile fino al 100 %, ha fornito il prodotto **II** (3.26 g, 9.00 mmol) con il 95 % di resa.

II: olio, $R_f = 0.6$ [acetato di etile].



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.34-7.22 (m, 5H, protoni aromatici); 4.56 [s, 2H, (- CH_2 -Ph)]; 4.36 [tripletto apparente, $J = 4.5$ e 5.0 Hz, 2H, (- CH_2 - CH_2 -O-Ms)]; 3.75 [tripletto apparente, $J = 4.5$ e 4.0 Hz, 2H, (- CH_2 - CH_2 -O- CH_2 Ph)]; 3.67-3.61 [segnali sovrapposti, 12H, $3 \times$ (-O- CH_2 - CH_2 -O-)]; 3.05 [s, 3H, (- SO_2 - CH_3)].

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ 138.1, 128.2, 127.6 e 127.5 (carboni aromatici); 73.1 (CH_2 -Ph); 70.5, 70.4 e 69.3 [$3 \times$ (-O- CH_2 - CH_2 -O-)]; 69.1 (-O- CH_2 - CH_2 -O-Ms); 68.9 (-O- CH_2 - CH_2 -O-Ms); 37.5 (- SO_2 - CH_3).

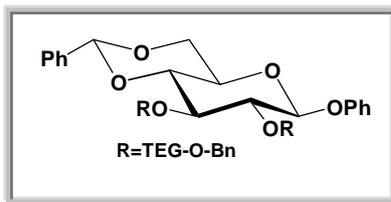
ESI-MS (ioni positivi): calc. per $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{S}$, 362.140; m/z , trovato 385.69 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 401.65 ($\text{M} + \text{K}^+$).

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{SNa}$: 385.1297; trovato 385.1401 ($\text{M} + \text{Na}^+$).

SINTESI DI **6-O-(4,4'-DIMETOSSITRIFENILMETIL)-2,3-DI-O-TEG-FENIL- β -D-GLUCOPIRANOSIDE, 5b.**

SINTESI DI 7b. Il composto **6** (774 mg, 2.25 mmol, 1 equiv) sciolto in *N,N*-dimetilformammide anidra (15.0 mL), è stato fatto reagire con NaH (162 mg, 6.75 mmol, 3 equiv). La miscela è stata lasciata sotto agitazione per 10 min, poi 2.45 g di composto **II** (6.75 mmol, 3 equiv) sono stati aggiunti a temperatura ambiente. Dopo 4 ore, la reazione è stata interrotta mediante aggiunta di CH_3OH , e la miscela concentrata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è stato poi diluito con CHCl_3 , trasferito in un imbuto separatore e lavato due volte con acqua. La fase organica è stata, quindi, concentrata e purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice. L'eluizione con acetato di etile/*n*-esano 85/15 (v/v) ha fornito il composto **7b** (1.60 g, 1.80 mmol) in forma pura con una resa dell' 80 %.

7b: olio, $R_f = 0.5$ [acetato di etile/*n*-esano, 85:15 (v/v)].



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.50-7.03 (segnali complessi, 20H, protoni aromatici); 5.54 [s, 1H, (Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$)]; 5.03 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1); 4.56 [s, 4H, (- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Ph)]; 4.36 (dd, $J = 5.0$ e 5.0 Hz, 1H, H-4); 4.08-4.04 [m, 2H, (- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O-C-2)]; 4.02-3.83 [segnali sovrapposti, 3H, ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O-C-3) e H-6_a)]; 3.78 (t, $J = 10.4$ e 10.4 Hz, 1H, H-3); 3.69-3.56 [segnali sovrapposti, 29H, 7x(O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O) e H-6_b)]; 3.52 (tripletto apparente, $J = 9.0$ e 8.0 Hz, 1H, H-2); 3.49-3.44 (m, 1H, H-5).

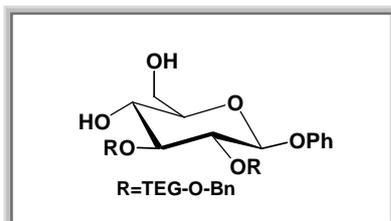
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ 157.2, 138.3, 137.2, 129.4, 128.9, 128.2, 128.1, 127.6, 127.5, 127.5, 126.0, 122.9, 117.1 e 116.6 (carboni aromatici); 101.9 (Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$); 101.2 (C-1); 82.5 e 81.7 [($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Ph)]; 80.7 (C-5); 73.1 [2x(- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Ph)]; 72.5 e 72.4 [2x($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O-Zucchero)]; 70.5 [12x (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O)], 69.4 (C-3); 68.6 (C-4); 66.3 (C-2); 62.5 (C-6).

ESI-MS (ioni positivi): calc. per $\text{C}_{49}\text{H}_{64}\text{O}_{14}$, 876.430; m/z , trovato 898.98 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 914.95 ($\text{M} + \text{K}^+$).

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per $\text{C}_{49}\text{H}_{64}\text{O}_{14}\text{Na}$: 899.4194; trovato 899.4248 ($\text{M} + \text{Na}^+$).

SINTESI DI 8b. Il derivato **7b** (1.60 g, 1.80 mmol, 1 equiv) è stato fatto reagire con 5 mL di una soluzione di TFA/ CH_2Cl_2 / H_2O (1:10:0.5, v/v/v) a 0 °C. Dopo 4 ore, la miscela di reazione è stata diluita con CH_2Cl_2 , lavata con acqua e poi concentrata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante colonna cromatografica. L'eluizione con acetato di etile, contenente percentuali crescenti di CH_3OH (dal 10 al 20 %) ha fornito il composto **8b** (1.40 g, 1.80 mmol) con una resa pressochè quantitativa.

8b: olio, $R_f = 0.2$ [acetato di etile].



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.30-6.94 (segnali complessi, 15H, protoni aromatici); 4.91 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-1); 4.52 e 4.51 [singoletti, 2H ognuno, 2x($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Ph)]; 4.10-3.92 [m, 4H, 2x(- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O-Zucchero)]; 3.86-3.68 (segnali sovrapposti, 7H, H-4, H₂-6 e 2x($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Ph)];

3.62-3.49 [segnali sovrapposti, 25H, H-3 e 6x(O-CH₂-CH₂-O-)]; 3.42-3.36 (m, 1H, H-5); 3.34 (t, $J = 6.0$ e 7.2 Hz, 1H, H-2); 2.24 [t, 1H, (CH₂OH)].

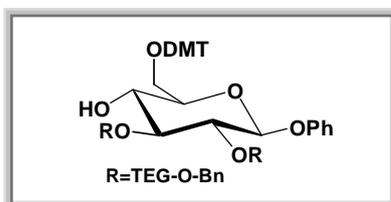
¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 157.0, 139.0, 129.4, 128.2, 127.6, 127.5, 122.6 e 116.5 (carboni aromatici); 101.1 (C-1); 85.8 [2x(CH₂-O-CH₂-Ph)]; 82.0 (C-5); 75.3 (C-4); 73.1 [2x(-CH₂-Ph)]; 72.3 (C-3); 71.9 (C-2); 70.8 e 70.5 [segnali sovrapposti, 6x(O-CH₂-CH₂-O)]; 69.3 [2x(CH₂-O-Zucchero)]; 62.9 (C-6).

ESI-MS (ioni positivi): calc. per C₄₂H₆₀O₁₄, 788.398; m/z , trovato 811.49 (M + Na⁺), 827.50 (M + K⁺).

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per C₄₂H₆₀O₁₄Na: 811.3881; trovato 811.3899 (M+Na⁺).

SINTESI DI 5b. Il composto **8b** (1.40 g, 1.80 mmol, 1 equiv), sciolto in piridina anidra (5.4 mL), è stato fatto reagire con DMTrCl (731 mg, 2.16 mmol, 1.3 equiv). La miscela di reazione, lasciata a temperatura ambiente sotto agitazione per una notte, è stata poi diluita con CH₃OH e concentrata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è stato direttamente purificato su colonna di gel di silice. Eluendo la colonna con CH₂Cl₂ contenente percentuali crescenti di CH₃OH (dall' 1 al 5 %) in presenza di poche gocce di TEA è stato ottenuto il prodotto **5b** (2.00 g, 1.80 mmol) con una resa del 98 %.

5b: composto cristallino, $R_f = 0.7$ [CHCl₃/CH₃OH, 98:2 (v/v)].



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.54-6.82 (segnali complessi, 28H, protoni aromatici); 5.06 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-1); 4.67 e 4.63 [due s, 2H ognuno, 2x(CH₂-Ph)]; 4.30-4.20 [segnali sovrapposti, 3H, (CH₂-O-Zucchero) e H-6_a]; 4.02-3.90 [segnali sovrapposti, 3H, (CH₂-O-Zucchero) e H-6_b]; 3.85-3.82 [m, 5H, 2x(CH₂-O-CH₂-Ph) e H-4]; 3.80-3.60 [segnali sovrapposti, 32H, H-3, H-5, 6x(O-CH₂-CH₂-O) e 2x(OCH₃ del gruppo DMTr)]; 3.54 (m, 1H, H-2).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 158.2, 149.7, 145.0, 138.2, 135.8, 130.0, 129.3, 128.2, 127.6, 126.4, 123.6, 122.4, 116.9, 114.7 e 112.9 (carboni aromatici); 101.2 (C-1); 86.1 (C quaternario del gruppo DMTr); 84.9 [2x(CH₂-O-CH₂-Ph)]; 82.1 (C-5); 75.3 (C-4); 73.1 [2x(-CH₂-Ph)]; 72.3 (C-3); 71.8 (C-2); 70.5 (O-CH₂-CH₂-O); 69.3 [2x(CH₂-O-Zucchero)]; 64.0 (C-6); 55.0 (OCH₃ del DMTr).

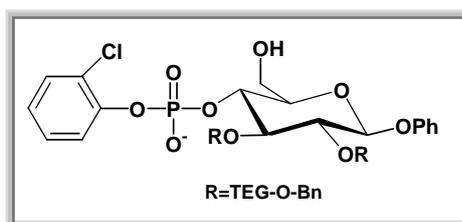
ESI-MS (ioni positivi): calc. per $C_{63}H_{78}O_{16}$, 1090.529; m/z , trovato 1113.58 ($M + Na^+$), 1129.58 ($M + K^+$).

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per $C_{63}H_{78}O_{16}Na$: 1113.5188; trovato 1113.5233 ($M+Na^+$).

SINTESI DI 2,3-DI-O-TEG-FENIL- β -D-GLUCOPIRANOSIDE-4-O-(2-CLOROFENILFOSFATO), 3b.

Il 2-clorofenil-diclorofosfato (590 μ L, 3.64 mmol, 4 equiv) è stato aggiunto, goccia a goccia, sotto agitazione, a 0 °C ad una soluzione contenente il composto **5b** (1.0 g, 0.91 mmol, 1 equiv), 1,2,4-triazolo (503 mg, 7.28 mmol, 8 equiv) e trietilammina (1.0 mL, 7.28 mmol, 8 equiv), sciolti in piridina anidra (8.8 mL). La miscela di reazione è stata poi portata a temperatura ambiente. Dopo 3 ore la miscela di reazione è stata concentrata, diluita con $CHCl_3$ e lavata due volte con acqua. L'eluizione su colonna cromatografica con CH_2Cl_2 , addizionato di poche gocce di TFA, contenente percentuali crescenti di CH_3OH (dall' 1 al 10 %), ha fornito il derivato **3b** (810 mg, 0.84 mmol) in forma pura con una resa del 92 %.

3b: olio, sale di trietilammonio, $R_f = 0.3$ [CH_2Cl_2/CH_3OH , 95:5 (v/v)].



1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.31-6.93 (segnali complessi, 19H, protoni aromatici); 4.88 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-1); 4.55-4.51 [m, 4H, 2x(- $\underline{C}H_2$ -Ph)]; 4.02-3.88 [segnali sovrapposti, 11H, 2x(- $\underline{C}H_2$ -O- $\underline{C}H_2$ Ph), 2x($\underline{C}H_2$ -O-Zucchero), H-4 e H₂-6]; 3.74-3.47 [segnali sovrapposti, 27H, H-3, H-2, H-5 e 6x(O- $\underline{C}H_2$ - $\underline{C}H_2$ -O)].

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 165.0, 156.6, 148.2, 141.9, 137.6, 137.2, 129.8, 129.2, 128.1, 127.4, 124.9, 124.2, 122.5, 121.7 e 116.2 (carboni aromatici); 100.8 (C-1); 85.6 e 83.8 [2x($\underline{C}H_2$ -O- $\underline{C}H_2$ -Ph)]; 81.3 (C-5); 74.7 (C-4); 72.8 e 72.5 [2x(- $\underline{C}H_2$ -Ph)]; 72.4 (C-2); 71.4 (C-3); 70.0, 69.8, 69.6, 69.3 e 68.8 [(O- $\underline{C}H_2$ - $\underline{C}H_2$ -O), 2x($\underline{C}H_2$ - $\underline{C}H_2$ -O-Zucchero)]; 67.9 (C-6).

^{31}P NMR ($CDCl_3$, 161.98 MHz): δ -4.5.

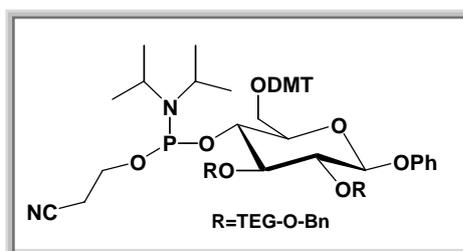
ESI-MS (ioni negativi): calc. per $C_{48}H_{63}ClO_{17}P$, 977.349; m/z , trovato 976.84 ($M - H$)⁻.

HRMS (MALDI-TOF): m/z : calc. per $C_{48}H_{62}ClO_{17}P$: 976.3413; trovato: 976.3480 ($M-H$)⁻.

SINTESI DI 6-O-(4,4'-DIMETOSSITRIFENILMETIL)-2,3-DI-O-TEG-FENIL- β -D-GLUCOPIRANOSIDE-4-O-(2-CIANOETIL-N,N-DIISOPROPIL)FOSFORAMMIDITO, 4b.

Ad una soluzione di **5b** (1.0 g, 0.91 mmol, 1 equiv), sciolta in CH_2Cl_2 anidro (7 mL), sono stati aggiunti DIPEA (630 μL , 3.6 mmol, 4 equiv) e 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforammidito (400 μL , 1.82 mmol, 2 equiv); la miscela risultante è stata tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente. Dopo 2 ore, la miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è stato, quindi, purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice eluendo con *n*-esano contenente percentuali crescenti di acetato di etile (dal 20 al 50 %) in presenza di alcune gocce di TEA, ottenendo così il composto **4b** (993 mg, 0.77 mmol) con una resa dell' 85 %.

4b: olio, miscela di diastereoisomeri, $R_f = 0.2$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 98:2 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.46-6.81 (segnali complessi, 56H, protoni aromatici); 5.07 [m, 2H, 2x(H-1)]; 4.66 [s, 8H, 4x(- CH_2 -Ph)]; 4.14-3.91 [segnali sovrapposti, 14H, 2x(-O- CH_2 - CH_2 -CN), 4x(- CH_2 -O-Zucchero) e 2x(H-6_a)]; 3.87-3.83 [segnali sovrapposti, 10H, 4x(CH_2 -O- CH_2 Ph) e 2x(H-4)]; 3.79-3.71 [segnali sovrapposti, 64H, 2x(H-6_b), 2x(H-3), 12x(O- CH_2 - CH_2 -O) e 4x(OCH₃ del gruppo *DMTr*)]; 3.68-3.46 [segnali sovrapposti, 4H, 2x(H-2) e 2x(H-5)]; 3.40-3.29 {m, 4H, 2xN[$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$]}; 2.48-2.35 [m, 4H, 2x(-O- CH_2 - CH_2 -CN)]; 1.18, 1.17, 1.16, 1.15, 1.11, 1.10, 0.96 e 0.95 {s, 3H ognuno, 24H, 4xN[$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$]}.

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 158.3, 157.3, 138.3, 136.2, 130.1, 129.3, 128.2, 127.6, 126.5, 122.4, 116.9 e 112.9 (carboni aromatici); 117.2 (CN); 101.1 (C-1); 86.0 (C quaternario del gruppo *DMTr*); 85.0 e 84.6 [2x(CH_2 -O- CH_2 -Ph)]; 82.5 (C-5); 75.3 (C-4); 73.1 [2x(- CH_2 -Ph)]; 72.3 (C-3); 72.0 (C-2); 70.5 (O- CH_2 - CH_2 -O); 69.4 [2x(CH_2 -O-Zucchero)]; 63.8 (C-6); 60.2 (-O- CH_2 - CH_2 -CN); 55.0 (OCH₃ del gruppo *DMTr*); 43.0 {N[$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$]}; 24.4 {N[$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$]}; 14.1 (-O- CH_2 - CH_2 -CN).

^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz): δ 151.1 e 150.5.

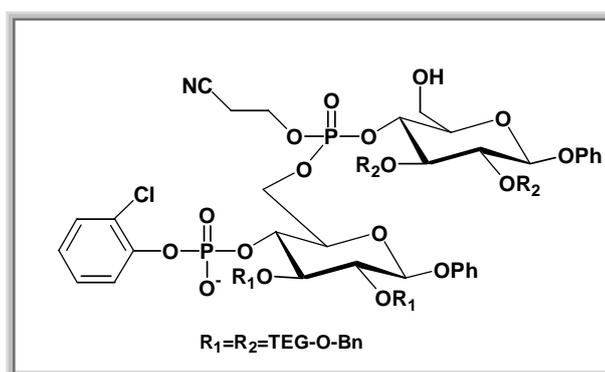
ESI-MS (ioni positivi): calc. per $C_{72}H_{95}N_2O_{17}P$, 1290.637; m/z , trovato 1292.68 ($M + H^+$), 1392.73 ($M + Et_3NH^+$).

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per $C_{72}H_{95}N_2O_{17}PNa$: 1313.6266; trovato 1313.6296 ($M+Na^+$).

SINTESI DEL DIMERO LINEARE **2b**.

I derivati **3b** (150 mg, 0.153 mmol, 1 equiv) e **4b** (237 mg, 0.184 mmol, 1.2 equiv), previamente anidrificati mediante ripetute coevaporate con CH_3CN anidro e tenuti a pressione ridotta, sono stati messi a reagire con una soluzione 0.25 M di DCI in CH_3CN anidro (5.0 mL). La reazione è stata lasciata sotto agitazione per 4 ore a 40 °C e seguita mediante TLC utilizzando come sistema eluente CH_2Cl_2/CH_3OH 94/6 (v/v). Dopo 2 ore, alla miscela di reazione è stata aggiunta una soluzione 5.5 M di *t*-BuOOH in *n*-decano (1.0 mL), lasciando il sistema sotto agitazione per 30 min. Dopo aver allontanato il solvente di reazione a pressione ridotta, la miscela è stata diluita con CH_2Cl_2 , trasferita in un imbuto separatore e lavata con acqua. La fase organica, concentrata, è stata poi purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice, impaccata con CH_2Cl_2 contenente alcune gocce di TFA. L'eluizione con CH_2Cl_2 contenente percentuali crescenti di CH_3OH (dall' 1 al 10 %) ha fornito il composto **2b** (215 mg, 0.115 mmol) con una resa del 75 %.

2b: olio, $R_f = 0.4$ [CH_2Cl_2/CH_3OH , 95:5 (v/v)].



1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ 7.33-6.92 (segnali complessi, 34H, protoni aromatici); 4.91 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1); 4.83 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1'); 4.66-4.33 [segnali sovrapposti, 18H, (H₂-6-O-P), 4x(-CH₂-O-Zucchero) e 4x(-CH₂-Ph)]; 4.24-4.15 [m, 2H, (O-CH₂-CH₂-CN)]; 4.06-3.54 [segnali sovrapposti, 62H, 12x(O-CH₂-CH₂-O TEG), 4x(CH₂-O-CH₂Ph), 2x(H-3), 2x(H-4) e (H₂-6-OH)]; 3.50-3.30 [segnali sovrapposti, 4H, 2x(H-2) e 2x(H-5)]; 2.69-2.57 [m, 2H, (O-CH₂-CH₂-CN)].

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 157.1, 156.8, 149.1, 138.1, 137.9, 137.8, 129.8, 129.6, 129.3, 128.4, 128.3, 128.2, 127.6, 127.4, 124.8, 123.4, 122.9, 122.5, 121.3, 116.7, 116.6 e 116.4 (carboni aromatici); 117.3 (CN); 101.5 (C-1 e C-1'); 84.4 e 82.7 [$4x(\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-O-CH}_2\text{-Ph)}$]; 82.1 e 81.9 (C-5 e C-5'); 75.0 e 74.7 (C-4 e C-4'); 73.1 [$4x(\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Ph)}$]; 72.7 e 72.1 (C-2 e C-2'); 72.0 e 71.9 (C-3 e C-3'); 70.8, 70.7, 70.6, 70.5, 70.4, 70.2 e 70.0 (O-CH₂-CH₂-O); 69.3 [$4x(\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-O-Zucchero)}$]; 68.8 (C-6-O-P); 62.0 (C-6-OH); 60.2 (-O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-CN}$); 19.1 (-O-CH₂- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CN}$).

^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz): δ -3.1 e -7.4.

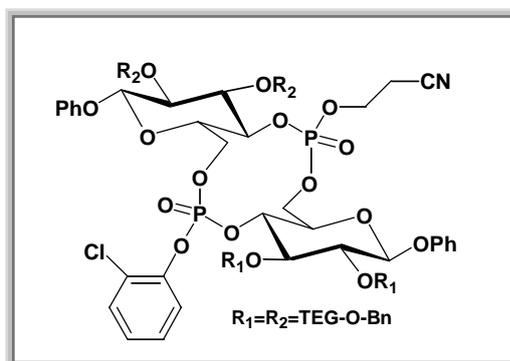
ESI-MS (ioni negativi): calc. per $\text{C}_{93}\text{H}_{126}\text{ClNO}_{33}\text{P}_2$, 1881.738; m/z , trovato 1881.35 (M - H)⁻

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per $\text{C}_{93}\text{H}_{125}\text{ClNO}_{33}\text{P}_2$: 1880.7298; trovato: 1880.7320 (M - H)⁻.

SINTESI DEL DIMERO CICLICO **1b**.

Il composto **2b** (35 mg, 0.018 mmol, 1 equiv), previamente anidrificato mediante ripetute coevaporate con piridina anidra, e l'agente condensante MSNT (160 mg, 0.54 mmol, 30 equiv) sono stati sciolti in piridina anidra (18 mL) e lasciati sotto agitazione per una notte a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata poi concentrata, ridisciolta in CH_2Cl_2 , trasferita in un imbuto separatore e lavata con acqua. La fase organica, quindi, è stata purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice eluendo con CH_2Cl_2 contenente percentuali di CH_3OH (dall' 1 al 10 %). Il derivato **9b** (25 mg, 0.013 mmol) è stato ottenuto in forma pura con una resa del 75 %.

9b: olio, $R_f = 0.4$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 95:5 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.36-6.53 (segnali complessi, 34H, protoni aromatici); 5.04 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1); 4.86 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-1'); 4.72 (m, 1H, H-4); 4.55-4.46 [segnali sovrapposti, 10H, $4x(\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Ph})$ e $2x(\text{H-6}_a)$]; 4.42 (m, 1H, H-4'); 4.39-4.35 [m, 2H, (-O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-CN}$)]; 4.33-4.24 [segnali sovrapposti, 2H, $2x(\text{H-6}_b)$]; 4.14-3.93 [segnali sovrapposti,

16H, 4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero) e 4x(CH₂-O-CH₂Ph)]; 3.90-3.75 [m, 2H, 2x(H-3)]; 3.69-3.52 [segnali sovrapposti, 49H, 12x(O-CH₂-CH₂-O) e H-2]; 3.50-3.45 [segnali sovrapposti, 3H, H-2' e 2x(H-5)]; 2.68 [t, 2H, (-O-CH₂-CH₂-CN)].

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 156.8, 145.2, 138.1, 130.6, 129.5, 128.3, 128.1, 128.1, 128.0, 127.6, 127.5, 126.0, 123.1, 122.9, 121.4, 116.8 e 116.6 (carboni aromatici); 117.0 (CN); 101.1 (C-1); 100.6 (C-1'); 82.2 e 82.0 (C-5 e C-5'); 75.4 (C-4 e C-4'); 73.1 [4x(-CH₂-Ph)]; 72.9 e 72.4 (C-2 e C-2'); 72.1 (C-3 e C-3'); 70.5 (O-CH₂-CH₂-O); 69.3 [4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 66.0 (C-6 e C-6'); 62.4 (-O-CH₂-CH₂-CN); 19.1 (-O-CH₂-CH₂-CN).

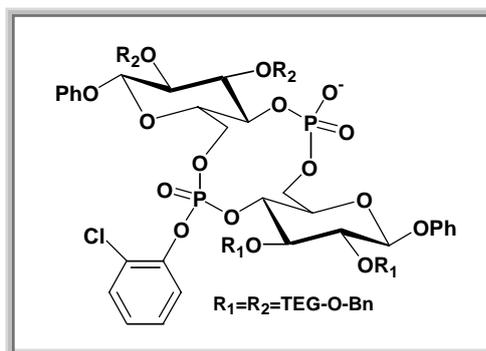
³¹P NMR (CDCl₃, 161.98 MHz): δ -4.9 e -9.5.

ESI-MS (ioni positivi): calc. per C₉₃H₁₂₄ClNO₃₂P₂, 1863.727; *m/z*, trovato 1886.04 (M + Na⁺), 1906.06 (M + K⁺).

HRMS (Maldi-TOF): *m/z*: calc. per C₉₃H₁₂₄ClNO₃₂P₂Na: 1886.7168; trovato 1886.7196 (M+Na⁺).

Il derivato **9b** (25 mg, 0.013 mmol), previamente anidrificato mediante ripetute coevaporate con piridina anidra e poi tenuto a seccare sotto vuoto, è stato trattato con Et₃N/piridina (3 mL, 1:1, v/v) e la miscela risultante è stata lasciata per una notte a 50 °C. La reazione è stata interrotta mediante rimozione del solvente a pressione ridotta ed il grezzo risultante è stato purificato mediante colonna cromatografica eluendo con CH₂Cl₂ contenente percentuali crescenti di CH₃OH (dall' 1 al 10 %). Il derivato **10b** (23 mg, 0.013 mmol) è stato ottenuto con una resa pressochè quantitativa.

10b: olio, *R_f* = 0.2 [CH₂Cl₂/CH₃OH, 95:5 (v/v)].



¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.44-6.81 (segnali complessi, 34H, protoni aromatici); 4.92 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-1); 4.81 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-1'); 4.74 (m, 1H, H-4); 4.55 [s, 8H, 4x(O-CH₂-Ph)]; 4.42 [m, 2H, 2x(H-6_a)]; 4.15 (m, 1H, H-4'); 4.08-3.90 [segnali sovrapposti, 18H, 2x(H-6_b), 4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero) e 4x(CH₂-O-CH₂Ph)]; 3.70-3.51 [segnali sovrapposti, 54H, 12x(O-CH₂-CH₂-O), 2x(H-2), 2x(H-3) e 2x(H-5)].

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 156.7, 138.1, 130.5, 129.4, 128.2, 127.6, 127.5, 126.7, 126.2, 123.2, 122.9, 122.5, 122.0, 120.2, 117.1 e 116.8 (carboni aromatici); 101.1 (C-1); 99.5 (C-1'); 82.3 e 81.9 (C-5 e C-5'); 75.9 e 75.8 (C-4 e C-4'); 73.1 [4x(O-CH₂-Ph)]; 72.7 e 72.3 (C-2 e C-2'); 72.2 e 72.0 (C-3 e C-3'); 70.5 (O-CH₂-CH₂-O); 69.3 [4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 65.4 e 64.4 (C-6 e C-6').

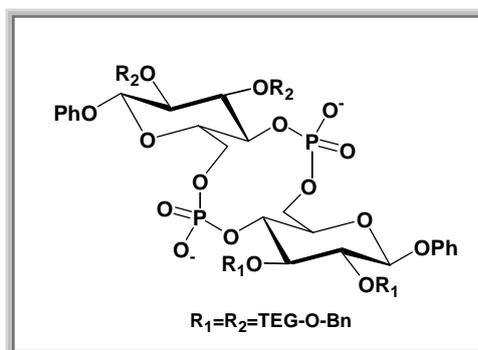
^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz): δ -2.8 e -9.8.

ESI-MS (ioni negativi): calc. per $\text{C}_{90}\text{H}_{121}\text{ClO}_{32}\text{P}_2$, 1810.700; m/z , trovato 1809.63 (M - H)⁻.

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per $\text{C}_{90}\text{H}_{120}\text{ClO}_{32}\text{P}_2$: 1809.6926; trovato: 1809.7000 (M-H)⁻.

Il derivato **10b** (23 mg, 0.013 mmol), sciolto in diossano (200 μL), è stato trattato con una soluzione acquosa satura di LiOH (1 mL) per una notte a 50 °C. Quindi, la miscela di reazione è stata concentrata, ridisciolta in CH_2Cl_2 , trasferita in un imbuto separatore e lavata con una soluzione acquosa satura di NH_4Cl . La fase organica è stata concentrata e purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice. L'eluizione con CH_2Cl_2 contenente percentuali crescenti di CH_3OH (fino al 15 %) ha fornito il dimero ciclico **1b** (22 mg, 0.013 mmol) con una resa quantitativa.

1b: olio, $R_f = 0.5$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.36-7.00 (segnali complessi, 30H, protoni aromatici); 4.81 (segnale slargato, 2H, H-1 e H-1'); 4.55-4.49 [segnali complessi, 8H, 4x(CH₂-Ph)]; 4.25-3.83 [segnali sovrapposti, 14H, 2x(H₂-6), 2x(H-4) e 4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 3.72-3.46 [segnali sovrapposti, 62H, 4x(CH₂-O-CH₂Ph), 12x(O-CH₂-CH₂-O), 2x(H-2), 2x(H-3) e 2x(H-5)].

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 156.8, 138.1, 130.4, 129.4, 128.2, 127.6, 127.5, 126.7, 126.2, 123.2, 122.9, 122.5, 122.0, 120.2, 117.1 e 116.7 (carboni aromatici); 101.2 (C-1 e C-1'); 82.3 (C-5 e C-5'); 75.8 (C-4 e C-4'); 73.1 [4x(O-CH₂-Ph)]; 72.7 (C-2 e C-2'); 72.2 (C-3 e C-3'); 70.4 (O-CH₂-CH₂-O); 69.3 [4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 59.4 (C-6 e C-6').

^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz, 9 mM): segnale slargato, centrato a δ -2.8.

^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz, 1.7 mM): segnanle *sharp* a δ -2.7.

ESI-MS (ioni negativi): calc. per $C_{84}H_{116}O_{32}P_2$, 1698.692; m/z , trovato 1698.01 ($M - H$)⁻; 849.62 ($M-2H$)²⁻.

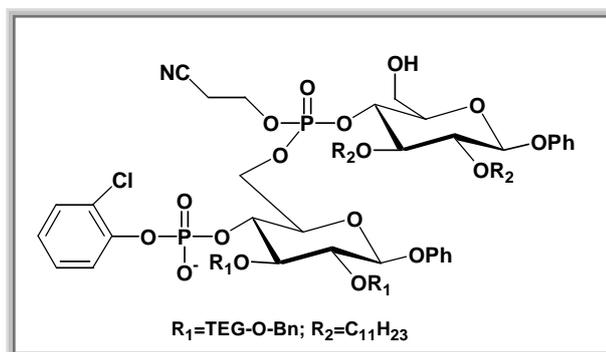
HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per $C_{84}H_{115}O_{32}P_2$: 1697.6847; trovato: 1697.6891 ($M-H$)⁻.

SINTESI DI 1c

SINTESI DEL DIMERO LINEARE 2c.

I derivati **3b** (150 mg, 0.153 mmol, 1 equiv) e **4a** (265 mg, 0.184 mmol, 1.2 equiv), previamente anidrificati mediante ripetute coevaporate con CH_3CN anidro e tenuti sotto pressione ridotta, sono stati fatti reagire con una soluzione 0.25 M di DCI in CH_3CN anidro (5.0 mL). La reazione è stata lasciata sotto agitazione per 4 ore a 40 °C e seguita mediante TLC utilizzando come sistema eluente CH_2Cl_2/CH_3OH 96/4 (v/v). Dopo 2 ore, alla miscela di reazione è stata aggiunta una soluzione 5.5 M di *t*-BuOOH in *n*-decano (1.0 mL), lasciando il sistema sotto agitazione per 30 min. Dopo aver allontanato il solvente di reazione a pressione ridotta, la miscela è stata diluita con CH_2Cl_2 , trasferita in un imbuto separatore e lavata con acqua. La fase organica, concentrata, è stata poi purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice impaccata con CH_2Cl_2 contenente alcune gocce di TFA. L'eluizione con CH_2Cl_2 contenente percentuali crescenti di CH_3OH (dall' 1 al 10 %) ha fornito il composto **2c** (190 mg, 0.115 mmol) in forma pura con una resa del 75 %.

2c: olio, $R_f = 0.4$ [CH_2Cl_2/CH_3OH , 96/4 (v/v)].



¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.32-6.92 (segnali complessi, 24H, protoni aromatici); 4.95-4.75 [segnali sovrapposti, 3H, 2x(H-1) e H-4]; 4.55-3.14 [segnali sovrapposti, 53H, 2x(H₂-6), (O-CH₂-CH₂-CN), 4x(-CH₂-O-Zucchero), 2x(-CH₂-Ph), 2x(H-3), H-4', 6x(O-CH₂-CH₂-O), 2x(CH₂-O-CH₂Ph), 2x(H-2) e 2x(H-5)]; 2.55-2.40 [segnali slargati, 2H, (O-CH₂-CH₂-CN)];

1.58 [m, 4H, 2x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 1.37-1.07 [segnali sovrapposti, 32H, 2x(-CH₂-)₈]; 0.88 [t, 6H, 2x(CH₃)].

¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 157.2, 156.8, 149.3, 138.2, 137.7, 131.1, 129.5, 129.3, 129.2, 129.0, 128.6, 128.3, 128.2, 128.0, 127.7, 127.6, 127.4, 124.8, 123.8, 123.4, 123.2, 122.7, 122.4, 121.7, 121.5, 116.6 e 116.3 (carboni aromatici); 117.8 (CN); 101.9 e 101.7 (C-1 e C-1'); 84.7 e 84.3 [4x(CH₂-O-CH₂-Ph)]; 82.2 e 81.6 (C-5 e C-5'); 73.9 e 73.5 (C-4 e C-4'); 73.0 [2x(-CH₂-Ph)]; 72.7 e 72.4 (C-2 e C-2'); 71.9 (C-3 e C-3'); 70.4, 70.3 e 70.2 (O-CH₂-CH₂-O); 69.3 [4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 66.7 e 66.0 (C-6-O-P); 63.9 e 63.0 (C-6-OH); 61.9 e 61.4 (-O-CH₂-CH₂-CN); 31.8, 30.2, 29.5 e 29.2 [2x(-CH₂-)₈]; 22.5 [2x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 19.0 (-O-CH₂-CH₂-CN); 13.9 [4x(CH₃)].

³¹P NMR (CDCl₃, 161.98 MHz): δ -1.1 e -6.9.

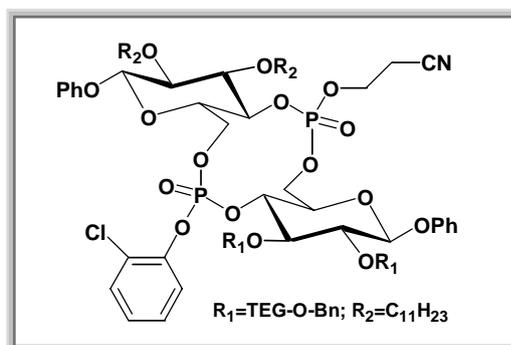
ESI-MS (ioni negativi): calc. per C₈₅H₁₂₆ClNO₂₅P₂, 1658.786; *m/z*, trovato 1657.88 (M - H)⁻

HRMS (Maldi-TOF): *m/z*: calc. per C₈₅H₁₂₅ClNO₂₅P₂: 1657.7783; trovato: 1657.7811 (M - H)⁻.

SINTESI DEL DIMERO CICLICO **9c**.

Il derivato **2c** (35 mg, 0.021 mmol, 1 equiv), anidrificato mediante ripetute coevaporate con piridina anidra, 4-dimetilamminopiridina (DMAP) (2.6 mg, 0.021 mmol, 1 equiv) e MSNT (190 mg, 0.63 mmol, 30 equiv) sono stati sciolti in piridina anidra (20 mL) e lasciati sotto agitazione per una notte a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata, poi, concentrata, ridisciolta in CH₂Cl₂, trasferita in un imbuto separatore e lavata con acqua. La fase organica è stata, quindi, purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice, utilizzando come sistema eluente CH₂Cl₂ contenente percentuali crescenti di CH₃OH (fino al 10 %), fornendo il composto **12c** (26 mg, 0.016 mmol) con una resa del 75 %.

9c: olio, *R_f* = 0.4 [CH₂Cl₂/CH₃OH, 95:5 (v/v)].



¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.33-6.95 (segnali complessi, 24H, protoni aromatici); 5.01-4.86 [segnali sovrapposti, 2H, 2x(H-1)]; 4.68 (m, 1H, H-4); 4.56-4.49 [segnali sovrapposti, 6H, 2x(-CH₂-Ph) e 2x(H-6_a)]; 4.42 (m, 1H, H-4'); 4.35-4.14 [segnali sovrapposti, 4H, (-O-CH₂-CH₂-CN) e 2x(H-6_b)]; 4.09-3.70 [segnali sovrapposti, 14H, 2x(H-3), 4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero) e 2x(CH₂-O-CH₂Ph)]; 3.70-3.54 [segnali sovrapposti, 24H, 6x(O-CH₂-CH₂-O)]; 3.53-3.35 [segnali sovrapposti, 4H, 2x(H-2) e 2x(H-5)]; 2.67 [t, 2H, (-O-CH₂-CH₂-CN)]; 1.65-1.54 [m, 4H, 2x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 1.42-1.17 [segnali sovrapposti, 32H, 2x(-CH₂-)₈]; 0.89 [t, 6H, 2x(CH₃)].

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 156.9, 153.5, 146.4, 145.9, 143.9, 141.6, 138.1, 132.8, 132.5, 132.2, 130.6, 129.6, 129.5, 128.2, 128.0, 127.8, 127.6, 126.0, 123.1, 121.4, 117.0 e 116.9 (carboni aromatici); 116.2 (CN); 101.9 (C-1); 101.4 (C-1'); 82.2 e 81.9 [2x(CH₂-O-CH₂-Ph)]; 81.6 e 81.3 (C-5 e C-5'); 75.3 (C-4 e C-4'); 73.9 e 73.6 (C-2 e C-2'); 73.1 [2x(-CH₂-Ph)]; 72.3 e 72.1 (C-3 e C-3'); 70.5 (O-CH₂-CH₂-O); 69.3 [4x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 68.1 e 66.7 (C-6 e C-6'); 61.9 (-O-CH₂-CH₂-CN); 31.8, 30.1, 29.5 e 29.2 [2x(-CH₂-)₈]; 22.5 [2x(CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 18.4 (-O-CH₂-CH₂-CN); 14.0 [4x(CH₃)].

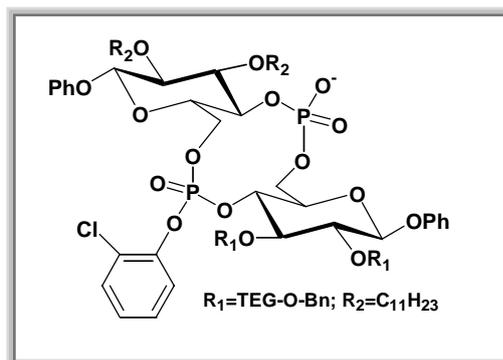
³¹P NMR (CDCl₃, 161.98 MHz): δ -2.1, -4.8, -7.4 e -10.5.

ESI-MS (ioni positivi): calc. per C₈₅H₁₂₄ClNO₂₄P₂, 1639.768; *m/z*, trovato 1663.80 (M + Na⁺), 1680.74 (M + K⁺).

HRMS (Maldi-TOF): *m/z*: calc. per C₈₅H₁₂₄ClNO₂₄P₂Na: 1662.7575; trovato 1662.7610 (M + Na⁺).

Il composto **9c** (25 mg, 0.015 mmol), coevaporato con piridina anidra e tenuto a seccare sotto vuoto, è stato trattato con una soluzione di piperidina/DMF (3 mL, 1:5, v/v) e la miscela risultante è stata lasciata per una notte sotto agitazione a 70 °C. La reazione è stata interrotta rimuovendo il solvente sotto vuoto e il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice, eluendo con CH₂Cl₂ contenente percentuali crescenti di CH₃OH (fino al 10 %). Il composto **10c** (23 mg, 0.014 mmol) è stato ottenuto in forma pura con una resa del 96 %.

10c: olio, *R_f* = 0.2 [CH₂Cl₂/CH₃OH, 95:5 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.32-6.80 (segnali complessi, 24H, protoni aromatici); 4.92-4.67 [segnale slargato, 3H, 2x(H-1) e H-4]; 4.53 [s, 4H, 2x(O- $\underline{\text{CH}}_2$ -Ph)]; 4.43 [m, 2H, 2x(H-6_a)]; 4.23-3.90 [segnali sovrapposti, 19H, 2x(H-6_b), H-4', 4x(CH_2 - $\underline{\text{CH}}_2$ -O-Zucchero) e 4x($\underline{\text{CH}}_2$ -O- CH_2 Ph)]; 3.70-3.44 [segnali sovrapposti, 54H, 12x(O- CH_2 - CH_2 -O), 2x(H-2), 2x(H-3) e 2x(H-5)]; 1.65-1.48 [segnale slargato, 4H, 2x($\underline{\text{CH}}_2$ - CH_2 -O-Zucchero)]; 1.40-1.16 [segnali sovrapposti, 32H, 2x(- $\underline{\text{CH}}_2$ -)]; 0.87 [t, 6H, 2x(CH_3)].

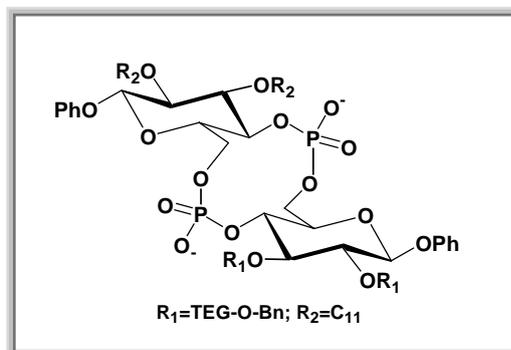
^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz): δ -2.1 e -10.0.

ESI-MS (ioni negativi): calc. per $\text{C}_{82}\text{H}_{121}\text{ClO}_{24}\text{P}_2$, 1586.741; m/z , trovato 1585.63 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per $\text{C}_{82}\text{H}_{120}\text{ClO}_{24}\text{P}_2$: 1585.7333; trovato: 1585.7379 (M-H) $^-$.

Il derivato **10c** (23 mg, 0.014 mmol), sciolto in diossano (200 μL), è stato fatto reagire con 1 mL di una soluzione acquosa satura di LiOH e la miscela risultante è stata lasciata sotto agitazione per una notte a 50 °C. Successivamente, la miscela di reazione è stata concentrata, ridisciolta in CH_2Cl_2 , e lavata con una soluzione satura di NH_4Cl . La fase organica è stata purificata mediante colonna cromatografica, utilizzando come sistema eluente CH_2Cl_2 contenente percentuali crescenti di CH_3OH (fino al 15 %), fornendo il dimero ciclico **1c** (22 mg, 0.013 mmol) con una resa del 93 %.

1c: olio, $R_f = 0.5$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.39-6.80 (segnali complessi, 20H, protoni aromatici); 4.98-4.62 [segnale slargato, 3H, 2x(H-1) e H-4]; 4.54 e 4.53 [due s, 2H ognuno, 2x(O- CH_2 -Ph)]; 4.43 [m, 2H, 2x(H-6_a)]; 4.30-3.75 [segnali sovrapposti, 11H, 2x(H-6_b), H-4' e 4x(CH_2 - CH_2 -O-Zucchero)]; 3.72-3.30 [segnali sovrapposti, 34H, 7x(O- CH_2 - CH_2 -O), 2x(H-2), 2x(H-3) e 2x(H-5)]; 1.69-1.55 [segnale slargato, 4H, 2x(CH_2 - CH_2 -O-Zucchero)]; 1.40-1.08 [segnali sovrapposti, 32H, 2x(- CH_2 -)₈]; 0.88 [t, 6H, 2x(CH_3)].

^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz, 298 K, 10 mM): è presente un segnale slargato tra δ 0.7 e -7.1.

^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz, 298 K, 100 μM): segnale *sharp* a δ 1.6.

MALDI-TDI (ioni negativi): calc. per $\text{C}_{76}\text{H}_{116}\text{O}_{24}\text{P}_2$, 1474.733; m/z , trovato 1472.86 ($\text{M} - \text{H}$)⁻.

HRMS (Maldi-TOF): m/z : calc. per $\text{C}_{76}\text{H}_{115}\text{O}_{24}\text{P}_2$: 1473.7253; trovato: 1473.7303 ($\text{M} - \text{H}$)⁻.

CAPITOLO II

UN *BUILDING BLOCK* VERSATILE PER LA PREPARAZIONE DI OLIGOSACCARIDI CICLICI ANFIFILICI FUNZIONALIZZATI

1.0 PROGETTAZIONE

Nel Capitolo I è stata descritta la sintesi e la caratterizzazione di tre nuovi macrocicli anfifilici che hanno mostrato ottime capacità di auto-aggregazione e buona attività ionofora. Con l'obiettivo di preparare una libreria più ampia di composti anfifilici analoghi a quelli già presentati, ma marcati con gruppi utili per un più approfondito studio sull'attività biologica ed il relativo meccanismo di azione, è stata messa a punto la sintesi di un intermedio glucosidico versatile, suscettibile di derivatizzazioni con residui R di natura anche molto diversa fra loro. Tale intermedio versatile, una volta effettuata la derivatizzazione desiderata, può essere poi utilizzato nello schema sintetico già ampiamente ottimizzato per l'ottenimento dei derivati **1a-c** per favorire macrocicli marcati con le proprietà chimico-fisiche desiderate (*Figura 1*).

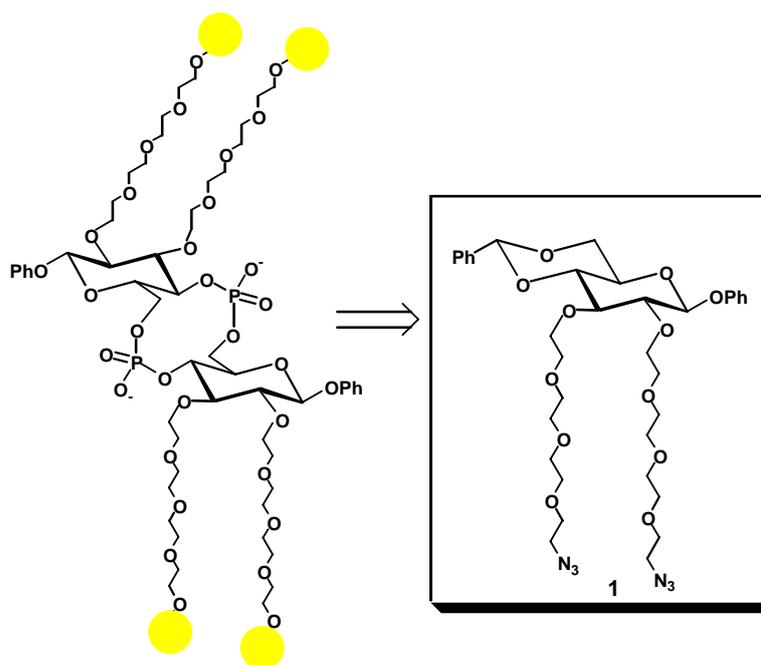
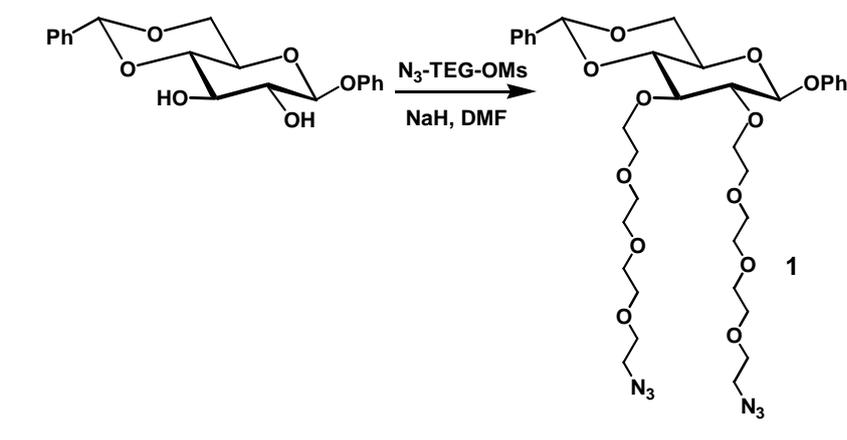


Figura 1 – *Intermedio glucosidico versatile*

In questo contesto, è stata progettata la sintesi del *building block* **1**, definito intermedio versatile. Tale molecola può essere ottenuta a partire dal fenil-β-D-glucopiranoside protetto in posizione 4 e 6 mediante una classica reazione di *Williamson* con un derivato del tetraetilenglicole-azido (*Schema 1*).



Schema 1 – Sintesi dell'intermedio versatile

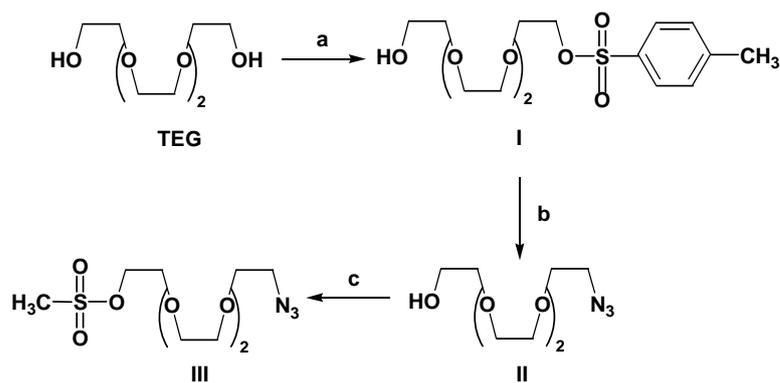
L'uso di tale *building block* si presta ad uno schema sintetico generale, consentendo la preparazione di macrocicli con tentacoli variamente funzionalizzati alle estremità e quindi intrinsecamente dotati di un più ampio grado di diversità molecolare.

Questo monomero, progettato *ad hoc*, reca alle estremità delle due catene di tetraetilenglicole dei gruppi azido che, da un punto di vista sintetico, si comportano da gruppi amminici mascherati. Molto stabili chimicamente ad una cospicua serie di manipolazioni chimiche, le azidi sono ridotte facilmente ad ammine primarie, gruppi funzionali utili per la condensazione con un'ampia varietà di molecole diverse derivatizzate sotto forma di acidi carbossilici, acidi solfonici attivati, ecc., dando origine a differenti funzionalizzazioni. In questo modo, i glucosidi funzionalizzati possono essere utilizzati come *building block* per la costruzione di recettori a struttura glucosidica con peculiari proprietà, utili per processi di riconoscimento molecolare.

1.1 SINTESI DELL'INTERMEDIO VERSATILE

La sintesi dell'intermedio versatile **1** richiede, innanzitutto, una elaborazione sintetica della catena di tetraetilenglicole (TEG), un linker bifunzionale flessibile, largamente utilizzato per l'ancoraggio di specifici *probe* o *marker* alle biomolecole³⁵.

La sintesi della catena di TEG, funzionalizzata con un gruppo azido ad una estremità ed attivata sotto forma di solfonato all'altra estremità, ha previsto, così come mostrato nello *Schema 2*, una prima reazione di monoderivatizzazione effettuata con tosilcloruro (TsCl, 1.2 eq) e ossido d'argento (1.1 eq) in CH₂Cl₂ per 48 ore,³⁶ che ha portato al prodotto monotosilato desiderato **I** con una resa dell'80%. In tutti i casi, sono state riscontrate solo quantità assolutamente trascurabili di TEG ditosilato, prodotto secondario della reazione che, viceversa, seguendo altre procedure sperimentate in precedenza, risultava essere in tutti i casi la specie predominante. La quasi totale assenza di prodotti secondari ha facilitato notevolmente la purificazione su colonna del derivato desiderato che è stato, quindi, sottoposto a reazione di azidazione utilizzando un eccesso di sodio azide (2 eq) in EtOH a ricadere per 8 ore³⁷. In queste condizioni la miscela di reazione non ha fatto osservare la formazione di prodotti secondari e, con una semplice estrazione liquido-liquido, è stato possibile recuperare il derivato **II** con una resa pressoché quantitativa ed elevato grado di purezza.



- a. TsCl, Ag₂O, CH₂Cl₂, 48 h, t.a., (80%)
 b. NaN₃, EtOH, 12 h, a ricadere, (quant.)
 c. MsCl, DIPEA, CH₂Cl₂, 12 h, t.a., (92%)

Schema 2 – Sintesi del derivato TEG-azido attivato

³⁵ Per un recente esempio si veda Wang, W.; Li, A.D.Q. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1036-1052.

³⁶ Svedhem, S.; Hollander, C. A.; Shi, J.; Konradsson, P.; Svensson, S. C. T. *J. Org. Chem.* **2001**, *39*, 2750.

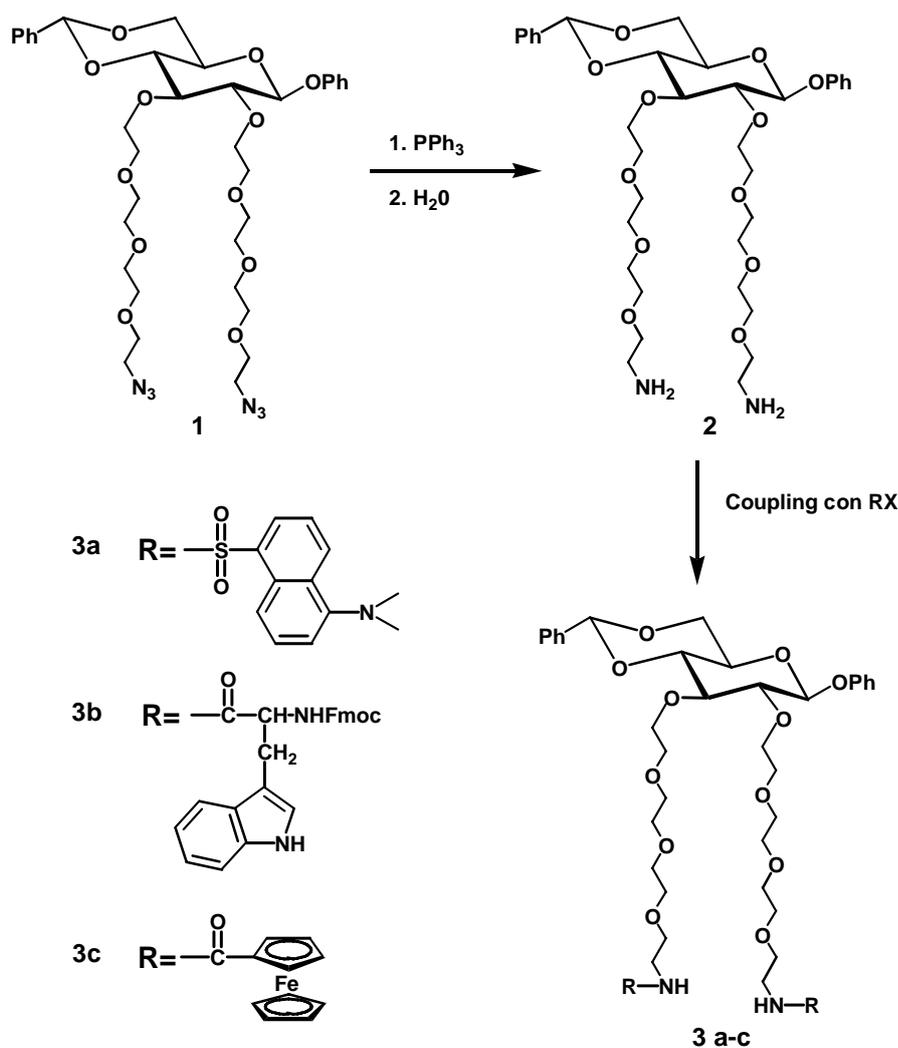
³⁷ Reese, C.; B.; Song, Q. *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *27*, No. 13, 2672-2681.

La successiva reazione con mesil cloruro (1.2 eq) e DIPEA in CH_2Cl_2 ha portato alla sintesi del derivato **III**, isolato dopo cromatografia su colonna con resa del 82%.

Una volta ottenuto, il derivato **III** è stato utilizzato come agente alchilante nella reazione di accoppiamento con il 4,6-benzilidene fenil- β -D-glucopiranoside condotta in DMF in presenza di NaH, che ha portato alla formazione del derivato **1** con una resa del 90% (*Schema 1*).

Per dimostrare l'utilità dell'intermedio chiave **1** nell'ambito di una strategia sintetica più generale, il derivato **1** è stato funzionalizzato con diversi marcanti, seguendo classiche reazioni di *Staudinger*.

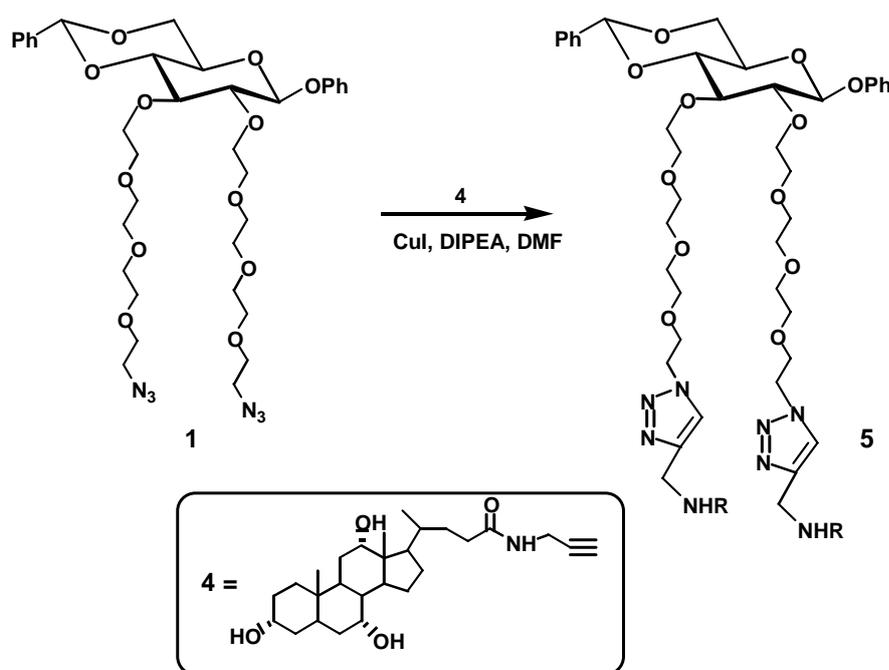
In particolare, il derivato **1** è stato fatto condensare, rispettivamente con un *marker* fluorescente, il gruppo dansile [cloruro di 5-dimetilamminonaftalen-1-solfonile], un amminoacido aromatico, il triptofano N-*Fmoc*-protetto, e un *probe* elettrochimico, l'acido carbossilico del ferrocene (*Schema 3*).



Schema 3 – Accoppiamento dell'intermedio versatile con vari marcanti

Il derivato **1** è stato trattato prima con trifenilfosfina (PPh_3) in acqua in modo da ridurre i gruppi azido a gruppi amminici primari (derivato **2**) e, successivamente, è stato fatto reagire con il *marker* prescelto in CH_2Cl_2 a temperatura ambiente. Nel caso dell'accoppiamento con il dansilcloruro non è stato necessario utilizzare agenti condensanti; nel caso, invece, della sintesi dei derivati **3b** e **3c**, è stata utilizzata DCC per l'attivazione degli acidi carbossilici. Le reazioni, monitorate per TLC e interrotte dopo la scomparsa dei prodotti monoderivatizzati, hanno portato, in tutti i casi, alla formazione dei composti desiderati con rese dell'80-85% (Schema 3).

Il derivato **1** è stato anche utilizzato in reazioni di accoppiamento con alchini terminali, sfruttando una cicloadizione 1,3-dipolare mediata da sali di Cu(I) secondo un approccio sintetico studiato per la prima volta da Huisgen e recentemente definito “*click chemistry*”³⁸ (Schema 4).



Schema 4 – Reazione di *click chemistry* sull'intermedio versatile **1**

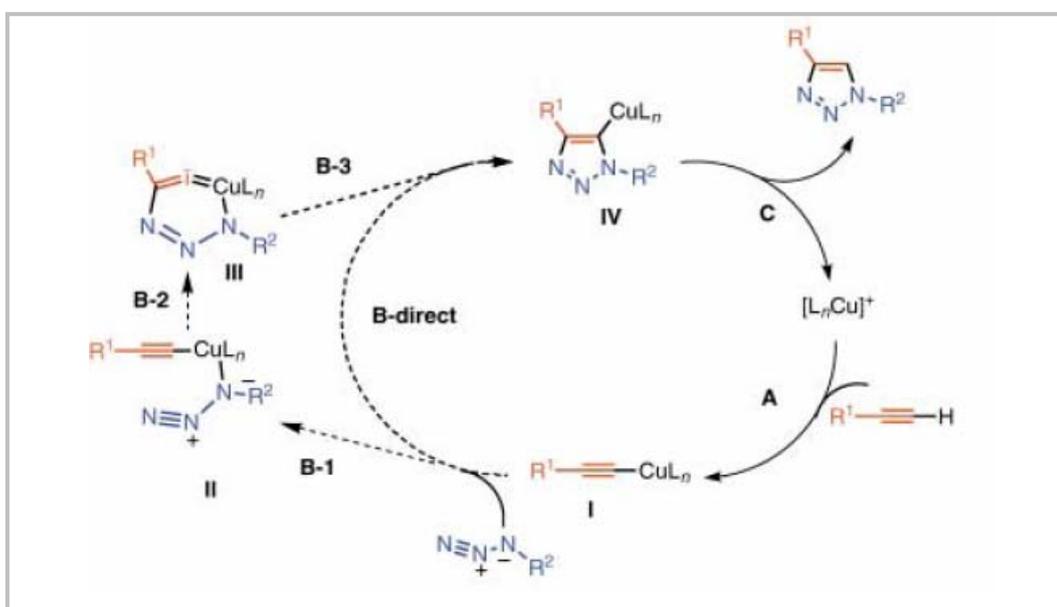
La reazione di “*click chemistry*” è stata condotta facendo condensare il derivato **1** con l'alchino terminale **4**, preparato in precedenza mediante reazione della propargilammina con acido colico in CH_2Cl_2 utilizzando DCC come agente condensante. Per questa derivatizzazione è stato scelto come *marker* l'acido colico, idrofobico, utile per

³⁸ a) Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004-2021. b) Bock, V.D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J.H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51-68.

l'adsorbimento di biomolecole su superfici idrofobiche³⁹, per lo sviluppo di nuovi sistemi per il trasporto di farmaci⁴⁰, o come chemosensore per il riconoscimento di ioni⁴¹.

Sono state eseguite numerose prove per ottimizzare questa reazione di coupling e nessun caso, in cui sia stato utilizzato CuI o CuSO₄/ascorbato in quantità catalitica³⁷ per l'attivazione del sistema (Schema 5), al variare del solvente e della temperatura, ha fornito risultati soddisfacenti.

Buone rese sono state ottenute solo introducendo CuI in quantità stechiometrica, in presenza di DIPEA e utilizzando DMF come solvente di reazione.



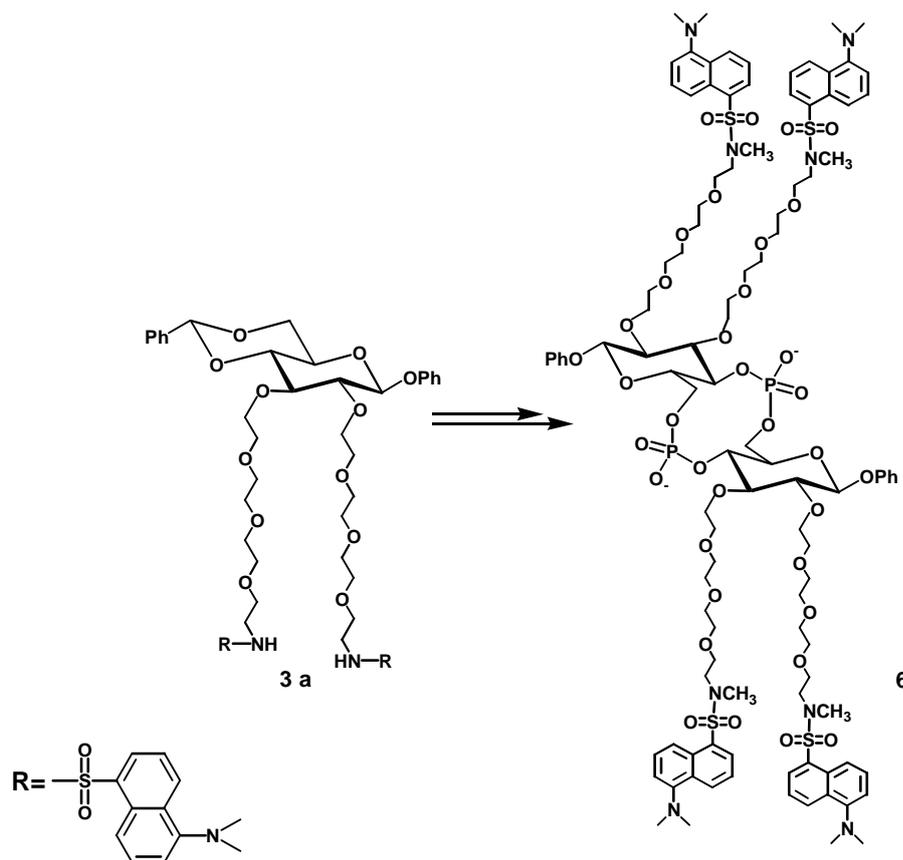
Schema 5 – Meccanismo di una reazione di “click chemistry” catalizzata da Cu(I)

Una volta provata la bontà dell'intermedio versatile **1** a fornire un'ampia varietà di molecole derivatizzate con utili *probe*, gli sforzi sintetici sono stati indirizzati verso la sintesi del dimero ciclico anfifilico **6** (Schema 6) recante, alle estremità delle catene di tetraetilenglicole, i gruppi fluorescenti dansile.

³⁹ Erkan, Y.; Czolkos, I.; Jesorka, A.; Wilhelmsson, M.; Orwar, O. *Langmuir* **2007**, *23*(10), 5259-5263.

⁴⁰ Wu, X.; Wu, Y.; Hai, L.; Bao, Y. *Letters in Organic Chemistry* **2006**, *3*(12), 911-914.

⁴¹ Wang, H.; Chan, W.H. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 8825-8830.



Schema 6 – Sintesi del dimero ciclico anfifilico tetradansilato

1.1.1 USO DI MARCANTI FLUORESCENTI PER STUDI DI ATTIVITÀ IONOFORA

La spettrofluorimetria è una tecnica spettroscopica che permette applicazioni utili, importanti in svariati settori scientifici. Si basa sul principio di eccitare la molecola di interesse attraverso l'utilizzo di una sorgente monocromatica; successivamente, la molecola eccitata perde energia radiativamente mantenendo lo stesso stato di *spin*, secondo un processo noto come fluorescenza.

Il principale vantaggio dell'utilizzo della fluorescenza rispetto a misure di assorbimento è dato dalla maggiore sensibilità del metodo, che consente una più facile rivelazione.

L'utilizzo di *probe* fluorescenti inseriti in molecole (naturali o sintetiche) di interesse biologico permette di:

- eseguire analisi qualitative e quantitative;
- effettuare misure di concentrazione per soluzioni anche molto diluite;
- determinare e seguire la variazione di alcune proprietà chimico-fisiche della molecola in esame;

- effettuare studi conformazionali su sistemi complessi;
- studiare sistemi aggregati a basse concentrazioni;
- monitorare l'inserimento e tracciare la localizzazione di molecole di sintesi all'interno di sistemi biologici.

Un fluoroforo è, generalmente, una molecola organica dotata di un sistema di elettroni delocalizzati, come ad esempio sistemi coniugati, ciclici o eterociclici, capaci di assorbire nell'UV e di emettere una radiazione di fluorescenza caratteristica. L'intorno chimico e l'efficienza di solvatazione influenzano in maniera significativa l'emissione di fluorescenza e il coefficiente di estinzione molare.

La marcatura di siti specifici con molecole fluorescenti ha permesso di studiare in dettaglio numerosi processi molecolari di interesse in chimica, in diagnostica medica e in biologia molecolare. Significativo è l'esempio della fluoresceina e dei suoi analoghi, utilizzati diffusamente in campo immuno-istochimico e come traccianti efficienti e selettivi.

Fluorofori naturali, ad esempio, sono amminoacidi proteoinogenici quali il triptofano, la tirosina e la fenilalanina, che presentano, alle stesse condizioni di assorbimento, un'intensità di fluorescenza differente. Questa caratteristica consente uno studio qualitativo in composizione amminoacidica delle proteine e permette anche di ricavare notevoli informazioni strutturali. Nel caso specifico di studi su ionofori artificiali, l'utilizzo di un marcatore fluorescente consente di capire se lo ionoforo sia in grado di attraversare il doppio strato lipidico e permette di identificare il tipo di inserimento, ancoraggio o disposizione di queste molecole di sintesi in membrane biologiche, oppure in liposomi.

Tipico *probe* fluorescente è il dansile, che può essere facilmente introdotto in molecole di interesse biologico sfruttando un suo derivato attivato, il cloruro di dansile [cloruro di 5-dimetilamminonaftalen-1-solfonile], disponibile in commercio. Il cloruro di dansile, a temperatura ambiente, si presenta come un solido giallo e reagisce velocemente con ammine primarie, formando stabili legami solfonamidici.

La lunghezza d'onda di eccitazione del gruppo dansile è 370 nm e l'emissione si registra in un intervallo di λ tra i 450 e 550 nm in funzione dell'ambiente in cui è disperso. Il dansile è un *probe* fluorescente molto sensibile all'intorno circostante, mostra una buona intensità di fluorescenza in un sistema idrofobico che tende a diminuire all'aumentare della polarità del mezzo. In letteratura sono descritti diversi esempi di polieteri, calixareni e ciclodestrine recanti un braccio flessibile al quale è legato il *probe* fluorescente dansile.

In un lavoro recente è stata descritta una β -ciclodestrina marcata con dansile tramite un ponte di L-lisina⁴²; in questo sistema è stato osservato che l'intensità di fluorescenza è massima quando il dansile è accomodato nella cavità idrofobica della ciclodestrina e diminuisce progressivamente all'aumentare della concentrazione di 1-adamantano, molecola "guest" aggiunta al sistema, che sposta il dansile in soluzione acquosa (Figura 2).

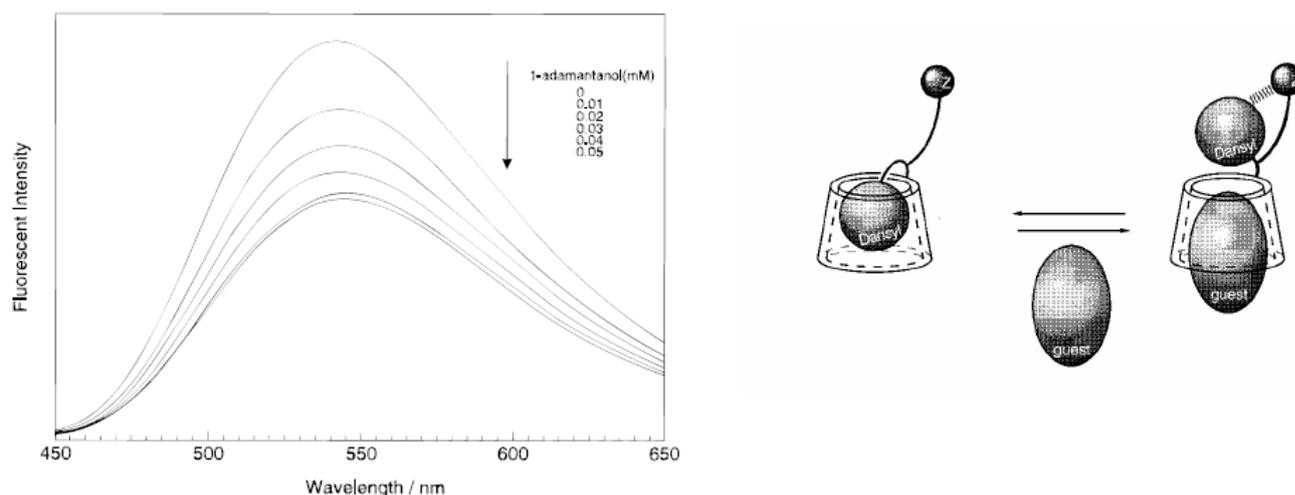


Figura 2 – Esperimento di fluorescenza su una CD funzionalizzata con il gruppo dansile

La variazione di fluorescenza "guest"-dipendente può essere utilizzata come chemosensore per rilevare la presenza di metalli alcalini in soluzioni acquose; in particolare, è stato osservato³¹ che la diminuzione dell'intensità di fluorescenza è più spiccata per il Na^+ , rispetto al K^+ , Li^+ e Cs^+ .

L'introduzione di un *probe* fluorescente su uno ionoforo sintetico permette di studiare il trasporto di ioni attraverso la membrana ed il loro stato di aggregazione. Spesso vengono utilizzate membrane artificiali come sistemi modello per ottenere informazioni dettagliate sulla composizione e organizzazione molecolare di membrane naturali.

Uno studio molto approfondito sugli ionofori sintetici è stato condotto negli ultimi dieci anni dal gruppo di Gokel⁴³ che, nella progettazione di nuove molecole attive, ha identificato come strutture base macrocicli più flessibili delle ciclodestrine, quali gli eteri corona. Questi lavori hanno portato alla sintesi di ionofori basati sul macrociclo diaza-[18]-crown-[6] (Figura 3).

⁴² Ueno, A.; Ikeda, A.; Ikeda, I.; Toda, F. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 382-387.

⁴³ a) Murillo, O.; Watanabe, S.; Nakano, A.; Gokel, G.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7665-7679. b) Gokel, G.W. *Chem. Commun.* **2000**, *1*, c) Gokel, G.W.; Murillo, O. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 425-432.

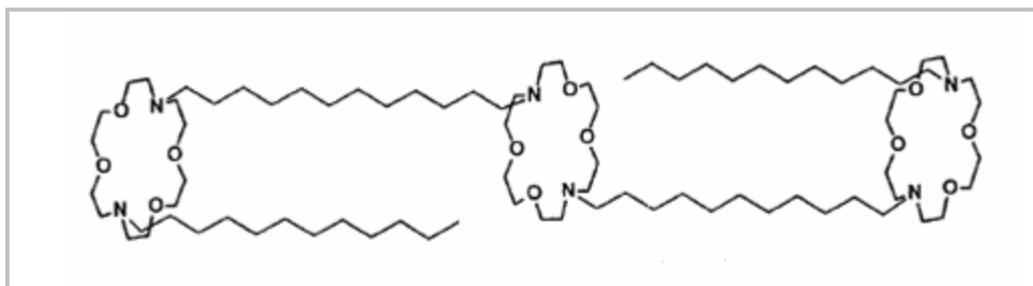


Figura 3 – Ionoforo sintetico realizzato da G.W. Gokel

La più attiva fra le molecole sintetizzate presenta tre anelli di diaza-[18]-crown-[6] connessi da catene alchiliche a dodici atomi di carbonio, che conferiscono al composto una lunghezza di 25-30 Å, tale da rivestire l'intero spessore del doppio strato lipidico delle membrane. Questa struttura è un buon trasportatore di cationi ed, in particolare, rilascia il sodio più velocemente del potassio.

L'attività ionofora in membrana ed il meccanismo di azione di questa classe di molecole sono state studiate mediante spettroscopia di fluorescenza marcando le due unità di diaza-[18]-crown-[6] esterne con un residuo di dansile⁴⁴ (Figura 4).

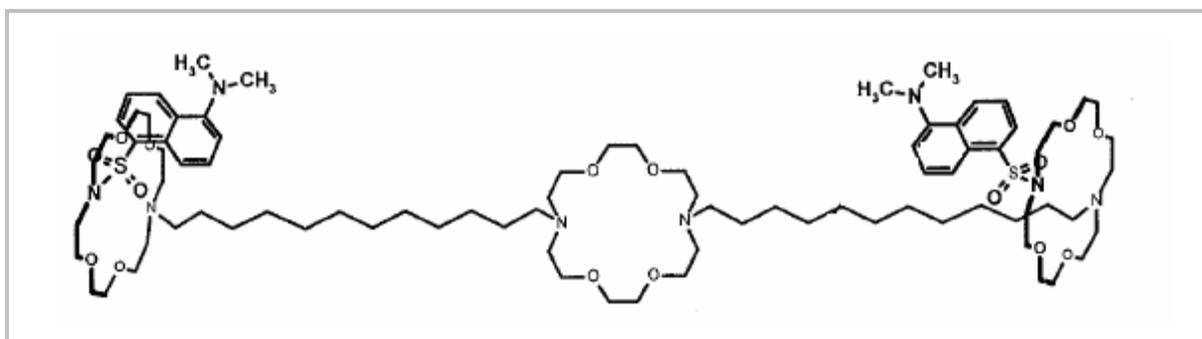


Figura 4 – Ionoforo marcato con gruppi dansili sintetizzato nel gruppo di G.W. Gokel

I dati ottenuti sul derivato marcato con il dansile hanno confermato che esso si inserisce all'interno del doppio strato lipidico ed è attivo secondo una cinetica del primo ordine, indicativo di un meccanismo di trasporto unimolecolare. Lo ionoforo dansilato, sciolto in un solvente con polarità (E_T) di 35-60 D, valori di polarità tipici degli alcoli, presenta un massimo di fluorescenza nell'intervallo compreso tra 500 e 525 nm.

⁴⁴ Gokel, G.W.; Ferdani, R.; Liu, J.; Pajewski, R.; Shabany, H.; Utrecht, P. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 33-39.

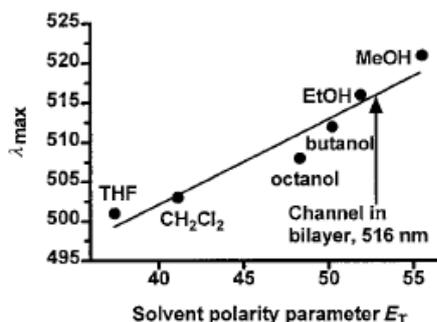


Figura 5 – Dipendenza del massimo di emissione di fluorescenza del gruppo dansile al variare della polarità del solvente

Quando lo ionoforo dansilato è stato inserito in una membrana artificiale, è stata osservata emissione a 516 nm, confermando che i gruppi fluorescenti sono presenti in membrana nella regione a polarità intermedia.

Questi risultati hanno dimostrato che lo ionoforo in questione funge da canale ionico e non da *carrier* mobile ed è capace di strutturarsi stabilmente all'interno del doppio strato lipidico (*Figura 6*) in una conformazione estesa che vede i due macrocicli dansilati presenti nella regione polare esposta all'acqua e quello centrale posto nella regione idrofobica interna come “*relay*” a ponte per il trasporto di specie cariche.

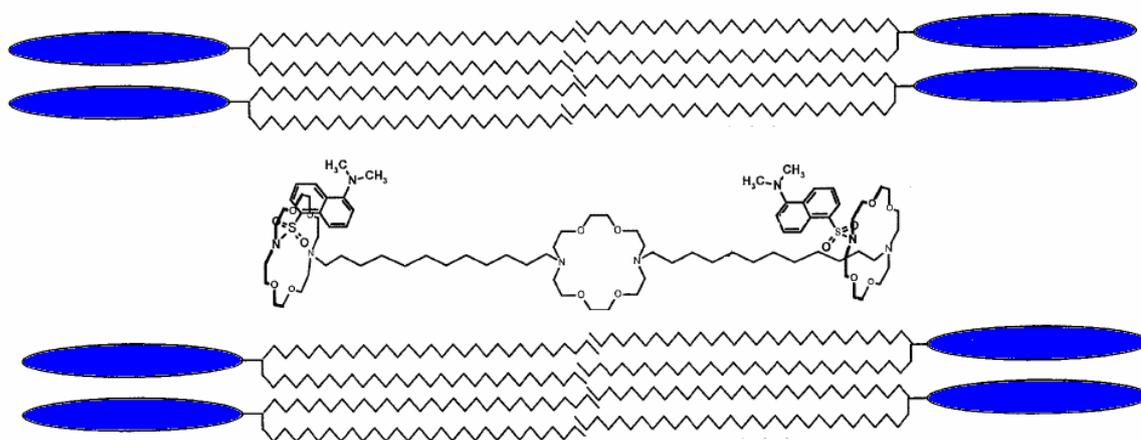


Figura 6 – Ionoforo di Gokel strutturato all'interno della membrana biologica

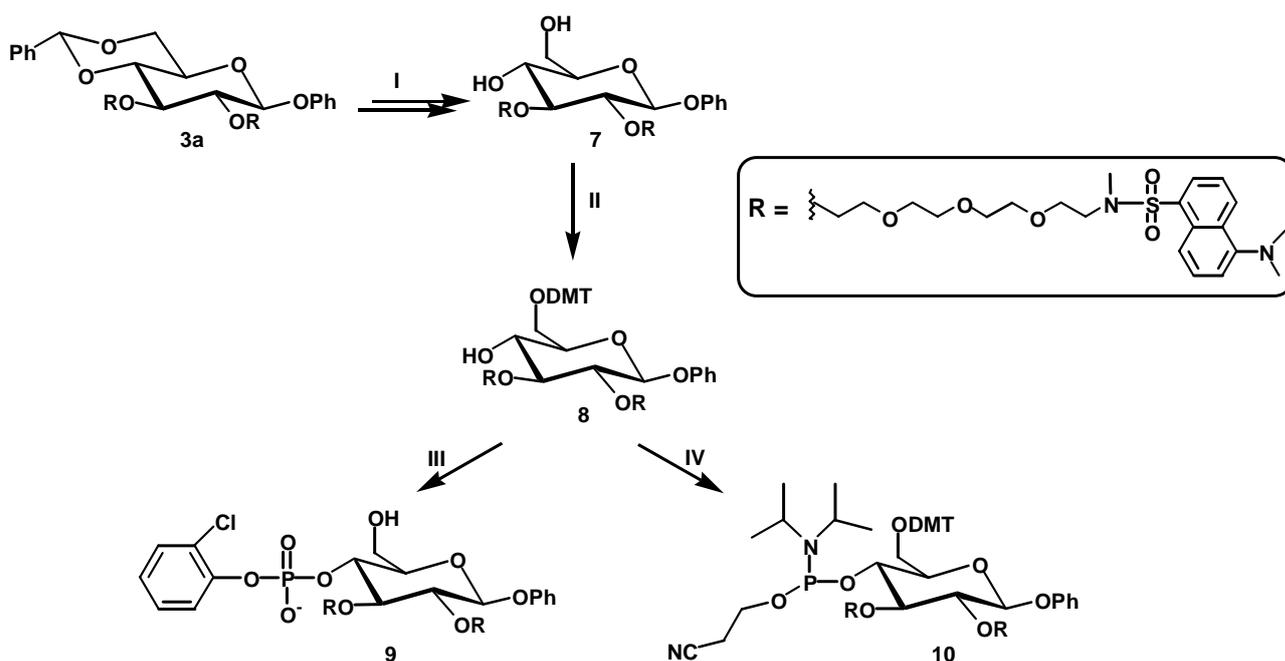
Questo studio è stato, infine, integrato da esperimenti condotti mediante microscopia di fluorescenza su colonie di *E. coli* trattate con questo ionoforo che hanno mostrato in maniera inequivoca la localizzazione di questa molecola nella membrana cellulare del batterio⁴⁵.

⁴⁵ Leevy, W.M.; Donato, G.M.; Ferdani, R.; Goldman, W.E.; Schlesinger, P.H.; Gokel, G.W. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9022-9023.

2.0 SINTESI DEL CYPLOS TETRADANSILATO

Come già anticipato nel paragrafo 1.1, una volta provata la versatilità dell'intermedio azido **1**, la strategia sintetica per la preparazione dei CyPLOS anfiliici è stata estesa al derivato recante alle estremità delle catene di tetraetilenglicole, il gruppo fluorescente dansile. E' stato, quindi, utilizzato il composto **3a** come *building block* di partenza e, dopo una serie di tentativi, in cui la successiva elaborazione del monomero **3a** a dare il corrispondente derivato 4-fosfato o 4-fosforammidito forniva miscele di reazione complesse e difficilmente purificabili, è stato introdotto un passaggio di metilazione delle solfonammidi al fine di impedire possibili interferenze di questo gruppo funzionale nelle successive elaborazioni sintetiche previste per ottenere il *target* macrociclico finale.

Pertanto è stato effettuato un trattamento con CH_3I e NaH in THF per bloccare la nucleofilicità residua sugli atomi di azoto delle solfonammidi in **3a**.



- I.** a) CH_3I , NaH , THF, r.t., 8 h, quant; b) TFA/ CH_2Cl_2 / H_2O 1:10:0.5, v/v/v, 0 °C, 4 h, quant;
II. DMTCl, Py, r.t., 12 h, quant;
III. 2-clorofenil-dicloro-fosfato, 1,2,4-triazolo, Et_3N , Py, 0 °C→r.t., 3 h (90%);
IV. 2-cianoetil-N,N-diisopropilclorofosforammidito, DIPEA, CH_2Cl_2 , r.t., 2 h (87%).

Schema 7 – Sintesi dei “building block” **9** e **10**

Successivamente, su tale composto è stata effettuata la deprotezione degli ossidrili in 4 e 6 utilizzando una soluzione al 10% di TFA in DCM che ha consentito la completa

rimozione del gruppo benzilidene. La reazione, condotta a 0 °C per 4 ore, ha portato al derivato atteso **7** con resa pressoché quantitativa (*Schema 7*). A questo punto dello schema sintetico è stato protetto selettivamente l'ossidrile primario in posizione 6 dello zucchero con il gruppo 4,4'-dimetossitriifenilmetile (DMT). La sintesi del derivato **8** è stata effettuata mediante reazione con DMTCl in piridina, che ha portato al derivato atteso con una resa quasi quantitativa.

Il derivato **9** è stato sintetizzato con un'ottima resa complessiva per una reazione *one pot* che ha previsto la fosforilazione in posizione 4 per reazione con 2-clorofenil-diclorofosfato in presenza di 1,2,4-triazolo e trietilammina, seguita da detritilazione dell'OH in posizione 6 (90%). La rimozione del DMT è stata effettuata cromatografando il campione su una colonna di gel di silice eluita con una soluzione di TFA 0.01% in CHCl₃.

Il derivato **9** è risultato essere un prodotto stabile, adatto ad essere conservato anche per lunghi periodi.

Per la sintesi del derivato **10** è stata seguita una procedura ben ottimizzata nell'elaborazione sintetica di *building block* utili per la sintesi di oligonucleotidi, mediante fosfitilazione con *N,N*-diisopropil-2-cianoetilclorofosforamidito in presenza di DIPEA e CH₂Cl₂, ottenendo il prodotto desiderato con una resa dell'87%. Anche in questo caso, particolare attenzione è stata dedicata alla fase di purificazione. Le aliquote di solvente utilizzate, sia per l'impaccamento della colonna, sia per l'eluizione sono state addizionate in tutti i casi con TEA (1% in volume), per evitare anche parziale deprotezione dal gruppo transiente DMT, labile ai trattamenti acidi.

Per ottenere il dimero lineare **11** sono stati fatti condensare i due *building block* cioè, rispettivamente, il monomero 4-fosfato **9**, avente l'ossidrile primario in posizione 6 non protetto, e il monomero 4-fosforamidito **10**, con la funzione alcolica primaria in posizione 6 protetta come DMT-etere, sfruttando la chimica del fosforamidito (*Schema 8*). La reazione di accoppiamento è realizzata in presenza di un catalizzatore acido molto blando, capace di protonare l'azoto del gruppo diisopropilamminico legato al fosforo, trasformandolo in un ottimo gruppo uscente (molecola neutra di *N,N'*-diisopropilammina), e contemporaneamente attivando l'atomo di fosforo adiacente all'attacco nucleofilo da parte dell'ossidrile primario libero del monomero **9**.

La sintesi del dimero lineare **11** è stata realizzata utilizzando come attivante una soluzione 0.25 M di DCI in CH₃CN e tenendo la miscela di reazione a temperatura ambiente per 2 ore. La successiva reazione di ossidazione, condotta in modalità *one-pot*, è stata effettuata per aggiunta di *tert*-butilidroperossido (*t*-ButOOH, soluzione 5.5 M in decano) per

Tutti i derivati e il prodotto finale sono stati purificati mediante cromatografia su colonna di gel di silice e successivamente caratterizzati mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ (anche $^{31}\text{P-NMR}$ per i derivati contenenti fosforo), e spettrometria di massa in modalità ESI o MALDI.

3.0 STUDI DI AGGREGAZIONE

Una volta sintetizzato ed isolato il dimero **6**, è stato effettuato uno studio preliminare sulle proprietà di auto-aggregazione di tale molecola. Sfruttando tecniche di spettroscopia NMR sono stati registrati spettri $^{31}\text{P-NMR}$ del campione sciolto in CDCl_3 a T e concentrazione variabile, in analogia agli studi già effettuati in precedenza sui macrocicli analoghi **1a**, **1b** e **1c** descritti nel capitolo I.

Ad una concentrazione di 3.0 mM il campione mostra la presenza di più risonanze in un intervallo di 15 ppm che si sommano a dare una banda molto slargata, centrata a ca. $\delta = 0$ ppm. Avendo previamente verificato l'omogeneità del campione mediante analisi HPLC (dato confermato anche dall'ispezione degli spettri MALDI-TOF, che non mostrano la presenza di altre specie), questo dato è stato interpretato come indizio della presenza di strutture aggregate, a quella determinata concentrazione, in equilibri dinamici lenti sulla scala dei tempi NMR. Esperimenti condotti a temperature variabili nell'intervallo 278-338 K non hanno prodotto variazioni nell'aspetto delle bande, indicando una discreta stabilità termica degli aggregati. In *Figura 6* sono riportati gli spettri $^{31}\text{P-NMR}$ (161.98 MHz, 298 K, CDCl_3) del prodotto ciclico finale a concentrazione decrescente, nell'intervallo 3.0 – 0.09 mM.

Diminuendo progressivamente la concentrazione, è possibile osservare che a 0.35 mM le due bande, preponderanti a 1.5 e 0.75 mM, collassano a dare un segnale unico centrato a circa 2 ppm, che a 0.18 mM appare come ben risolto e *sharp*, indicativo della totale equivalenza magnetica dei due atomi di fosforo presenti nel ciclo in queste condizioni (*Figura 7*). Se ne deduce che, a questi valori di concentrazione, il macrociclo è presente in forma monomerica ed è efficacemente solvatato, cosicchè eventuali conformazioni diverse, tutte comunque molto flessibili, risultano mediate nel tempo di registrazione degli spettri NMR.

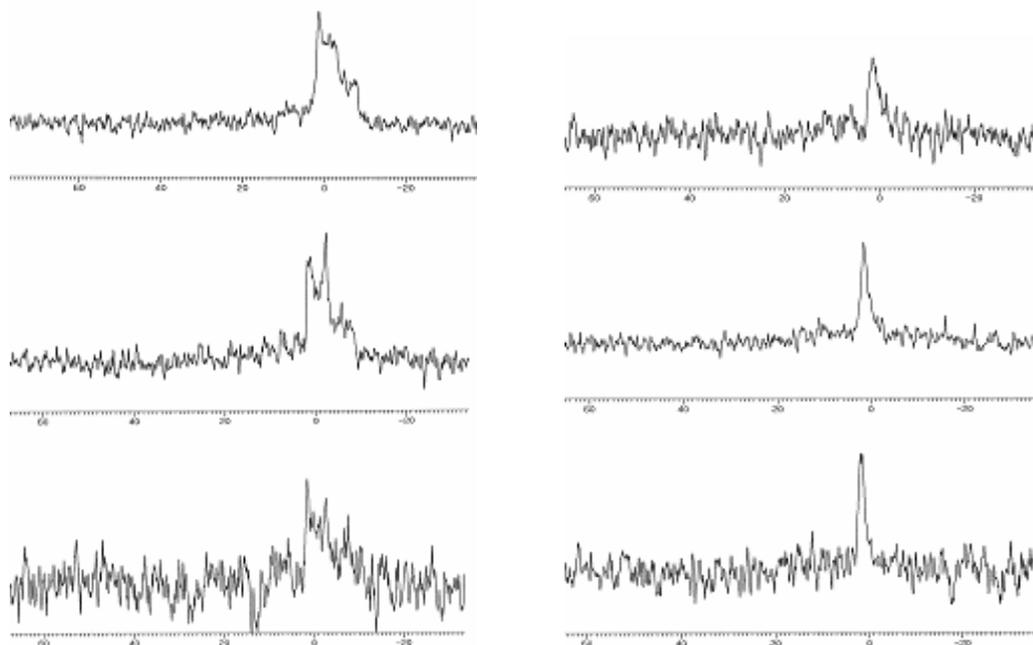


Figura 7 – Spettri ^{31}P -NMR (161.98 MHz, 298 K, CDCl_3) del composto **6** registrati a differenti concentrazioni (3.0, 1.5, 0.75, 0.35, 0.18 mM, rispettivamente)

Informazioni più approfondite circa la strutturazione in soluzione e la stabilità degli aggregati formati da questo macrociclo anfifilico potranno essere ottenute mediante una caratterizzazione microstrutturale condotta con tecniche di scattering della luce dinamico e statico e scattering di neutroni (SANS), le cui analisi sono attualmente in corso in laboratori specializzati. Dai dati ricavabili da spettri ^{31}P -NMR a concentrazione variabile si può indicare l'intervallo 200-300 μM come valore di concentrazione di aggregazione critica (*c.a.c.*) del sistema, dato intermedio fra valori di concentrazione in cui si osservano picchi ben risolti e valori in cui si registrano più risonanze ravvicinate e non risolte che si sovrappongono a dare una banda slargata.

3.1 SPETTRI DI FLUORESCENZA

Sul derivato finale **6** sono stati registrati spettri di fluorescenza in solventi con polarità differente, per seguire le variazioni dell'intensità di fluorescenza e della λ_{max} di emissione del fluoroforo dansile al variare dell'ambiente in cui esso è disperso. Come sistemi solventi sono stati analizzati:

- CHCl_3
- CH_3OH
- $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (9:1, v/v).

In via del tutto generale i tre sistemi solvente utilizzati possono mimare le tre regioni a polarità differente delle membrane biologiche: la regione idrofobica interna, la regione a polarità intermedia e la regione polare esposta all'acqua (Figura 8)²⁶.

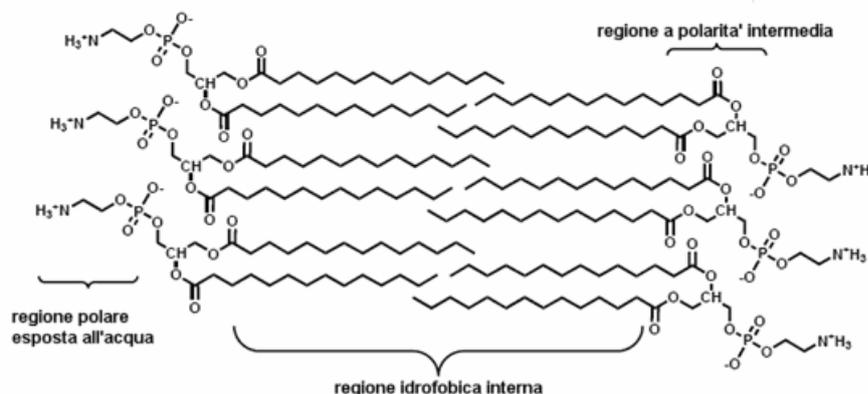


Figura 8 – Membrana biologica

Il macrociclo sintetizzato, una volta inserito in una membrana, esporrà i gruppi dansile in regioni differenti in funzione del tipo conformazione e/o di superstruttura adottata, cui corrisponde un meccanismo d'azione diverso (micella inversa, unità semicanale, *carrier* mobile ecc.).

Pertanto, assumendo che la regione idrofobica interna delle membrane abbia polarità paragonabile a quella del CHCl_3 , la regione a polarità intermedia sia paragonabile al CH_3OH e la regione esterna (le teste polari della membrana) possa essere ben mimata da una miscela $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, dalla posizione e l'intensità del massimo di emissione in spettri di fluorescenza è possibile ricavare informazioni sulla localizzazione ed eventuale mobilità dei residui dansile all'interno del doppio strato lipidico.

In *Figura 9* è riportato il confronto degli spettri di fluorescenza del tetradansil-CyPLOS **6** in vari sistemi solventi, da cui si evince che il dansile presente nel macrociclo, come atteso, ha proprietà spettrofluorimetriche fortemente dipendenti dal solvente in cui è disciolto. In particolare, passando dal CHCl_3 al CH_3OH , ed al sistema $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ si osserva una spiccata diminuzione dall'intensità di fluorescenza di **6** e, dato molto rilevante, uno spostamento di ca. 10 nm del valore di λ_{max} .

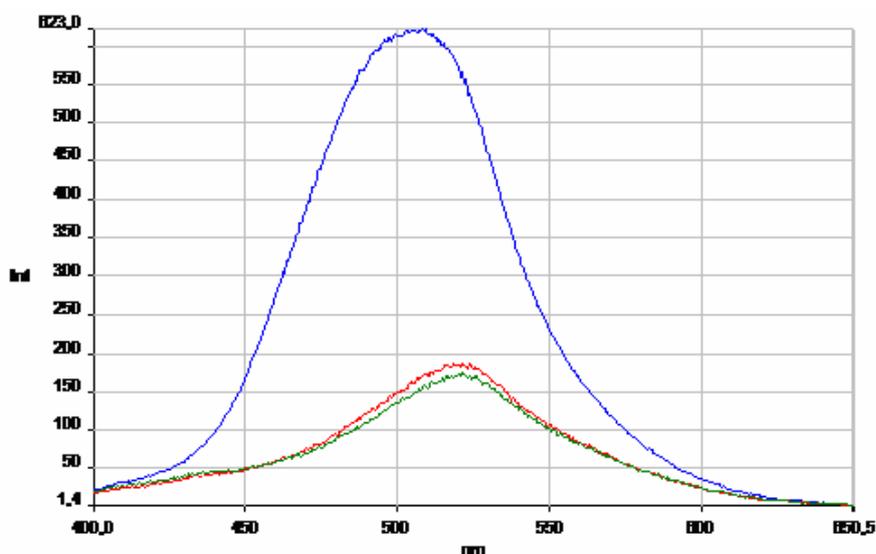


Figura 8 – Confronto degli spettri di fluorescenza in vari sistemi solventi del *tetradansil-CyPLOS 6* (conc. 0.3 mM). Curva blu: **6** sciolto in CHCl_3 ; curva rossa: **6** sciolto in CH_3OH ; curva verde: **6** sciolto in $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 9:1 (v/v)

Questo studio preliminare ha confermato la validità di un *probe* fluorescente come il dansile, inserito all'interno della struttura del CyPLOS anfifilico, per ottenere informazioni più dettagliate sul meccanismo d'azione nel trasporto di ioni attraverso le membrane cellulari. Su questo composto sono, tuttora, in corso studi di attività ionofora, condotti parallelamente a studi di penetrazione su linee cellulari di varie colonie batteriche effettuate mediante microscopia di fluorescenza e studi di attività antimicrobica ed antitumorale.

Questi ultimi esperimenti, condotti in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Luigi Xodo dell'Università di Udine, completeranno il quadro generale sui CyPLOS anfifilici sintetizzati, consentendo di trarre risultati conclusivi circa le relazioni di struttura-attività di queste molecole e poter progettare una seconda generazione di macrocicli, potenzialmente attivi e selettivi.

4.0 PARTE SPERIMENTALE

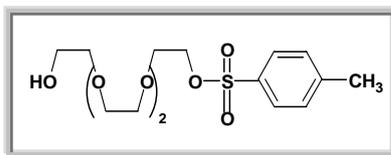
PROCEDURE GENERALI

Le analisi TLC sono state effettuate su lastre di gel di silice Merck (60, F254). I prodotti di reazione sono stati evidenziati mediante luce UV e poi per trattamento con una soluzione acida ossidante (acido acetico/acqua/acido solforico 10:4:5: v/v). Per le cromatografie su colonna è stata utilizzata gel di silice Merck (Kieselgel 40, 0.063-0.2000 mm). Sono stati utilizzati setacci molecolari 3 Å in perle. Gli spettri IR sono stati eseguiti sullo spettrofotometro Nicolet 6700 FT-IR. Gli spettri NMR sono stati eseguiti su spettrometri Bruker WM-400, Varian Gemini 300, Varian Gemini 200 and Varian Inova 500. I chemical shifts sono espressi in ppm utilizzando come riferimento il segnale residuo del solvente ($\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm, $\text{CD}_3\text{OD} = 3.31$ ppm); i chemical shifts degli spettri al ^{13}C sono riferiti al segnale del solvente ($\text{CDCl}_3 = 76.9$ ppm, $\text{CD}_3\text{OD} = 45.9$ ppm); i valori di J sono espressi in Hz. Gli spettri ^{31}P -NMR sono stati registrati utilizzando come riferimento esterno una soluzione all'85% di H_3PO_4 contenente alcune gocce di D_2O . L'assegnazione dei picchi è stata effettuata con esperimenti di ^1H - ^1H COSY e HSQC. Gli spettri di massa ESI (ioni positivi e/o negativi) sono stati eseguiti con uno spettrometro Waters Micromass ZQ. Gli spettri di massa MALDI-TOF sono stati eseguiti con uno spettrometro PerSeptive Biosystems Voyager-De Pro MALDI, utilizzando come matrice l'acido 3,4-diidrossibenzoico.

SINTESI DI N₃-TEG-OMs (III)

SINTESI DI TsO-TEG-OH (I): A 0.89 g di TEG (4.6 mmol) sciolti in 10 ml di CH₂Cl₂ anidro, sono stati aggiunti 1.1 g di Ag₂O (4.7 mmol) e 1.0 g di cloruro di tosile (5.2 mmol), addizionati in sequenza. La reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per 48 ore. La miscela di reazione è stata poi filtrata su celite ed in seguito lavata con AcOEt e una soluzione acquosa satura di NaCl. La fase organica è stata anidrificata su Na₂SO₄, concentrata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice impaccata con CHCl₃. Successive eluizioni con CHCl₃ contenenti percentuali crescenti di CH₃OH (da 0 al 5%) hanno fornito 1.3 g (3.7 mmol) di prodotto **I** pulito con una resa dell'80%.

I: olio, $R_f = 0.4$ [CHCl₃/CH₃OH, 95:5 (v/v)].



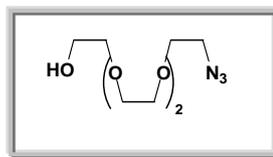
¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.81-7.33 (m, 4H, protoni aromatici); 4.16 [t, $J = 4.8$ e 4.8 Hz, 2H, (-CH₂-SO₂)]; 3.72-3.60 [segnali sovrapposti, 14H, 7x(-O-CH₂-TEG)]; 2.44 (s, 3H, -CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 144.7, 129.7, 127.9 e 104.2 (carboni aromatici); 72.4, 70.7, 70.6 70.4, 70.2, 69.1, 68.6 e 61.7 [(-O-CH₂-TEG)]; 21.5 (-CH₃).

ESI-MS (ioni positivi): per C₁₅H₂₄O₇S: calcolato: 348.12427, trovato: 371.23 (M + Na⁺); 387.20 (M+ K⁺).

SINTESI DI N₃-TEG-OH (II): A 1.3 g di prodotto **I** (3.7 mmol) sciolti in 15 ml di EtOH anidro sono stati aggiunti a caldo 721 mg (11.1 mmol) di NaN₃ e la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica a ricadere per 8 ore. La reazione è stata controllata mediante TLC utilizzando come sistema eluente CHCl₃/CH₃OH 95:5 (v/v). La miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta, ridisciolta con CHCl₃ e lavata due volte con una soluzione acquosa satura di NaCl. La fase organica è stata poi anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata e seccata a pressione ridotta fornendo 0.81 g (3.7 mmol) di prodotto **II**, corrispondenti ad una resa pressoché quantitativa.

II: olio giallo, $R_f = 0.3$ [CHCl₃/CH₃OH, 95:5, (v/v)].



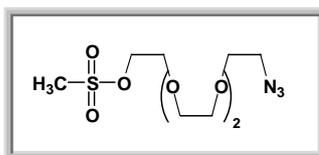
¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 3.71-3.59 [segnali sovrapposti, 12H, 6x(-O-CH₂-TEG)]; 3.41 [t, 2H, (-CH₂-OH)]; 2.32 [t, 2H, (-CH₂-N₃)].

¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 72.3, 70.5, 70.2 e 69.9 [(-O-CH₂-TEG)]; 61.6 [(-CH₂-OH)]; 50.5 (-CH₂N₃).

ESI-MS (ioni positivi): per C₈H₁₇N₃O₄: calcolato: 219.12191, trovato: 242.22 (M + Na⁺); 258.21 (M+ K⁺).

SINTESI DI N₃-TEG-OMs (III): A 0.81 g di di prodotto **II** (3.7 mmol) sciolti in 8 ml di CH₂Cl₂ anidro sono stati aggiunti 1.5 mL di DIPEA (8.6 mmol) e 345 μ L (4.4 mmol) di cloruro di mesile (MsCl) in sequenza. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 12 ore a temperatura ambiente. Il controllo della reazione è stato effettuato mediante TLC utilizzando come sistema eluente CHCl₃/CH₃OH 95:5 (v/v). La soluzione è stata concentrata a pressione ridotta, il residuo diluito con CHCl₃, versato in un imbuto separatore e lavato due volte con una soluzione acquosa satura di NaCl. La fase organica è stata anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice, che è stata impaccata ed eluita con CHCl₃. Sono stati recuperati 0.99 g (3.4 mmol) di prodotto **III** puro, ottenuto con resa del 92%.

III: olio giallo, R_f = 0.6 [CHCl₃/CH₃OH, 95:5, (v/v)].

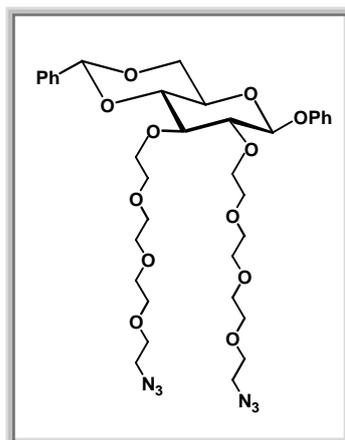


ESI-MS (ioni positivi): per C₉H₁₉N₃O₆S: calcolato: 297.09946, trovato: 320.19 (M + Na⁺); 336.28 (M+ K⁺).

SINTESI DELL' INTERMEDIO VERSATILE 1.

A 380 mg (1.1 mmol) di fenil- β -D-glucopiranoside protetto in posizione 4 e 6, sciolti in 7 mL di DMF, sono stati aggiunti 80 mg di NaH (sospensione al 60% in olio minerale, 3.4 mmol). Dopo 10 minuti è stato aggiunto il derivato **III** (1.0 g, 3.4 mmol). La reazione è stata lasciata per 4 ore a temperatura ambiente ed è stata controllata mediante TLC utilizzando come sistema eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 95:5 (v/v). Dopo aggiunta di qualche goccia di CH_3OH , la miscela è stata seccata a pressione ridotta, ridisciolta in CHCl_3 , versata in un imbuto separatore e lavata due volte con una soluzione acquosa satura di NaCl. La fase organica è stata recuperata, anidrificata su sodio solfato anidro, concentrata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice eluita con CHCl_3 contenente volumi crescenti di CH_3OH fino ad arrivare al 5% di CH_3OH . Sono stati recuperati 665 mg (0.90 mmol) di prodotto desiderato **1**, corrispondenti ad una resa del 90%.

1: olio giallo, $R_f = 0.35$ [$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 95:5 (v/v)].



IR (KBr) ν_{max} : 2104, 1636, 1558, 1490, 1456, 1225, 1085, 1036, 771, 706 cm^{-1} .

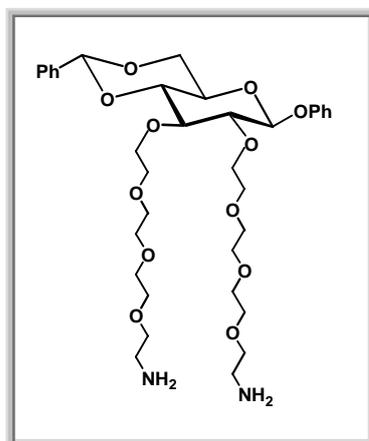
^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.46-7.01 (segnali complessi, 10H, protoni aromatici); 5.52 [s, 1H, (Ph-CH)]; 5.01 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-1); 4.33 (m, 1H, H-4); 4.05-3.88 [segnali sovrapposti, 5H, (-CH₂-O-C-2), (-CH₂-O-C-3) e H-6_a]; 3.76 (t, $J = 10.4$ e 10.0 Hz, 1H, H-3); 3.64-3.57 [segnali sovrapposti, 25H, 12x(O-CH₂-TEG) e H-6_b]; 3.51-3.43 (segnali sovrapposti, 2H, H-2 e H-5); 3.34 [t, $J = 4.8$ e 4.8 Hz, 4H, (-CH₂-N₃)].

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 156.9, 137.0, 129.5, 129.3, 128.8, 128.0, 125.9, 122.8, 116.8 e 116.3 (carboni aromatici); 101.6 (C-1); 101.0 (Ph-CH); 82.3 (C-2); 81.5 e 80.4 [2x(-CH₂-CH₂-O-zucchero)]; 77.1 [2x(-CH₂-CH₂-N₃)]; 72.4 e 72.2 [2x(-CH₂-O-zucchero)]; 70.4 [12x(O-CH₂-TEG)]; 70.2 (C-6); 69.8 (C-3); 68.5 (C-4); 66.0 (C-5); 50.4 [2x(-CH₂-N₃)].

MALDI (ioni positivi): per $C_{35}H_{50}N_6O_{12}$: calcolato: 746.34867; m/z , trovato 747.49 ($M + H^+$), 769.59 ($M + Na^+$), 785.62 ($M + K^+$).

SINTESI DEL DERIVATO 2: 320 mg (0.43 mmol) di prodotto **1** sono stati sciolti in 2 mL di THF anidro e alla miscela sono stati aggiunti 281 mg (2.5 mmol) di Ph_3P ; la reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente ed è stata controllata mediante TLC utilizzando come eluente BAW (*n*-Butanolo/Acido Acetico/Acqua, 60/15/25, v/v/v). Dopo 8 ore sono stati aggiunti 5 mL di H_2O e la reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 48 ore a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata quindi trattata con una soluzione diluita di HCl e lavata più volte con etere etilico. La fase acquosa è stata portata a pH=8 con una soluzione diluita di $NaHCO_3$ ed estratta con $CHCl_3/CH_3OH$ (9:1, v/v). La fase organica, anidrificata su sodio solfato anidro, è stata filtrata e seccata sotto vuoto. Sono stati recuperati 300 mg (0.43 mmol) di prodotto desiderato **2** ottenuto in forma pura con resa pressoché quantitativa.

2: olio, $R_f = 0.4$ [*n*-Butanolo/Acido Acetico/Acqua, 60:15:25 (v/v/v)].



IR (KBr) ν_{max} : 3504 (slargato), 1638, 1558, 1486, 1452, 1230, 1089, 1032, 772, 699 cm^{-1} .

1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ 7.48-7.02 (segnali complessi, 10H, protoni aromatici); 5.53 [s, 1H, (Ph-CH)]; 5.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-1); 4.34 (m, 1H, H-4); 4.07-3.89 [segnali sovrapposti, 4H, (-CH₂-O-C-2) e (-CH₂-O-C-3)]; 3.77 (t, $J = 10.0$ e 10.5 Hz, 1H, H-3); 3.65-3.52 [segnali sovrapposti, 27H, 12x(O-CH₂-TEG), H-2 e H₂-6)]; 3.47 (m, 1H, H-5); 2.83 [singoletto slargato, 4H, 2x(-CH₂-NH₂)].

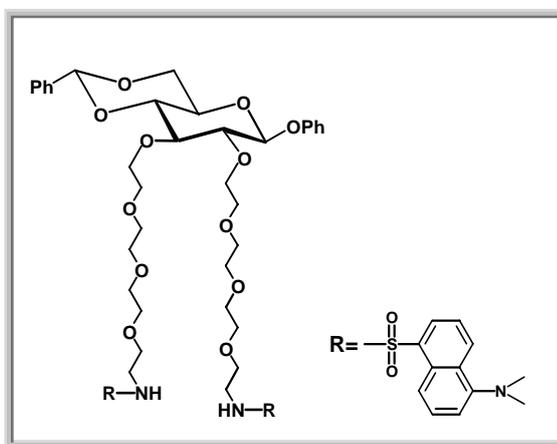
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ 157.0, 137.1, 132.0, 129.4, 128.9, 128.3, 128.1, 125.9, 122.8 e 116.9 (carboni aromatici); 101.7 (C-1); 101.1 (Ph-CH); 82.4 (C-2); 81.5 e 80.5 [2x(-CH₂-CH₂-O-zucchero)]; 73.3 [2x(-CH₂-CH₂-NH₂)]; 72.4 e 72.2 [2x(-CH₂-O-Zucchero)]; 70.6,

70.5, 70.4 e 70.3 [12x(O-CH₂-TEG)]; 70.2 (C-6); 70.1 (C-3); 68.5 (C-4); 66.0 (C-5); 41.6 [2x(-CH₂-NH₂)].

MALDI (ioni positivi): per C₃₅H₅₄N₂O₁₂, calcolato: 694.36768; *m/z*, trovato 695.93 (M + H⁺), 717.95 (M + Na⁺), 733.83 (M + K⁺).

SINTESI DEL DERIVATO 3a: 130 mg (0.19 mmol) del prodotto **2**, anidrificati per ripetute coevaporazioni con benzene anidro, sono stati sciolti in 3 mL di CH₂Cl₂, ed alla miscela sono stati aggiunti 100 µl di TEA (0.76 mmol) e 150 mg di cloruro di dansile (0.57 mmol) addizionati in sequenza. La reazione, lasciata sotto agitazione magnetica per 12 ore a temperatura ambiente, è stata controllata mediante TLC utilizzando come sistema eluente CHCl₃/CH₃OH 95:5 (v/v). La miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta, ridisciolta in CHCl₃ e trasferita in un imbuto separatore, quindi lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl. La fase organica è stata recuperata, anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata e concentrata. La purificazione è stata effettuata su colonna di gel di silice impaccata con CHCl₃ ed eluita con CHCl₃ contenente percentuali crescenti di CH₃OH, fino ad arrivare al 5% (v/v). Sono stati recuperati 185 mg di prodotto **3a** puro (0.16 mmol) corrispondenti ad una resa dell'85%.

3a: olio giallo-verde, *R_f* = 0.5 [CHCl₃/CH₃OH, 95:5 (v/v)].



IR (KBr) ν_{max} : 3494 (slargato), 1593, 1494, 1459, 1325, 1223, 1142, 1089, 768, 699 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 8.51 [d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2x(H₂-Dansile)]; 8.30 [d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2x(H₈-Dansile)]; 8.22 [d, *J* = 7.0 Hz, 2H, 2x(H₄-Dansile)]; 7.55-7.02 [segnali complessi, 16H, 2x(H₃-Dansile), 2x(H₆-Dansile), 2x(H₇-Dansile) e protoni fenilici]; 5.64-5.59 [singoletto slargato, protoni scambiabili, 2H, 2x(NH-TEG)]; 5.53 [s, 1H, (Ph-CH)]; 5.06 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-1); 4.33 (m, 1H, H-4); 4.07-3.91 [segnali sovrapposti, 5H, (-CH₂-O-C-2), (-CH₂-O-C-3) e H-6_a]; 3.76 (t, *J* = 10.5 e 10.0 Hz, 1H, H-3); 3.66-3.49 [segnali sovrapposti,

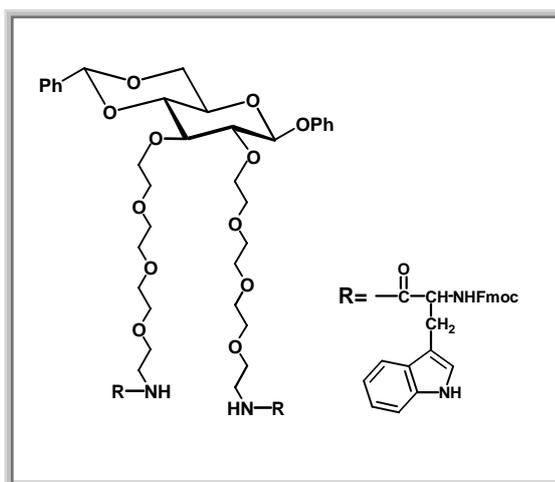
23H, 10x(O-CH₂-TEG), H-6_b, H-2 e H-5)]; 3.36-3.31 [m, 4H, 2x(-CH₂-CH₂-NHSO₂-)]; 3.10-3.06 [m, 4H, 2x(-CH₂-CH₂-NHSO₂-)]; 2.87 [s, 12H, 4x(CH₃-N-*Dansile*)].

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 132.1, 129.4, 128.9, 128.5, 128.1, 126.0, 122.8 e 116.9 (carboni aromatici); 101.4 (C-1); 101.1 (Ph-CH); 82.5 (C-2); 81.5 e 80.4 [2x(-CH₂-CH₂-O-Zucchero)]; 72.5 e 72.3 [2x(-CH₂-O-Zucchero)]; 70.6 e 70.4 [10x(O-CH₂-TEG)]; 70.2 (C-6); 69.2 (C-3); 68.5 (C-4); 66.0 (C-5); 45.8 [4x(CH₃-N-*Dansile*)]; 43.0 [2x(CH₂-CH₂-NHSO₂)].

ESI-MS (ioni positivi): per C₅₉H₇₆N₄O₁₆S₂, calcolato: 1160.47; *m/z*, trovato 1161.65 (M+H⁺), 1183.64 (M + Na⁺), 1199.69 (M + K⁺).

SINTESI DEL DERIVATO 3b: 130 mg (0.19 mmol) del prodotto **2**, anidrificati per ripetute coevaporazioni con benzene anidro, sono stati sciolti in 3 mL di CH₂Cl₂, ed alla miscela sono stati aggiunti, nell'ordine, DIPEA (163 µl, 0.76 mmol), DCC (235 mg, 1.14 mmol) e triptofano N-*Fmoc*-protetto (240 mg, 0.57 mmol). La reazione, lasciata sotto agitazione magnetica per 12 ore a temperatura ambiente, è stata controllata mediante TLC utilizzando come eluente CHCl₃/CH₃OH 9:1 (v/v). La miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta, ridisciolta in CHCl₃ e trasferita in un imbuto separatore, quindi lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl. La fase organica è stata recuperata, anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata e concentrata. La purificazione è stata effettuata su colonna di gel di silice impaccata con CHCl₃ ed eluita con CHCl₃ contenente percentuali crescenti di CH₃OH, fino ad arrivare al 10% (v/v). Sono stati recuperati 235 mg di prodotto **3b** puro (0.16 mmol) corrispondenti ad una resa dell'84%.

3b: olio, *R_f* = 0.5 [CHCl₃/CH₃OH, 9:1 (v/v)].



IR (KBr) ν_{\max} : 3412 e 3297 (slargato), 1703, 1663, 1499, 1455, 1228, 1085, 743 cm⁻¹.

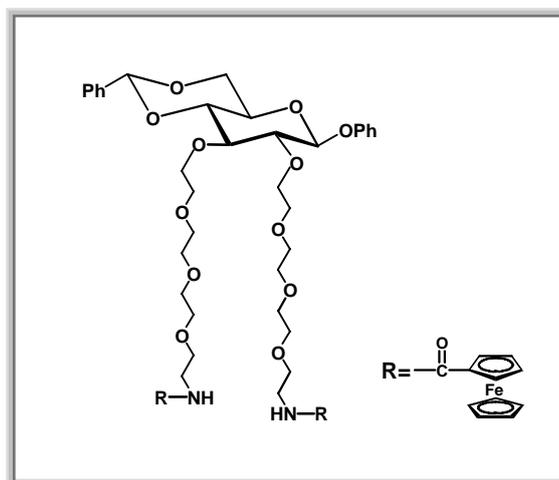
^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.76-6.95 (segnali complessi, 38H, protoni aromatici); 6.00 [segnali slargati, 2H, 2x(NH-*TEG*)]; 5.84 [segnali slargati, 2H, 2x(NH-*Trp*)]; 5.29 [s, 1H, (Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$)]; 4.88 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-1); 4.45-4.33 [segnali sovrapposti, 6H, 2x(CH_2 -*Fmoc*) e 2x(CH_α -*Trp*)]; 4.26 (m, 1H, H-4); 4.21 [m, 2H, 2x(CH -*Fmoc*)]; 4.02-3.79 [segnali sovrapposti, 5H, ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O-C-2), ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O-C-3) e H-6_a]; 3.66-3.18 [segnali sovrapposti, 31H, H-3, 12x(O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -*TEG*), 2x(CH_2 -*Trp*), H-2 e H-6_b]; 3.11-3.05 [segnali sovrapposti, 5H, 2x($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -NHCO) e H-5].

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 171.0 (CO); 156.8, 155.7, 143.7, 141.1, 137.1, 136.2, 129.4, 128.9, 128.1, 127.6, 127.3, 127.0, 126.0, 125.0, 123.7, 122.8, 121.8, 119.8, 119.4, 118.7, 116.6, 111.4 e 109.9 (carboni aromatici); 101.2 (C-1); 101.0 (Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$); 82.3 (C-2); 81.4 e 80.3 [2x($-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - CH_2 -O-zucchero)]; 72.1 e 71.9 [2x($-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O-zucchero)]; 70.6, 70.4, 70.2 e 70.1 [10x(O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -*TEG*)]; 69.9 (C-3); 69.2 (C-6); 68.4 (C-4); 66.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -*Fmoc*); 65.8 (C-5); 55.5 (CH_α -*Trp*); 47.0 ($\underline{\text{C}}\text{H}$ -*Fmoc*); 39.1 [2x($-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -NHCO)]; 29.6 (CH_2 -*Trp*).

ESI-MS (ioni positivi): per $\text{C}_{87}\text{H}_{94}\text{N}_6\text{O}_{18}$, calcolato: 1510.66; m/z , trovato 1535.96 (M + Na^+), 1552.05 (M + K^+).

SINTESI DEL DERIVATO 3c: 130 mg (0.19 mmol) del prodotto **2**, anidrificati per ripetute coevaporazioni con benzene anidro, sono stati sciolti in 3 ml di CH_2Cl_2 , ed alla miscela sono stati aggiunti, nell'ordine, DIPEA (130 μl , 0.76 mmol), DCC (235 mg, 1.14 mmol) e acido ferrocen-carbossilico (132 mg, 0.57 mmol). La reazione, lasciata sotto agitazione magnetica per 12 ore a temperatura ambiente, è stata controllata mediante TLC utilizzando come eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 9:1 (v/v). La miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta, ridisciolta in CHCl_3 e trasferita in un imbuto separatore, quindi lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl. La fase organica è stata recuperata, anidrificata su Na_2SO_4 anidro, filtrata e concentrata. La purificazione è stata effettuata su colonna di gel di silice impaccata con CHCl_3 ed eluita con CHCl_3 contenente percentuali crescenti di CH_3OH , fino ad arrivare al 10% (v/v). Sono stati recuperati 150 mg di prodotto **3c** puro (0.13 mmol) corrispondenti ad una resa del 68%.

3c: olio, $R_f = 0.3$ [$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1 (v/v)].



IR (KBr) ν_{\max} : 3410 e 3290 (slargato), 1635, 1540, 1490, 1452, 1226, 1085, 1024, 733, 696 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.51-7.03 (segnali complessi, 10H, protoni aromatici); 6.12 [segnale slargato, protoni scambiabili, 2x(NH)]; 5.64 [s, 1H, (PhCH)]; 5.30 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1); 4.94 (segnali slargati, 4H, H-3 e H-4 dell'anello A del ferrocene); 4.34 (m, 1H, H-4); 4.28 (segnali slargati, 4H, H-2 e H-5 dell'anello A del ferrocene); 4.19 (s, 10H dell'anello B del ferrocene non sostituito); 4.05-3.95 [segnali sovrapposti, 5H, (-CH₂-O-C-2), (-CH₂-O-C-3) e H-6_a]; 3.84-3.49 [segnali sovrapposti, 26H, H-3, 12x(O-CH₂-TEG) e H-6_b]; 3.42-3.38 (m, 2H, H-2 e H-5); 3.08-3.03 [m, 4H, 2x(-CH₂-NHCO)].

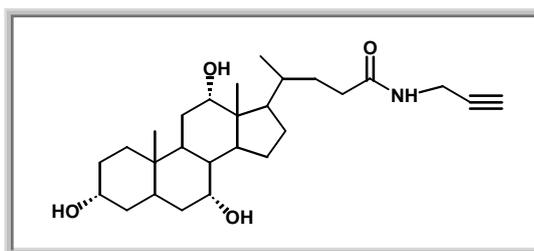
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 170.8 (CO); 156.8, 137.2, 130.3, 129.7, 128.9, 128.7, 128.1, 127.3, 127.0, 125.4, 123.7, 122.0, 117.5 e 115.9 (carboni aromatici); 102.1 (Ph-CH); 100.4 (C-1); 83.3 (C-2); 81.8 e 80.4 [2x(-CH₂-CH₂-O-zucchero)]; 79.4 (carboni dell'anello B del ferrocene); 71.5 e 71.1 [2x(-CH₂-O-zucchero)]; 70.5, 70.1, 69.3 e 68.8 [10x(O-CH₂-TEG) e carboni dell'anello A del ferrocene]; 67.7 (C-3); 66.7 (C-4); 66.2 (C-5); 65.2 (C-6); 40.7 (2xCH₂-NHCO).

ESI-MS (ioni positivi): per $\text{C}_{57}\text{H}_{70}\text{N}_2\text{Fe}_2\text{O}_{14}$, calcolato: 1118.35; m/z , trovato 1141.34 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 1157.36 ($\text{M} + \text{K}^+$).

REAZIONE DI CICLOADDIZIONE 1,3-DIPOLARE PROMOSSA DA Cu(I)

SINTESI DEL DERIVATO DELL'ACIDO COLICO 4: 1.0 g di acido colico (2.4 mmol) è stato sciolto in 6 mL di CH₂Cl₂ anidro. DIPEA (640 µl, 3.7 mmol), DCC (760 mg, 3.7 mmol), HOBt (360 mg, 2.7 mmol) e propagilammina (185 µl, 2.7 mmol) sono stati aggiunti, nell'ordine, alla miscela che è stata lasciata sotto agitazione per 4 ore a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata, poi, concentrata a pressione ridotta, ridisciolta in CHCl₃ e trasferita in un imbuto separatore, quindi lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl. La fase organica è stata recuperata, anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata e concentrata. La purificazione è stata effettuata su colonna di gel di silice impaccata con CHCl₃ ed eluita con CHCl₃ contenente percentuali crescenti di CH₃OH, fino ad arrivare al 10% (v/v). Sono stati recuperati 1.0 g di prodotto **4** puro (2.2 mmol) corrispondenti ad una resa del 92%.

4: solido bianco, $R_f = 0.6$ [CHCl₃/CH₃OH, 85:5 (v/v)].



IR (KBr) ν_{\max} : 3306 (slargato), 1649, 1540, 1445, 1370, 1073, 1037, 754, 661 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 5.70 (segnale slargato, 1H, protone scambiabile, NH); 4.05 [segnale slargato, 2H, (CH₂-NH)]; 3.98, 3.86 e 3.47 [segnali slargati, 1H ognuno, 3x(CHOH)]; 2.23 (1H, H-alchino); 2.27-1.15 (segnali sovrapposti, 24H, CH₂ e CH del residuo di acido colico); 1.00, 0.92 e 0.71 (s, 3H ognuno, CH₃ del residuo di acido colico).

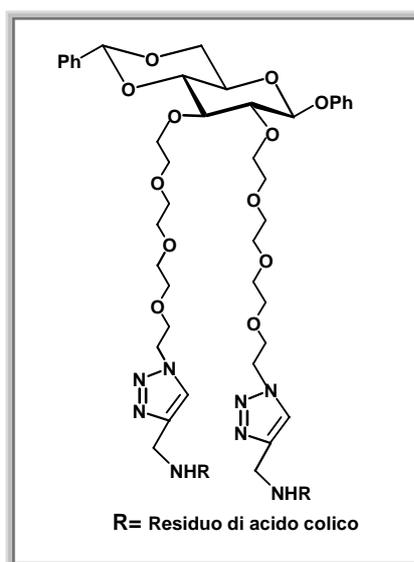
¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 174.0 (CO); 79.9 (C_{sp}); 71.7 (CH_{sp}); 73.0, 71.0 e 68.3 (CHOH); 46.2 (CH₂-NH); 41.4, 39.2, 35.2, 34.6, 32.6, 31.4, 30.2, 28.9, 27.5, 26.1 e 23.1 (CH₂ e CH del residuo di acido colico); 22.3, 17.3 e 12.3 (CH₃ del residuo di acido colico).

ESI-MS (ioni positivi): per C₂₇H₄₃NO₄, calcolato: 445.31; m/z , trovato 468.71 (M + Na⁺), 484.59 (M + K⁺).

SINTESI DEL DERIVATO 5: Il derivato **2** (84 mg, 0.11 mmol) e il derivato **4** (150 mg, 0.33 mmol) sono stati sciolti in DMF anidra (1.0 mL). DBU (165 µL, 1.1 mmol) e CuI (63 mg, 0.33 mmol) sono stati aggiunti alla miscela di reazione, lasciata sotto agitazione a

temperatura ambiente per 48 ore. La miscela di reazione è stata, poi, concentrata a pressione ridotta, ridisciolta in CHCl_3 e trasferita in un imbuto separatore, quindi lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl . La fase organica è stata recuperata, anidrificata su Na_2SO_4 anidro, filtrata e concentrata. La purificazione è stata effettuata su colonna di gel di silice impaccata con CHCl_3 ed eluita con CHCl_3 contenente percentuali crescenti di CH_3OH , fino ad arrivare al 10% (v/v). Sono stati recuperati 165 mg di prodotto **5** puro (0.10 mmol) corrispondenti ad una resa del 92%.

5: olio, $R_f = 0.6$ [$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 85:5 (v/v)].



IR (KBr) ν_{max} : 3366 (slargato), 1646, 1540, 1455, 1375, 1222, 1077, 1043, 756, 661 cm^{-1} .

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.00 (s, 2H, H-tetrazolo); 7.44-7.01 (segnali complessi, 10H, protoni aromatici); 5.57 [s, 1H, Ph-CH]; 5.02 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-1); 4.56 [segnale slargato, 2x(NH)]; 4.37 (m, 1H, H-4); 4.32-3.70 [segnali sovrapposti, 8H, (-CH₂-O-C-2), (-CH₂-O-C-3) e 2x(CH₂-NHCO)]; 3.63-3.40 [segnali sovrapposti, 35H, 12x(O-CH₂-TEG), 6x(CHOH del residuo di acido colico), H-3, H₂-6, H-2 e H-5]; 2.90 [segnale slargato, 4H, 2x(-CH₂-N-TEG)]; 2.40-1.20 (segnali sovrapposti, 48H, CH₂ e CH del residuo di acido colico); 0.85, 0.66 e 0.63 (s, 6H ognuno, CH₃ del residuo di acido colico).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 166.3 (CO); 157.2, 145.8, 137.3, 129.4, 128.8, 128.0, 126.0, 122.9, 117.1 (carboni aromatici); 101.9 (C-1); 101.2 (Ph-CH); 82.5 (C-2); 81.7 e 80.7 [2x(-CH₂-CH₂-O-zucchero)]; 72.4 e 72.3 [2x(-CH₂-O-Zucchero)]; 72.9, 71.8 e 68.2 (CHOH dell'acido colico); 70.5 [10x(O-CH₂-TEG)]; 68.8 (C-3); 68.6 (C-4); 66.2 (C-5); 62.8 (C-6); 54.4 (N-CH₂-TEG); 46.5 (CH₂-NHCO); 48.7, 41.6, 39.7, 37.9, 35.3, 34.7, 32.2, 31.4, 30.5, 28.9, 27.5, 26.7, 23.9, 23.2 e 22.4 (CH₂ e CH del residuo di acido colico); 19.5, 17.4 e 12.4 (CH₃ del residuo di acido colico).

MALDI-TOF (ioni positivi): per $C_{89}H_{136}N_8O_{20}$, calcolato: 1636.98; m/z , trovato 1637.48 ($M + H^+$), 1676.63 ($M + K^+$).

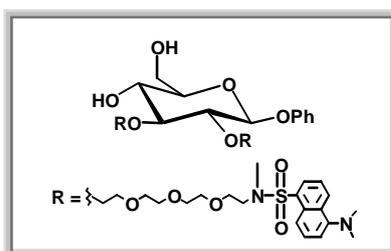
SINTESI DEL CYPLOS DIDANSILATO, 6

SINTESI DEI *BUILDING BLOCK* 9 E 10

DERIVATO 7: 170 mg di composto **3a** (0.15 mmol) sono stati sciolti in 1.3 mL di THF anidro e alla miscela sono stati aggiunti 18 mg di NaH (sospensione al 60% in olio minerale, 0.44 mmol), e dopo 10 min, 20 μ l di CH_3I (0.33 mmol). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 12 ore a temperatura ambiente ed è stata controllata mediante TLC utilizzando come sistema eluente $CHCl_3/CH_3OH$ 95:5 (v/v). La miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta ed è stata poi diluita con $CHCl_3$, versata in un imbuto separatore e lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl. La fase organica è stata filtrata, recuperata e anidrificata su sodio solfato anidro. Il prodotto desiderato è stato recuperato in forma pura con una resa pressoché quantitativa.

Il composto così ottenuto è stato trattato con 10 mL di una soluzione di TFA/ CH_2Cl_2 / H_2O 1:10:0.5 (v/v/v) ed è stato lasciato sotto agitazione magnetica a 0 °C. Dopo 4 ore la miscela di reazione è stata controllata mediante TLC utilizzando come sistema eluente $CHCl_3/CH_3OH$ 95:5 (v/v), successivamente è stata diluita con $CHCl_3$, versata in un imbuto separatore, lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl e seccata a pressione ridotta. La purificazione è stata effettuata su colonna di gel di silice impaccata con $CHCl_3$ ed eluita con $CHCl_3$ contenente percentuali crescenti di CH_3OH , fino ad arrivare al 5% (v/v). Sono stati recuperati 160 mg di prodotto desiderato **7** (0.15 mmol), in forma pura, corrispondente ad una resa quasi quantitativa.

7: olio giallo, $R_f = 0.3$ [$CHCl_3/CH_3OH$, 95:5 (v/v)].



IR (KBr) ν_{\max} : 3451 (slargato), 1589, 1574, 1452, 1324, 1229, 1142, 1070, 983, 933, 774, 695 cm^{-1} .

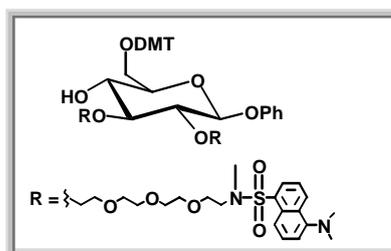
^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 8.52 [d, $J = 8.5$ Hz, 2x 1H, (H_2 -Dans)]; 8.33 [d, $J = 8.5$ Hz, 2x 1H, (H_8 -Dans)]; 8.14 [m, 2x 1H, (H_4 -Dans)]; 7.53 [m, 2x 2H, (H_3 -Dans) e (H_7 -Dans)]; 7.17 [d, $J = 7.5$ Hz, 2x 1H, (H_6 -Dans)]; 7.27-6.98 (segnale complesso, 5H, protoni fenilici); 4.95 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-1); 4.12 (m, 1H, H-4); 4.07-3.72 [segnali sovrapposti, 6H, ($-\text{CH}_2$ -O-C-2), ($-\text{CH}_2$ -O-C-3) e H₂-6]; 3.66-3.52 [segnali sovrapposti, 25H, 12x(O- CH_2 TEG) e H-3]; 3.44 [m, 4H, (N- CH_2 TEG)]; 3.41 (t, $J = 5.5$ e 5.5 Hz, 1H, H-5); 3.38 (m, 1H, H-2); 2.94 e 2.93 [singoletti, 3H ognuno, 2x($-\text{CH}_2$ -N CH_3 SO₂-)]; 2.87 [s, 12H, 4x(CH_3 -N-Dans)].

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 157.1, 151.7, 134.7, 130.1, 129.4, 127.8, 123.0, 119.7, 116.7 e 115.2 (carboni aromatici); 101.4 (C-1); 85.9 (C-2); 82.0 (C-5); 75.6 (C-3); 72.2 e 71.9 [2x(CH_2 -O-zucchero)]; 71.9, 70.5, 70.4 e 70.2 [12x(O- CH_2 -TEG)]; 62.8 (C-6); 60.1 (C-4); 49.2 [2x(N- CH_2 -TEG)]; 45.2 [4x(CH_3 -N-Dans)]; 35.7 [2x($-\text{CH}_2$ -N CH_3 SO₂-)].

MALDI-MS (ioni positivi): per $\text{C}_{54}\text{H}_{76}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{S}_2$, calcolato: 1100.4697; m/z , trovato 1101.14 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1123.27 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 1139.24 ($\text{M} + \text{K}^+$).

DERIVATO 8: 160 mg di composto **7** (0.15 mmol) sono stati sciolti in 2.0 ml di piridina anidra e alla miscela sono stati aggiunti 60 mg di DMTCl (18 mmol). La reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 12 ore a temperatura ambiente. Il controllo della reazione è stato effettuato tramite TLC utilizzando come sistema eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 95:5 (v/v). La miscela di reazione è stata trattata infine con CH_3OH e concentrata a pressione ridotta. La purificazione è stata effettuata su colonna di gel di silice impaccata con CH_2Cl_2 ed eluita con CH_2Cl_2 contenente percentuali crescenti di CH_3OH , fino ad arrivare al 5% (v/v). Sono stati recuperati 210 mg di prodotto desiderato pulito **8** (0.15 mmol), isolato con una resa pressoché quantitativa.

8: olio, $R_f = 0.8$ [$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 95:5 (v/v)].



IR (KBr) ν_{\max} : 1608, 1511, 1453, 1301, 1247, 1142, 1080, 1030, 820, 787, 700 cm^{-1} .

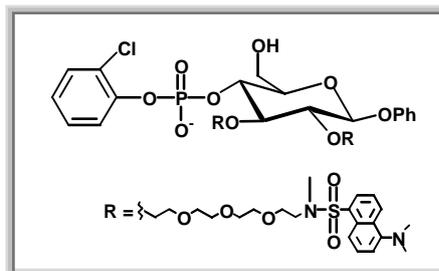
¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 8.52 [d, *J* = 8.5 Hz, 2x 1H, (H₂-*Dans*)]; 8.33 [d, *J* = 8.5 Hz, 2x 1H, (H₈-*Dans*)]; 8.14 [m, 2x 1H, (H₄-*Dans*)]; 7.52 [m, 2x 2H, (H₃-*Dans*) e (H₇-*Dans*)]; 7.49-6.71 [segnali complessi, 20H, protoni aromatici del DMT, protoni fenilici e 2x(H₆-*Dans*)]; 4.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-1); 4.13-3.71 [segnali sovrapposti, 5H, (-CH₂-O-C-2), (-CH₂-O-C-3) e H-4]; 3.74 [s, 6H, 2x(OCH₃ del gruppo DMT)]; 3.65-3.53 [segnali sovrapposti, 26H, 12x(O-CH₂-*TEG*) e H₂-6]; 3.47-3.42 [segnali sovrapposti, 6H, 2x(N-CH₂-*TEG*), H-3 e H-5]; 3.38 (t, 1H, H-2); 2.94 e 2.91 [singoletti slargati, 3H ognuno, 2x(-CH₂-NCH₃SO₂-)]; 2.87 [s, 12H, 4x(CH₃-N-*Dans*)].

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 158.2, 157.2, 151.6, 144.9, 139.4, 136.1, 134.4, 130.0, 129.3, 129.0, 128.2, 127.7, 126.9, 126.4, 123.0, 122.4, 119.6, 116.9, 115.1, 113.1 e 112.9 (carboni aromatici); 101.2 (C-1); 86.3 (carbonio quaternario del gruppo DMT); 85.8 (C-2); 82.1 (C-5); 75.3 (C-3); 72.3 e 71.9 [2x(CH₂-O-zucchero)]; 70.5, 70.4 e 69.9 [12x(O-CH₂-*TEG*) e, sovrapposto, C-4]; 63.4 (C-6); 55.1 (OCH₃ del gruppo DMT); 49.1 [2x(N-CH₂-*TEG*)]; 46.2 e 45.3 [4x(CH₃-N-*Dans*)]; 35.8 [2x(-CH₂-NCH₃SO₂-)].

ESI-MS (ioni positivi): per C₇₅H₉₄N₄O₁₈S₂, calcolato: 1402.60045; *m/z*, trovato 1425.66 (M + Na⁺), 1441.68 (M + K⁺).

DERIVATO 9: A 500 mg di derivato **8** (0.35 mmol, 1 equivalente) sciolto in 9.0 mL di Piridina anidra sono stati aggiunti 193 mg di 1,2,4-triazolo (2.80 mmol, 8 equivalenti), 390 μL di TEA (2.80 mmol, 8 equivalenti) e 228 μL di 2-clorofenil-diclorofosfato (1.40 mmol, 4 equivalenti) in sequenza; quest'ultima aggiunta è stata effettuata a 0 °C. La miscela di reazione è stata tenuta sotto agitazione magnetica per 3 ore a temperatura ambiente. Il controllo della reazione è stato effettuato mediante TLC, utilizzando come sistema eluente CHCl₃/CH₃OH, 98:2 (v/v). La miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta, ridisciolta in CHCl₃, trasferita in un imbuto separatore e lavata due volte con una soluzione acquosa satura di NaCl. La fase organica è stata anidrificata con sodio solfato anidro, filtrata e seccata a pressione ridotta. La purificazione è stata effettuata su colonna di gel di silice, impaccata con CH₂Cl₂ contenente 0.01% di TFA, ed eluita con CH₂Cl₂ contenente quantità crescenti di CH₃OH fino al 10%. Sono stati recuperati 395 mg di prodotto detritilato **9** (0.30 mmol) corrispondente ad una resa dell'86%.

9: olio, *R_f* = 0.3 [CHCl₃/CH₃OH, 98:2 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 8.51 [d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2x(H_2 -Dans)]; 8.31 [d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2x(H_8 -Dans)]; 8.12 [d, $J = 7.5$ Hz, 2H, 2x(H_4 -Dans)]; 7.49 [m, 4H, 2x(H_3 -Dans) e 2x(H_7 -Dans)]; 7.30-6.90 [segnali complessi, 11H, protoni fenilici e 2x(H_6 -Dans)]; 4.78 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-1); 4.48 (m, 1H, H-4); 4.00 [m, 2H, (CH_2 -O-Zucchero)]; 3.91 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, H-6_a); 3.75-3.68 [segnali sovrapposti, 3H, (CH_2 -O-zucchero) e H-6_b]; 3.64-3.38 [segnali sovrapposti, 30H, H-3, H-2 e (O- CH_2 - CH_2 -O-TEG)]; 3.30 (m, 1H, H-5); 2.90 [s, 6H, 2x(- CH_2 -N CH_3 SO₂)]; 2.86 e 2.81 [s, 12H, 4x(CH_3 -N-Dans)].

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 157.3, 151.6, 149.5, 134.3, 130.5, 130.1, 130.0, 129.8, 129.7, 129.4, 129.2, 128.6, 127.9, 127.1, 125.4, 123.4, 123.0, 122.3, 122.1, 119.5, 118.9, 116.8 e 115.0 (carboni aromatici); 101.5 (C-1); 85.1 (C-2); 82.0 (C-3); 76.0 (C-5); 72.6 (C-4); 71.5 e 70.9 [2x(CH_2 -O-Zucchero)]; 70.3, 70.2, 70.1, 69.7 e 69.2 [(O- CH_2 - CH_2 -O-TEG)]; 61.0 (C-6); 49.2 e 49.0 [2x (N- CH_2 -TEG)]; 46.1 e 45.3 [4x(CH_3 -N-Dans)]; 35.7 [2x(- CH_2 -N CH_3 SO₂)].

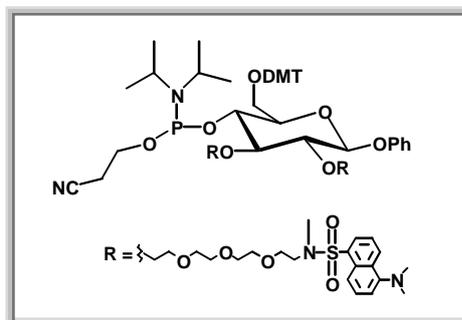
^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz): δ -6.8.

HRMS (Maldi-TOF): m/z : per $\text{C}_{60}\text{H}_{80}\text{ClN}_4\text{O}_{19}\text{PS}_2$: calcolato: 1290.4284; trovato: 1289.3460 (M-H)⁻.

DERIVATO 10: Il derivato **8** (200 mg, 0.14 mmol) è stato anidrificato mediante ripetute coevaporate con benzene anidro e sciolto in 2 mL di CH_2Cl_2 anidro. Sono stati aggiunti 145 μL di DIPEA (0.84 mmol) e 100 μL di 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilamminoclorofosforammidito, in sequenza. La reazione è stata condotta in presenza di setacci molecolari attivati di porosità 3 Å. Tutte le operazioni sono state effettuate sotto flusso di N_2 anidro. La reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente e controllata mediante TLC utilizzando come sistema eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 99:1 (v/v). Dopo 2 ore la reazione è stata interrotta e la miscela è stata concentrata a pressione ridotta. Il grezzo così ottenuto è stato direttamente purificato su colonna di gel di silice eluita con un gradiente dal 30 al 50% di AcOEt in *n*-esano, contenente alcune gocce di TEA. Sono

stati recuperati 200 mg di prodotto puro **10** (0.12 mmol), corrispondente ad una resa dell'86%.

10: olio, miscela di diastereoisomeri, $R_f = 0.5$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 99:1 (v/v)].



IR (KBr) ν_{max} : 2252, 1606, 1507, 1457, 1324, 1217, 1138, 1027, 973, 765 cm^{-1} .

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.52 [d, $J = 8.5$ Hz, 4H, 4x(H_2 -*Dans*)]; 8.33 [d, $J = 8.5$ Hz, 4H, 4x(H_8 -*Dans*)]; 8.13 [d, $J = 7.5$ Hz, 4H, 4x(H_4 -*Dans*)]; 7.51 [m, 8H, 4x(H_3 -*Dans*) e 4x(H_7 -*Dans*)]; 7.44-6.69 [segnali complessi, 40H, protoni aromatici del DMT, protoni fenilici e 4x(H_6 -*Dans*)]; 4.97 [m, 2H, 2x(H-1)]; 4.32-3.85 [segnali sovrapposti, 16H, 2x(-O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ -CN), 4x(- $\underline{\text{CH}}_2$ -O-zucchero), 2x(H-6_a), 2x(H-4)]; 3.79 [s, 12H, 4x(OCH₃ del gruppo DMT)]; 3.76-3.37 {segnali sovrapposti, 68H, 2x(H-6_b), 2x(H-3), 12x(O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ -O-*TEG*), 2x(H-2), 2x(H-5) e 2xN[$\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$]}; 2.93 [s, 12H, 4x(- $\underline{\text{CH}}_2$ -N $\underline{\text{CH}}_3$ SO₂)]; 2.86 [s, 24H, 8x($\underline{\text{CH}}_3$ -N-*Dans*)]; 2.73 [t, 4H, 2x(-O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ -CN)]; 1.28, 1.27, 1.26, 1.25, 1.22, 1.20, 0.98 e 0.96 {singoletti slargati, 3H ognuno, 24H, 2xN[$\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$]}.

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 158.2, 151.6, 145.0, 139.4, 134.4, 130.1, 129.3, 129.0, 128.2, 127.8, 127.7, 126.5, 123.0, 119.6, 116.8, 115.1, 113.1, 112.9 e 112.1 (carboni aromatici); 116.8 (CN); 101.0 (C-1); 85.8 (C quaternario del gruppo DMT); 84.0 e 82.4 (C-2 e C-5); 75.3 (C-3); 72.3 e 71.9 [2x($\underline{\text{CH}}_2$ -O-Zucchero)]; 70.4, 70.3 e 69.8 [(O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ -O-*TEG*) e, sovrapposto, C-4]; 63.7 e 63.5 (C-6); 58.0 (-O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ -CN); 55.0 (OCH₃ del gruppo DMT); 49.1 [2x (N- $\underline{\text{CH}}_2$ -*TEG*)]; 46.7 [4x($\underline{\text{CH}}_3$ -N-*Dans*)]; 42.9 {N[$\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$]}; 35.7 [2x(- $\underline{\text{CH}}_2$ -N $\underline{\text{CH}}_3$ SO₂)]; 24.3 e 22.2 {N[$\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$]}; 19.9 e 19.1 (-O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ -CN).

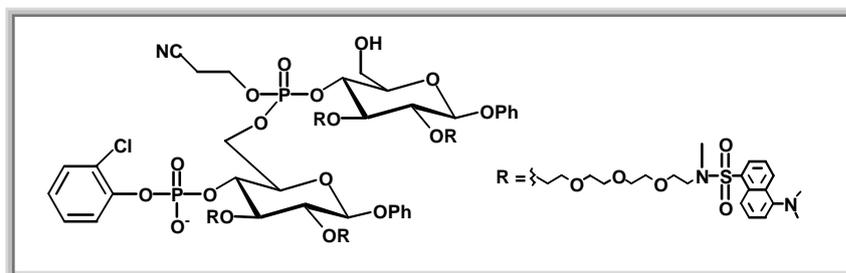
^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz): δ 151.0 e 150.4.

ESI-MS (ioni positivi): per $\text{C}_{84}\text{H}_{111}\text{N}_6\text{O}_{19}\text{PS}_2$, calcolato: 1602.7083; m/z , trovato 1605.02 ($\text{M} + \text{H}^+$), 1705.12 ($\text{M} + \text{Et}_3\text{NH}^+$).

SINTESI DEL DIMERO LINEARE 11.

150 mg (0.12 mmol, 1 equivalente) di prodotto **9** e 228 mg (0.14 mmol, 1.2 equivalenti) di prodotto **10** sono stati uniti, seccati a pressione ridotta e anidrificati mediante ripetute coevaporate con CH₃CN anidro. Successivamente il residuo è stato sciolto in 5.0 mL di CH₃CN anidro in presenza di setacci molecolari attivati 3 Å, con aggiunta di una soluzione 0.25 M di DCI precedentemente anidrificata su setacci molecolari attivati. La reazione è stata tenuta sotto agitazione magnetica per 2 ore a temperatura ambiente. Il controllo della reazione è stato effettuato mediante TLC utilizzando come sistema eluente la miscela CHCl₃/CH₃OH 96:4 (v/v). Dopo due ore sono stati aggiunti 0.3 mL di una soluzione 5.5 M *t*-BuOOH in *n*-decano, e la reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente. Dopo 30 min la miscela di reazione è stata concentrata, ridisciolta in CHCl₃, versata in un imbuto separatore e lavata due volte con una soluzione acquosa satura di NaCl. La fase organica è stata anidrificata su sodio solfato anidro, filtrata e concentrata. La purificazione è stata effettuata mediante cromatografia su colonna di gel di silice impaccata con CH₂Cl₂ con aggiunta di TEA all'1%, eluendo con CH₂Cl₂ contenente quantità di CH₃OH crescenti, fino ad arrivare al 10% in volume. Il prodotto ottenuto è stato messo a reagire con 1 mL di TCA all'1% in CH₂Cl₂ per 30 min a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata seccata sotto vuoto e poi purificata su colonna di gel di silice impaccata con CH₂Cl₂/CH₃OH 98:2 (v/v) ed eluita con CH₂Cl₂ contenente percentuali crescenti di CH₃OH, fino ad arrivare al 10% in volume. Sono stati recuperati 218 mg di prodotto pulito **11** (0.087 mmol), corrispondenti ad una resa del 72%.

11: olio, $R_f = 0.5$ [CHCl₃/CH₃OH, 98:2 (v/v)].



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.52 [d, $J = 8.5$ Hz, 4H, 4x(H₂-Dans)]; 8.33 [d, $J = 8.5$ Hz, 4H, 4x(H₈-Dans)]; 8.13 [m, 4H, 4x(H₄-Dans)]; 7.50 [m, 8H 4x(H₃-Dans) e 4x(H₇-Dans)]; 7.24-6.90 [segnali complessi, 18H, protoni fenilici e 4x(H₆-Dans)]; 4.89 e 4.80 (multipletti, 1H ognuno, H-1 e H-1'); 4.23 [t, 2H, (O-CH₂-CH₂-CN)]; 4.10-3.09 [segnali sovrapposti, 74H,

(H₂-6-O-P), 2x(H-4), 2x(H-3) e 2x(H-5), 32x(O-CH₂ TEG) e (H₂-6-OH)]; 3.40 e 3.38 [segnali sovrapposti, 2H, 2x(H-2)]; 2.91 [s, 12H, 4x(-CH₂-NCH₃SO₂)]; 2.85 [s, 24H, 8x(CH₃-N-Dans)]; 2.49-2.37 [m, 2H, (O-CH₂-CH₂-CN)].

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 165.1, 156.9, 151.6, 144.9, 134.4, 134.2, 130.8, 130.2, 130.0, 129.4, 128.7, 127.9, 123.0, 122.6, 121.6, 119.5, 116.6, 116.4, e 115.1 (carboni aromatici); 116.1 (CN); 100.6 e 100.2 [2x(C-1)]; 84.2 e 84.0 [2x(C-2)]; 81.7 e 81.6 [2x (C-5)]; 75.3 [2x(C-3)]; 74.0 e 73.8 [4x(CH₂-O-Zucchero)]; 71.7, 70.2, 69.5 e 69.2 [28x(O-CH₂-TEG) e, sovrapposti, 2x(C-4)]; 68.0 (C-6-O-P); 62.5 (C-6-OH); 60.3 (-O-CH₂-CH₂-CN); 49.1 [4x(N-CH₂-TEG)]; 45.5 e 45.3 [8x(CH₃-N-Dans)]; 35.6 [4x(-CH₂-NCH₃SO₂)]; 29.6 (-O-CH₂-CH₂-CN).

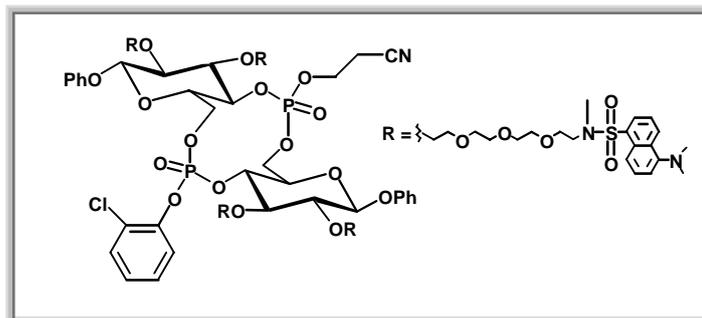
³¹P NMR (CDCl₃, 161.98 MHz): segnali slargati centrati a δ -3.1 e -7.4.

MALDI-TOF, (ioni negativi): m/z: per C₁₁₇H₁₅₈ClN₉O₃₇P₂S₄: calcolato: 2505.8805 trovato: 2503.20 (M-H)⁻.

SINTESI DEL DIMERO CICLICO 6.

DERIVATO 12: 30 mg del prodotto **11** (0.012 mmol, 1 equivalenti), preventivamente coevaporati con piridina anidra sono stati sciolti in 12 mL di piridina anidra e tenuti in presenza di setacci molecolari 3 Å. Alla miscela sono stati poi aggiunti 3.0 mg di DMAP (0.024 mmol, 2 equivalenti) e 106 mg di MSNT (0.36 mmol, 30 equivalenti) in sequenza. La reazione è stata tenuta sotto agitazione magnetica per 48 ore a temperatura ambiente e il controllo è stato effettuato mediante TLC utilizzando come sistema eluente CHCl₃/CH₃OH, 95:5 (v/v). La miscela di reazione è stata diluita con CHCl₃, versata in un imbuto separatore e lavata due volte con una soluzione acquosa satura di NH₄Cl. La fase organica è stata anidrificata con sodio solfato anidro, filtrata e purificata su colonna di gel di silice impaccata con CHCl₃ ed eluita con CHCl₃ contenente volumi crescenti di CH₃OH, fino ad arrivare al 15%. Sono stati recuperati 22 mg di prodotto pulito **12** (0.009 mmol), corrispondenti ad una resa del 75%.

12: olio, R_f = 0.5 [CHCl₃/CH₃OH, 95:5 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.59 [d, $J = 8.0$ Hz, 4H, 4x(H_2 -Dans)]; 8.37 [d, $J = 8.0$ Hz, 4H, 4x(H_8 -Dans)]; 8.13 [m, 4H, 4x(H_4 -Dans)]; 7.53 [m, 8H, 4x(H_3 -Dans) e 4x(H_7 -Dans)]; 7.28-6.84 [segnali complessi, 18H, protoni fenilici e 4x(H_6 -Dans)]; 5.06 e 4.86 (multipletti, 1H ognuno, H-1 e H-1'); 4.34 [segnali sovrapposti, 8H, 4x(CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ -O-Zucchero)]; 4.07 [t, 2H, (O- $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 -CN)]; 3.97-3.39 [segnali sovrapposti, 72H, (H_2 -6-O-P), 2x(H-4), 2x(H-3), 2x(H-5), 28x(O- $\underline{\text{CH}_2}$ -TEG) e (H_2 -6-OH)]; 3.37 e 3.28 [segnali sovrapposti, 2H, 2x(H-2)]; 2.99 [s, 12H, 4x(- CH_2 -N $\underline{\text{CH}_3}$ SO $_2$)]; 2.92 [s, 24H, 8x(CH_3 -N-Dans)]; 2.40-2.34 (m, 2H, O- $\underline{\text{CH}_2}$ - $\underline{\text{CH}_2}$ -CN).

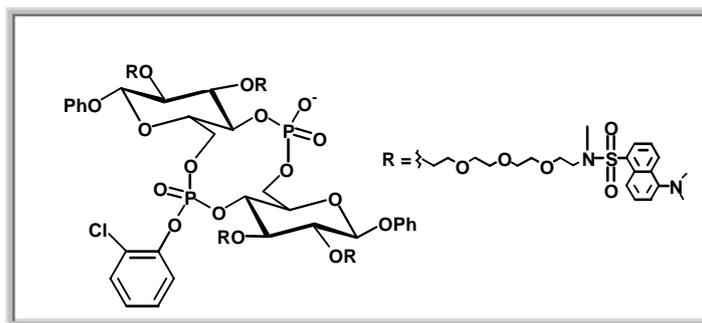
^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 165.0, 158.1, 157.0, 156.9, 151.5, 149.4, 144.6, 135.7, 135.6, 134.2, 130.1, 130.0, 129.9, 129.4, 129.2, 129.0, 127.9, 127.7, 127.6, 127.4, 126.5, 123.1, 122.9, 122.5, 121.5, 119.5, 119.4, 116.7 e 115.0 (carboni aromatici); 116.1 e 116.0 (CN); 100.6 e 100.3 [2x(C-1)]; 85.9 e 85.7 [2x(C-2)]; 81.9 e 81.2 [2x(C-5)]; 73.8 [2x(C-3)]; 72.0 e 71.9 [4x($\underline{\text{CH}_2}$ -O-Zucchero)]; 70.2 e 69.7 [28x(O- $\underline{\text{CH}_2}$ -TEG) e, sovrapposti, 2x(C-4)]; 62.6 (C-6); 60.3 (-O- $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 -CN); 48.9 [2x(N- $\underline{\text{CH}_2}$ -TEG)]; 45.8, 45.7, 45.6, 45.4, 45.3 e 45.2 [4x(CH_3 -N-Dans)]; 35.7 e 35.6 [2x(- CH_2 -N $\underline{\text{CH}_3}$ SO $_2$)]; 22.9 (-O- $\underline{\text{CH}_2}$ - $\underline{\text{CH}_2}$ -CN).

^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz): δ -2.1, -5.0, -9.5 e -10.6.

MALDI-TOF, (ioni positivi): m/z : per $\text{C}_{117}\text{H}_{156}\text{ClN}_9\text{O}_{36}\text{P}_2\text{S}_4$: calcolato: 2487.8700 trovato: 2487.15 ($\text{M}+\text{H}^+$), 2509.06 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

DERIVATO 13: 22 mg di prodotto **12** (0.009 mmol) sono stati trattati con 1 mL di piperidina. La reazione è stata tenuta per 12 ore a 70 °C. Il controllo della reazione è stato effettuato tramite TLC usando come sistema eluente una miscela $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 95:5 (v/v). La reazione è stata seccata sotto vuoto e la purificazione è stata effettuata su colonna di gel di silice impaccata con CHCl_3 ed eluita con CHCl_3 contenente volumi crescenti di CH_3OH , fino ad arrivare al 15%. Sono stati recuperati 21 mg del prodotto pulito **13** (0.0086 mmol), corrispondenti ad una resa del 96%.

13: olio giallo, $R_f = 0.3$ [$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 95:5 (v/v)].



^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.52 [d, $J = 8.0$ Hz, 4H, 4x(H₂-Dans)]; 8.33 [d, $J = 8.0$ Hz, 4H, 4x(H₈-Dans)]; 8.11 [m, 4H, 4x(H₄-Dans)]; 7.49 [m, 8H, 4x(H₃-Dans) e 4x(H₇-Dans)]; 7.30-6.87 [segnali complessi, 18H, protoni fenilici e 4x(H₆-Dans)]; 5.16 e 4.90 (multipletti, 1H ognuno, H-1 e H-1'); 4.40-3.35 [segnali sovrapposti, 76H, 2x(H₂-6), 2x(H-4), (O-CH₂-CH₂-O-TEG), 2x(H-2), 2x(H-3) e 2x(H-5)]; 2.98 [s, 12H, 4x(-CH₂-NCH₃SO₂-)]; 2.86 [s, 24H, 8x(CH₃-N-Dans)].

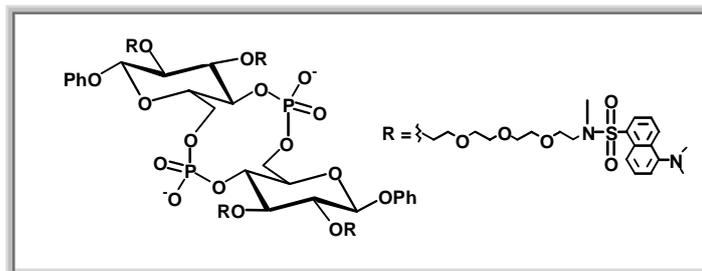
^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 165.1, 158.0, 153.9, 142.4, 139.1, 134.9, 130.5, 129.4, 128.2, 124.8, 123.1, 122.6, 119.6, 117.2 e 115.1 (carboni aromatici); 101.4 e 101.1 (C-1 e C-1'); 84.7 (C-5 e C-5'); 75.9 (C-4 e C-4'); 71.9, 70.3 e 69.8 (O-CH₂-CH₂-O TEG); 61.6 (C-6); 49.0 [2x(N-CH₂-TEG)]; 45.3 e 45.2 [4x(CH₃-N-Dans)]; 35.8 e 35.6 [2x(-CH₂-NCH₃SO₂-)].

^{31}P NMR (CDCl₃, 161.98 MHz): due segnali slargati centrati a δ 0.7 e -8.6.

MALDI (ioni negativi): m/z : per C₁₁₄H₁₅₃ClN₈O₃₆P₂S₄: calcolato: 2434.8434; trovato: 2434.38 (M-H)⁻.

DERIVATO 6: 21 mg di prodotto **13** (0.0086 mmol) sono stati sciolti in 220 μL di diossano e trattati con 1 mL di una soluzione acquosa saturata di LiOH. La reazione è stata tenuta per 12 ore a 70 °C. Il controllo è stato effettuato tramite TLC, usando come sistema eluente una miscela CHCl₃/CH₃OH, 9:1 (v/v). La miscela di reazione è stata seccata sotto vuoto ed il grezzo è stato, poi, diluito con CHCl₃, versato in un imbuto separatore e lavato due volte con una soluzione acquosa saturata di NaCl. La fase organica è stata anidrificata con sodio solfato anidro, filtrata e purificata su colonna di gel di silice impaccata con CH₂Cl₂ ed eluita con CH₂Cl₂ contenente volumi crescenti di CH₃OH, fino ad arrivare al 15%. Sono stati recuperati 20 mg del prodotto pulito **6** (0.0086 mmol), corrispondente ad una resa quasi quantitativa.

6: olio, $R_f = 0.5$ [CHCl₃/CH₃OH, 9:1 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 8.78 [segnale slargato, 4H, 4x(H_2 -Dans)]; 8.19 [slargato, 4H, 4x(H_8 -Dans)]; 8.04 [slargato, 4H, 4x(H_4 -Dans)]; 7.69 [slargato, 8H, 4x(H_3 -Dans) e 4x(H_7 -Dans)]; 7.52 [slargato, 4H, 4x(H_6 -Dans)]; 7.34-6.90 [segnali complessi, 10H, protoni fenilici]; 5.36-4.92 (m, 2H, H-1 e H-1'); 4.40-3.37 [segnali sovrapposti, 74H, 2x(H_2 -6), 2x(H-4), (O- CH_2 - CH_2 -O TEG), 2x(H-2) e 2x(H-3)]; 3.11 [m, 2H, 2x(H-5)]; 2.97 [s, 12H, 4x(- CH_2 - NCH_3SO_2)]; 2.93 [s, 24H, 8x(CH_3 -N-Dans)].

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 165.1, 158.0, 153.9, 142.4, 139.1, 134.9, 130.5, 129.4, 128.2, 124.8, 123.1, 122.6, 119.6, 117.2 e 115.1 (carboni aromatici); 101.4 e 101.1 (C-1 e C-1'); 84.7 (C-5 e C-5'); 75.9 (C-4 e C-4'); 71.9, 70.3 e 69.8 (O- CH_2 - CH_2 -O-TEG); 61.6 (C-6); 49.0 [2x(N- CH_2 TEG)]; 45.3 e 45.2 [4x(CH_3 -N-Dans)]; 35.8 e 35.6 [2x(- CH_2 - NCH_3SO_2)].

^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz, 3 mM): segnale molto slargato, centrato a δ 1.3.

^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz, 0.09 mM): segnale *sharp* a δ 1.5.

MALDI-TOF, (ioni negativi): m/z : calcolato per $\text{C}_{108}\text{H}_{150}\text{N}_8\text{O}_{36}\text{P}_2\text{S}_4$: 2324.851; trovato: 2323.12 (M-H) $^-$; 1160.8435 (M-2H) $^{2-}$.

CAPITOLO III

ETERI CORONA NELLA SINTESI DI IONOFORI ARTIFICIALI

1.0 PROPRIETÀ DEGLI ETERI CORONA

Gli eteri corona sono una famiglia di polieterei ciclici, formalmente derivati dal glicole etilenico, in cui l'unità strutturale ripetitiva è il gruppo $[-OCH_2CH_2-]$. Il loro nome deriva dal fatto che, nella conformazione più stabile, assumono la forma di una corona (*Figura 1*).

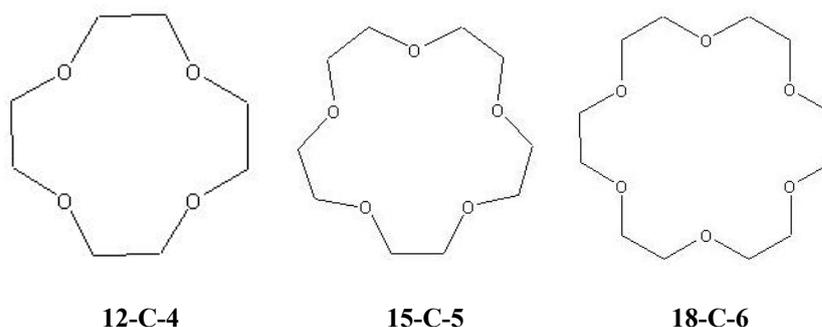


Figura 1 – Esempi di eteri corona

Una importante caratteristica strutturale degli eteri corona è che il diametro della cavità creata dagli atomi di ossigeno presenti nel ciclo è paragonabile al diametro degli ioni di metalli alcalini. La cavità di un etere corona è polare e le coppie di elettroni non condivisi degli atomi di ossigeno rivolti all'interno della cavità sono in grado di coordinare efficacemente gli ioni dei metalli alcalini. La superficie esterna dell'etere corona, invece, è apolare. Da ciò deriva l'elevata solubilità di questi composti e dei loro complessi in solventi organici apolari o poco polari.

Comunemente i cationi metallici formano, con il macrociclo, complessi stabilizzati da forze coulombiane che si instaurano tra il catione e le estremità negative dei dipoli C-O. In genere un complesso di stechiometria 1:1 tra ione alcalino e macrociclo è più stabile quando il diametro del catione è paragonabile alle dimensioni della cavità dell'etere corona, altrimenti

la stabilità diminuisce⁴⁶. Essa dipende, inoltre, dalla densità di carica del catione e dalla capacità di solvatazione del solvente. Questo spiega la diversa selettività degli eteri corona nei confronti di vari cationi di metalli alcalini o alcalino-terrosi (*Tabella 1*)⁴⁷.

Etere Corona	Diametro Cavità (Å)	Catione	Diametro Catione (Å)
12C4	1.2	Li ⁺	1.20
		Na ⁺	1.90
15C5	1.72-1.84	Ca ²⁺	1.98
		Sr ²⁺	2.20
		K ⁺	2.66
18C6	2.67-2.86	Rb ⁺	2.96
		Ba ²⁺	2.70
		Cs ⁺	3.34
21C7	3.4-4.3	Cs ⁺	3.34

Tabella 1 – Dimensioni delle cavità degli eteri corona in relazione alle dimensioni dei cationi

Il [18]-crown-[6] ha maggiore affinità per K⁺, il [15]-crown-[5] lega preferenzialmente Na⁺, mentre il più piccolo [12]-crown-[4] riesce a chelare efficacemente solo lo ione Li⁺. L'elevata affinità degli eteri corona nei confronti di cationi di interesse biologico spiega anche il grande interesse ad essi rivolto nell'ambito della sintesi di ionofori artificiali. In un modello di *carrier* semplificato, l'etere corona può complessare il catione ad un'interfaccia membrana-acqua, trasportarlo attraverso la membrana sotto forma di complesso "host-guest" apolare per poi rilasciarlo all'interfaccia opposta membrana-acqua.

⁴⁶ a) Pedersen, C.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2495-2496. b) Pedersen, C.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017-7036. c) Pedersen, C.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 386-391.

⁴⁷ a) Hiraoka, M. *Crown Compounds: Their Characteristics and Application*. Kodansha, Tokyo, **1982**. b) Vögtle, F. *Host-Guest Complex Chemistry II*. Springer-Verlag, Berlin, **1982**.

1.1 IONOFORI ARTIFICIALI CONTENENTI ETERI CORONA O CICLODESTRINE: UNA BREVE RASSEGNA

Requisito primario di uno ionoforo sintetico è la capacità di attraversare il doppio strato fosfolipidico delle membrane. Pertanto, la progettazione di nuove molecole adatte al trasporto di ioni è rivolta alla sintesi di unità semi-canale, o di canali ionici unimolecolari che attraversano completamente la membrana⁴⁸.

Gli elementi “semi-canale” rivestono metà dello spessore della membrana. Le molecole soggiornano in uno o nell’altro dei due strati che compongono il doppio strato fosfolipidico e, quando si allineano, possono formare un poro attraverso la membrana. L’approccio però che più da vicino mima i pori transmembrana formati da proteine è quello basato sull’uso di una singola struttura larga quanto la membrana. In genere, un tale modello deve attraversare almeno la regione isolante del doppio strato, larga circa 30-35 Å⁴⁹. Nelle membrane, tra lo strato isolante e le teste polari esposte al mezzo acquoso, è presente una regione di polarità intermedia, costituita da gliceril esteri, che sembra coinvolta nelle interazioni con le proteine canale.

Numerosi sono i lavori recentemente apparsi in letteratura in cui sono descritte sintesi ed applicazioni di recettori sintetici in grado di veicolare cationi. In questo ambito, sia gli eteri corona, sia le ciclodestrine sono stati individuati come motivi strutturali particolarmente utili alla costruzione di nuovi ed efficaci ionofori artificiali.

Un tipo di canale sintetico in cui sono coinvolti eteri corona inseriti su uno scheletro peptidico è stato progettato da Voyer e Robitaille⁵⁰, i quali hanno usato più unità di etere corona per formare un tunnel adatto al passaggio di cationi attraverso la membrana (*Figura 2*). Il canale modello sintetizzato da questo gruppo di ricerca prevede residui di benzo-[21]-crown-[7] legati ad una catena polipeptidica strutturata in α -elica. I macrocicli sono posizionati su lati opposti della catena ogni quattro residui, ma l’arrangiamento ad elica dello scheletro peptidico fa sì che questi siano orientati su piani paralleli ed impilati, così da ottenere una struttura tubolare. Nonostante l’attento *design*, queste molecole hanno, però, mostrato una scarsa selettività nel trasporto di cationi quali litio, sodio, potassio e rubidio, probabilmente a causa delle grandi dimensioni dei macrocicli impiegati.

⁴⁸ Gokel, G.W.; Murillo, O. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 425-432.

⁴⁹ Wiener, M. C.; White, S.H. *Biophys. J.* **1992**, *61*, 434-447.

⁵⁰ Voyer, N.; Robitaille, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6599-6600.

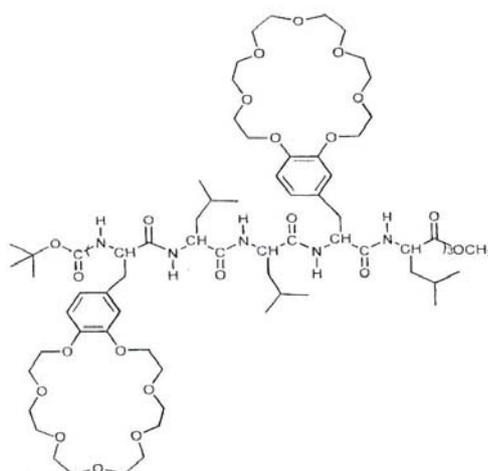


Figura 2 – Canale sintetico progettato da Voyer e Robitaille

Lehn e Jullien⁵¹, invece, hanno sintetizzato un composto contenente come *core* centrale una unità di tetracarbossi-[18]-crown-[6] in cui i quattro gruppi carbossilici sono usati per ancorare, attraverso legami ammidici, delle ramificazioni che si irradiano dall'etere corona in modo da generare una struttura dendrimerica (*Figura 3*).

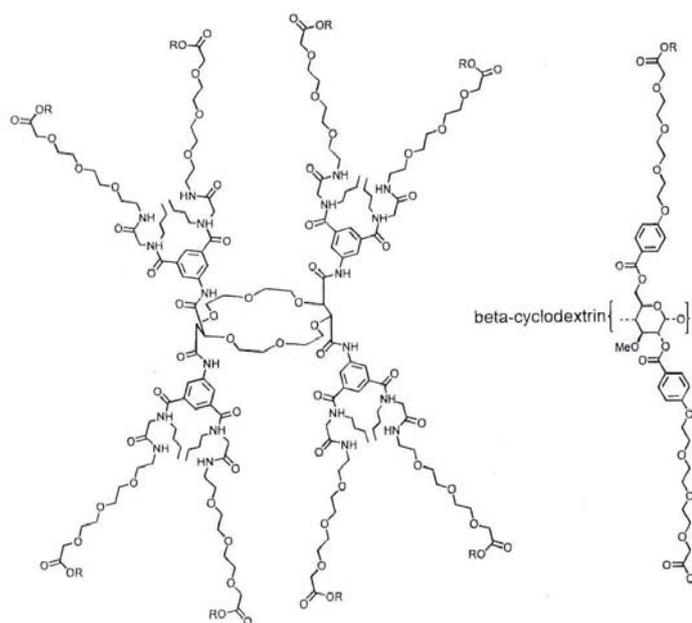


Figura 3 – Canale ionico progettato da Lehn e Jullien

Non è stato riscontrato, però, per tali molecole, un significativo trasporto di cationi.

⁵¹ Jullien, L.; Lehn, J. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3803 – 3806.

In un lavoro successivo⁵², lo stesso gruppo di ricerca ha realizzato una struttura simile in cui l'unità di etere corona centrale è stata sostituita con una β -ciclodestrina. In questo caso, catene polietileniche o polialchiliche che terminano con gruppi carbossilici sono stati legati alla β -ciclodestrina. Il diametro della cavità interna è largo abbastanza da permettere il passaggio di ioni metallici così come di piccole molecole organiche (*Figura 3*).

Altri interessanti esempi di ionofori artificiali sono stati descritti dal gruppo di Gokel⁵³, basati su una struttura macrociclica centrale più flessibile, il diaza-[18]-crown-[6]. Questo etere corona mostra la consueta elevata affinità verso i cationi, associata al vantaggio che gli atomi di azoto presenti nel macrociclo possono essere sfruttati per legare uno o più elementi di connessione con altri residui. Della serie di molecole sintetizzate, quella risultata più attiva è rappresentata in *Figura 4*.

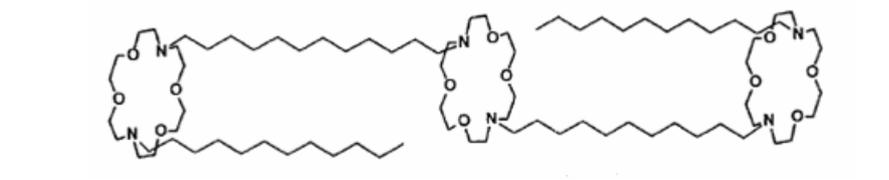


Figura 4 – Ionoforo proposta da Gokel

Tale molecola presenta tre anelli macrociclici connessi da catene alchiliche di 12 atomi di carbonio. Le due catene di connessione fra questi elementi e i tre macrocicli conferiscono al composto, che in una conformazione estesa è lungo 25-30 Å, la capacità di rivestire l'intero spessore del doppio strato lipidico della membrana, mentre le catene flessibili di 12 atomi di carbonio si insinuano nella membrana per garantire un passaggio aperto attraverso il doppio strato. Sostituendo la catena alchilica con una catena di polietilenglicole, è stata osservata una significativa diminuzione del flusso di protoni.

E' logico supporre che un ligando dotato di un maggior numero di gruppi donatori sia in grado di complessare più fortemente il catione. Questa caratteristica è generalmente desiderabile nella chimica di complessazione, tuttavia la dinamica del canale cationico richiede legami selettivi, ma deboli, per favorire un trasporto più veloce. Il [18]-crown-[6] è un ligando selettivo per il sodio e il potassio in acqua. La costante di affinità ($K_{\text{complessazione}}$) per il Na^+ è $\sim 2.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, mentre quella per il K^+ è $\sim 4.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

⁵² Jullien, L.; Lehn, J. M. *J. Inclusion Phenom.* **1992**, *12*, 55 – 74.

⁵³ a) Murillo, O.; Watanabe, S.; Nakano, A.; Gokel, G.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 7665- 7679. b) Gokel, G. W., *Chem. Commun.*, **2000**, 1. c) Gokel, G. W.; Murillo, O., *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 425-432.

L'efficacia di trasporto di questi macrocicli nei confronti dei cationi è regolata non solo dalla capacità di legame ($K_{\text{complessazione}}$), ma anche dalle rispettive velocità di rilascio dei cationi stessi. Per il potassio la costante cinetica è di $3.4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, mentre per il sodio è di $3.7 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. Pertanto il sodio è rilasciato più velocemente poiché è complessato meno fortemente del potassio. Il trasporto di sodio nelle vescicole fosfolipidiche è stato studiato usando spettroscopia ^{23}Na NMR.

Si è visto che sostituendo il diaza-[18]-crown-[6] con aza-[18]-crown-[6], e quindi rimuovendo una catena alchilica, tutta l'abilità di trasporto è persa. Viceversa, in seguito a sostituzione delle catene di N-dodecil con gruppi N-benzilici, il flusso di cationi aumenta dal 28 al 39 %. Inoltre, è stato osservato che riducendo le dimensioni dell'etere corona centrale, o rimuovendo completamente questo motivo strutturale, non è compromessa la funzione di trasporto di ioni.

Da questi studi di relazioni struttura-attività per tali molecole si può ipotizzare, per le unità di etere corona, un ruolo sia nell'ancorare lo ionoforo al confine tra la regione polare e quella apolare della membrana, sia come porta d'ingresso dei cationi che vengono a contatto con la superficie più esterna della membrana.

2.0 PROGETTAZIONE E SINTESI DEL CROWN-CYPLOS

Nell'ambito della sintesi e studio di nuove molecole capaci di interagire con le membrane fosfolipidiche e di funzionare da *carrier* di cationi di interesse biologico, quali sodio e potassio è stato sintetizzato il dimero ciclico **1**, denominato **crown-CyPLOS** (Figura 5). Tale derivato presenta le due unità di fenil- β -D-glucopiranoside, legate fra loro mediante ponti fosfodiesterici, con gli ossidrili 2 e 3 impegnati in strutture mimiche dell'etere corona [18]-crown-[6].

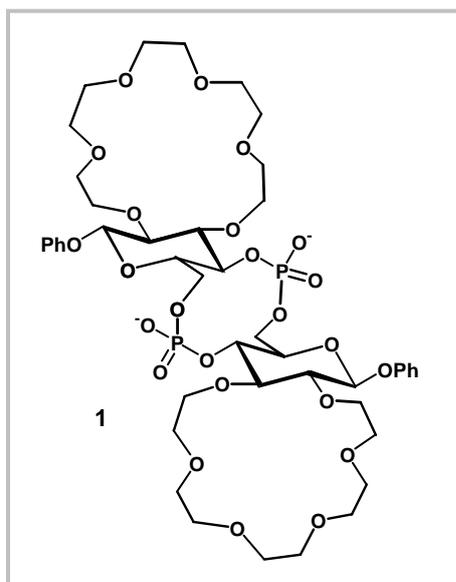
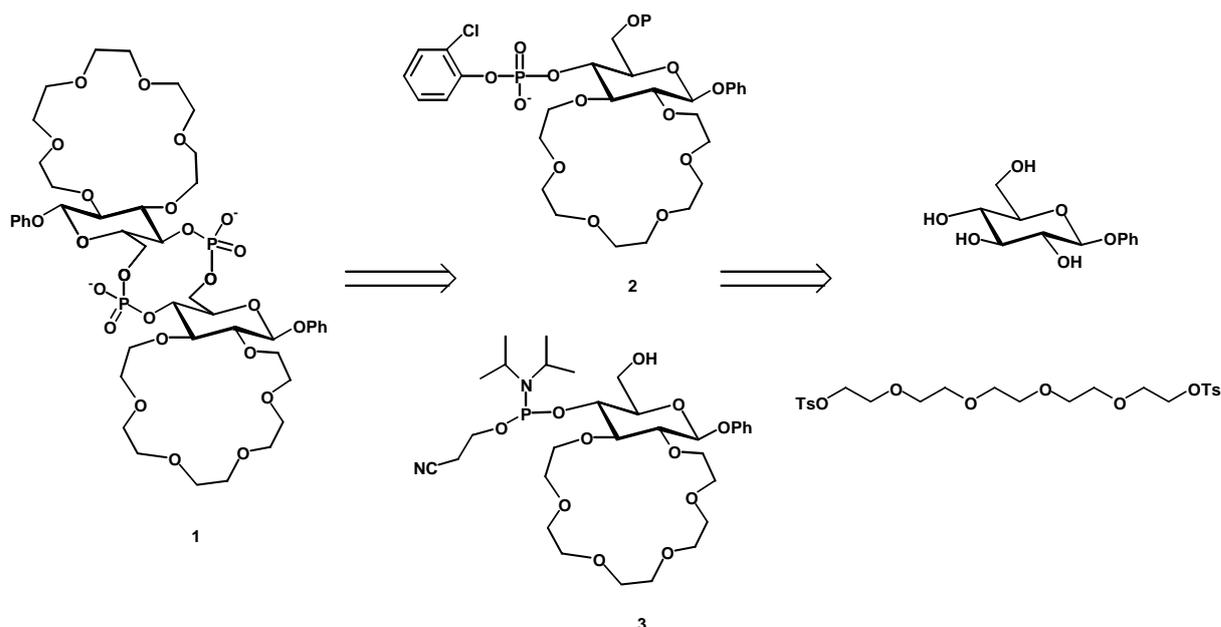


Figura 5 – *Crown-CyPLOS*

Il dimero ciclico **1** coniuga l'apolarità e la capacità chelante degli pseudo-eteri corona con la polarità dei gruppi fosfato. Le unità glucosidiche risultano 4,6-legate attraverso ponti fosfodiesteri (analogamente ai derivati anfifilici **1a**, **1b**, **1c** e **6** descritti nei capitoli I e II, rispettivamente), legami stabili sia all'idrolisi chimica, sia all'idrolisi enzimatica da parte di nucleasi o fosfatasi cellulari.

Seguendo lo stesso schema retro sintetico già applicato per la preparazione dei CyPLOS anfifilici, la sintesi del dimero ciclico può essere realizzata a partire da due *building block*, il monomero 4-fosfato **2** e il monomero 4-fosforoammidito **3**. Essi possono, a loro volta, essere sintetizzati a partire da un unico precursore, reperibile in commercio, il fenil- β -D-glucopiranoside (*Schema 1*).

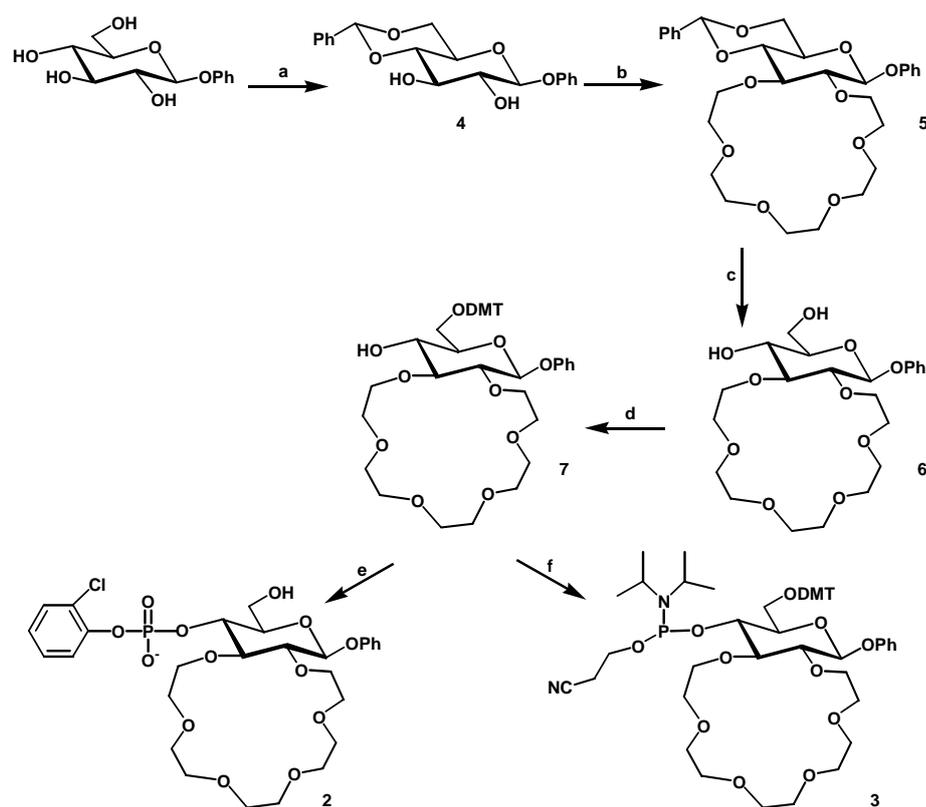
I *building block* **2** e **3** presentano l'ossidrile in posizione 4 derivatizzato mediante due gruppi contenenti atomi di fosforo con reattività diverse, così da far avvenire in maniera selettiva la reazione di dimerizzazione e la successiva ciclizzazione. La chimica del fosforammidito, qui impiegata per la dimerizzazione, e la chimica del fosfotriestere, sfruttata nel passaggio di ciclizzazione, sono metodologie sintetiche molto efficienti e ben ottimizzate, largamente impiegate nella sintesi di oligonucleotidi, sia in fase solida, sia in soluzione.



Schema 1 – Analisi retrosintetica per il Crown-CyPLOS 1

Nello *Schema 2* è riportata la strategia sintetica per l'ottenimento dei *building block 2* e *3* la quale ha previsto, come primo stadio, la protezione del fenil- β -D-glucopiranoside come 4,6-benzilidene (composto **4**). La reazione è stata realizzata utilizzando un eccesso di benzaldeide dimetilacetale (2.1 eq) in presenza di una quantità catalitica di acido *p*-toluensolfonico (0.05 eq). La protezione degli ossidrili in 4 e 6 del fenil- β -D-glucopiranoside ha consentito l'alchilazione selettiva degli ossidrili non protetti in **2** e **3** mediante reazione di *Williamson*, che ha portato al prodotto desiderato **5**. Questo è un passaggio chiave perché consente di introdurre l'unità di [18]-crown-[6] desiderata sullo zucchero.

La reazione è stata condotta in presenza di un largo eccesso di NaH (6 eq), utilizzando pentaetilenglicole ditosilato, disponibile commercialmente, come reattivo elettrofilo. La reazione, condotta in THF anidro a ricadere per 12 ore, ha previsto appropriate condizioni di diluizione, per evitare possibili eventi di polimerizzazione non desiderati e favorire, invece, la reazione di condensazione intramolecolare. In tutti i casi è sempre stata osservata la formazione di un unico prodotto di reazione e, dopo purificazione su colonna cromatografica, il prodotto desiderato è stato isolato in forma pura, con resa media dell' 89%.



- a. benzaldeide dimetilacetale, PTSA cat., DMF, 4 °C, 48 ore (93%);
 b. Ts-O-PEG-O-Ts, NaH, THF, a ricadere, 12 ore (89%);
 c. TFA/CH₂Cl₂/H₂O 1:10:0.5, v/v/v, 0 °C, 4 ore (resa quasi quantitativa);
 d. DMTCl, Py, t.a., 12 ore (98 %).
 e. 2-clorofenil-diclorofosfato, 1,2,4-triazolo, TEA, Py, 0 °C→t.a., 3 ore (92%);
 f. 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidito, DIPEA, CH₂Cl₂, t.a., 3 ore (96%).

Schema 2 – Strategia sintetica per la preparazione dei building block 2 e 3

Successivamente è stata effettuata la deprotezione degli ossidrili in 4 e in 6 utilizzando una soluzione al 10 % di TFA in DCM che ha consentito la rimozione completa del gruppo benzilidene. La reazione, condotta a 0 °C per 4 ore, ha portato al derivato atteso 6 con resa pressoché quantitativa. Successivamente, è stato protetto selettivamente l'ossidrile primario in posizione 6 dello zucchero, così da lasciare libero l'ossidrile in 4 per l'inserimento dei gruppi fosforilati. Come gruppo protettore è stato scelto il 4,4'-dimetossitriifenilmetile (DMT), tradizionalmente utilizzato per la protezione di ossidrili primari di nucleosidi nella sintesi, in soluzione ed in fase solida, di oligonucleotidi. Facile da installare, il DMT forma eteri molto resistenti alle condizioni basiche, ma rimossi facilmente in seguito a un trattamento acido blando. La sintesi del derivato 7 è stata effettuata per trattamento con DMTCl in piridina e ha portato al derivato atteso con resa del 98%, calcolata sul prodotto isolato dopo purificazione su colonna di gel di silice. Questo passaggio di purificazione ha richiesto particolare cautela e

l'uso di solventi addizionati di basi (1% di piridina o TEA in volume) durante l'eluizione per evitare detritilazione del prodotto desiderato a contatto con il gel di silice della colonna.

Il derivato **2** è stato sintetizzato con una più che soddisfacente resa complessiva per la reazione di fosforilazione seguita da detritilazione dell'OH in posizione 6 (92%), condotta senza isolare il prodotto tritilato intermedio (“*one-pot*”). La fosforilazione dell'ossidrilico in posizione 4 è stata realizzata utilizzando una classica reazione di sostituzione nucleofila con il 2-clorofenil-diclorofosfato in piridina in presenza di TEA e triazolo. Il gruppo protettore transiente DMT è stato rimosso direttamente nella lavorazione del prodotto di reazione, realizzata purificando il grezzo di reazione su una colonna di gel di silice precedentemente ambientata con una soluzione 0.1% di TFA in CH₂Cl₂. Con questa procedura è stato ottenuto, quindi, in un unico passaggio il prodotto desiderato **2**, già deprotetto all'OH in 6, con un complessivo risparmio di tempo e aumento della resa totale. Il derivato **2** è risultato essere un prodotto stabile, adatto ad essere conservato, come prodotto secco, anche per lunghi periodi.

Per la sintesi del derivato **3** è stata seguita una procedura ben nota nell'elaborazione sintetica di *building block* utili per la sintesi di oligonucleotidi. In questa reazione, eseguita in condizioni anidre e in atmosfera di azoto anidro, l'ossidrilico in posizione 4 è stato derivatizzato con un gruppo contenente P(III), particolarmente reattivo, mediante fosfitilazione con *N,N*-diisopropil-2-cianoetilclorofosforammidito in presenza di DIPEA come base e DCM come solvente, ottenendo il prodotto desiderato **3** con una resa del 96%. Anche in questo caso, come nel caso della purificazione del derivato **7**, particolare attenzione ha richiesto la fase di purificazione. Il gel di silice e le aliquote di eluente utilizzate sono state addizionate in tutti i casi con TEA (1% in volume), per evitare anche parziale rimozione del gruppo transiente DMT, acido labile, a contatto con il gel di silice. Il composto **3**, al contrario del composto **2**, è risultato essere un prodotto poco stabile e per questo motivo è stato sintetizzato ed isolato immediatamente prima del suo uso nella successiva reazione di accoppiamento.

Per sintetizzare il dimero lineare **8** sono stati fatti condensare i due *building block* **2** e **3**, come indicato nello *Schema 3*, secondo una strategia fosforamiditica.

I due monomeri impiegati sono, rispettivamente, il monomero 4-fosfato (derivato **2**), avente l'ossidrilico primario in posizione 6 non protetto, e il monomero 4-fosforammidito (derivato **3**), con la funzione alcolica primaria in posizione 6 protetta come DMT-etero.

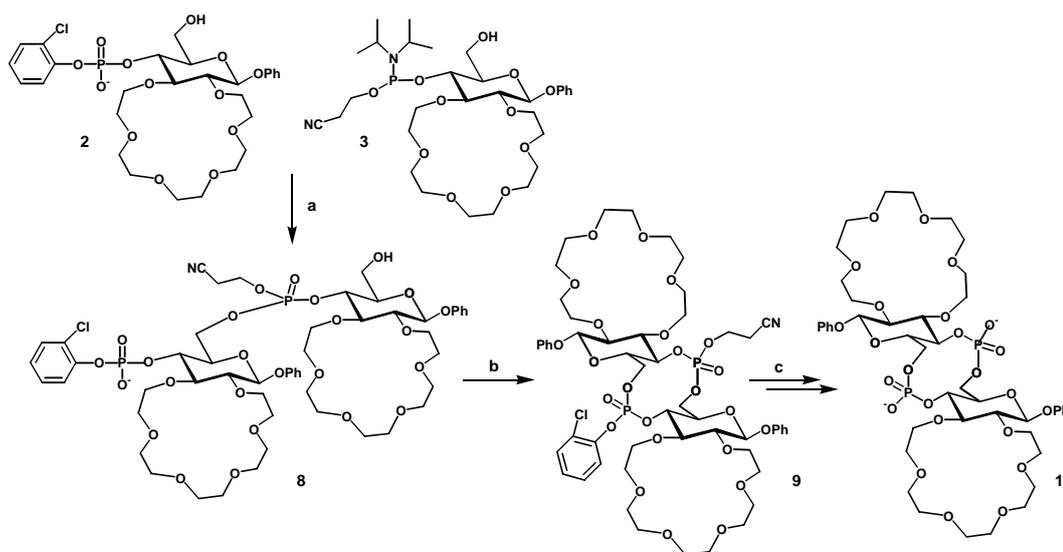
La reazione di accoppiamento, secondo la chimica del fosforammidito nella sintesi in fase solida di oligonucleotidi, è realizzata in presenza di un catalizzatore acido molto blando, in genere una soluzione 0.45 M di tetrazolo in acetonitrile, capace di protonare l'azoto del gruppo diisopropilammino del derivato nucleosidico 3'-fosforammidito aggiunto in soluzione,

trasformandolo in un ottimo gruppo uscente (la molecola neutra di *N,N*-diisopropilammina) e contemporaneamente, attivando l'atomo di fosforo adiacente all'attacco nucleofilo da parte dell'ossidrilico primario in posizione 5' del nucleoside ancorato al supporto polimerico.

Nel nostro caso, è stata utilizzata una soluzione 0.25 M di 4,5-dicianoimidazolo in acetonitrile, un attivante più acido rispetto al tetrazolo, il cui uso in una serie di esperimenti preliminari non aveva dato, invece, risultati soddisfacenti. La reazione di accoppiamento è stata condotta, inoltre, in condizioni di massima anidricità dei solventi e dei reattivi, tenuti previamente a contatto con setacci molecolari attivati, e lasciando poi la miscela di reazione sotto flusso di azoto anidro a temperatura ambiente per 3 ore. La successiva reazione di ossidazione è stata effettuata aggiungendo *tert*-butilidroperossido (soluzione 5.5 M in *n*-decano, 1:10 rispetto al fosforammidito) per 30 minuti a temperatura ambiente. Il grezzo di reazione è stato poi portato a secco e purificato su colonna di gel di silice eluita con 1% di piridina in DCM. Il prodotto recuperato è stato, quindi, direttamente trattato con una soluzione di TCA 1% in CH₂Cl₂ per rimuovere il gruppo DMT. Dopo purificazione su colonna di gel di silice, il derivato desiderato **8** è stato recuperato in forma pura con una resa del 50% per i tre passaggi, calcolata sulla base del monomero 4-fosfato iniziale, aggiunto in difetto stechiometrico. Questo risultato, pur non eccellente, è comunque soddisfacente e ci ha consentito di isolare il prodotto desiderato in quantità discrete, utili per le successive manipolazioni sintetiche.

La reazione di ciclizzazione per la sintesi del derivato **9** è stata condotta utilizzando come agente condensante 1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazolo (MSNT) in piridina, in presenza di una base, DMAP, che serve a rendere più nucleofilo l'ossidrilico primario che porta l'attacco al fosfato. Mediante formazione di una anidride mista al fosfato, il gruppo fosfodiesterico in posizione 4 terminale è reso suscettibile di attacco nucleofilo da parte del gruppo ossidrilico libero in posizione 6 dell'altro residuo saccaridico, facendo avvenire, in questo modo, la ciclizzazione desiderata.

Come classicamente riportato nella sintesi di macrocicli, la reazione di ciclizzazione richiede elevate condizioni di diluizione per minimizzare possibili eventi di polimerizzazione non desiderati. Nel nostro caso, sono state impiegate concentrazioni di substrato lineare dell'ordine di 10⁻³ M. Anche questo passaggio richiede un ambiente di reazione rigorosamente anidro e, pertanto, sono state utilizzate tutte le comuni precauzioni per anidrificare reagenti e solventi e la miscela di reazione è stata tenuta in presenza di setacci molecolari attivati. Il composto ciclico **9** è stato isolato, dopo purificazione su colonna cromatografica, con resa dell'83 %.



- a. i) 0.25 M 4,5-dicianoimidazolo in CH_3CN , 3 ore, t.a.; ii) 5.5 M t-ButOOH in decano, 30 min, t.a.;
 iii) TCA 1% in CH_2Cl_2 , 1 ora, t.a. (50% per i tre passaggi);
 b. MSNT, DMAP, piridina, 12 ore, t.a. (83%);
 c. i) piperidina, 12 ore, 60 °C; ii) NH_4OH , 12 ore, 60 °C (73% per i due passaggi).

Schema 3 – Schema sintetico pre la preparazione del Crown-CyPLOS 1

Successivamente, sono stati effettuati due passaggi per la completa deprotezione del dimero ciclico. La prima reazione, che consente la rimozione del gruppo 2-cianoetile attraverso un meccanismo di β -eliminazione al fosfato, con liberazione di una molecola neutra di acrilonitrile è stata effettuata con piperidina a 60 °C per 12 ore.

La seconda deprotezione ha previsto un passaggio di idrolisi basica, effettuata a 60 °C con una soluzione acquosa concentrata di NH_4OH . Il meccanismo di reazione, in questo caso, è descritto con un attacco diretto dello ione OH^- all'atomo di fosforo del gruppo fosfotriestere, formazione di un addotto pentacoordinato al fosforo e successiva fuoriuscita selettiva dello ione *o*-clorofenato. Da controllo cromatografico, dopo 12 ore la miscela di reazione ha fatto osservare scomparsa totale del prodotto di partenza. Il prodotto desiderato è stato purificato mediante cromatografia ad esclusione molecolare su colonna Sephadex G25, eluita con H_2O /etanolo, 4:1 (v/v), ottenendo il dimero **1**, con una resa del 73% per i due step di sintesi. Complessivamente, il dimero **1** è stato sintetizzato in 11 passaggi, con una resa totale del 21%.

Tutti gli intermedi di sintesi sono stati purificati mediante cromatografia su colonna di gel di silice, mentre il prodotto finale **1**, risultato molto polare, è stato isolato mediante cromatografia ad esclusione molecolare.

Tutti i composti sintetizzati sono stati caratterizzati mediante spettroscopia ^1H e ^{13}C NMR (anche ^{31}P per i derivati contenenti fosforo), e spettrometria di massa in modalità ESI o MALDI.

Il composto ciclico **1**, completamente deprotetto, presenta un elevato grado di simmetria interna. Lo spettro ^1H -NMR (*Figura 6*) mostra le due unità ripetitive, presenti nel ciclo, magneticamente equivalenti: infatti, per ciascun tipo di nucleo, relativamente alle due unità monomeriche presenti, è stato osservato un unico segnale.

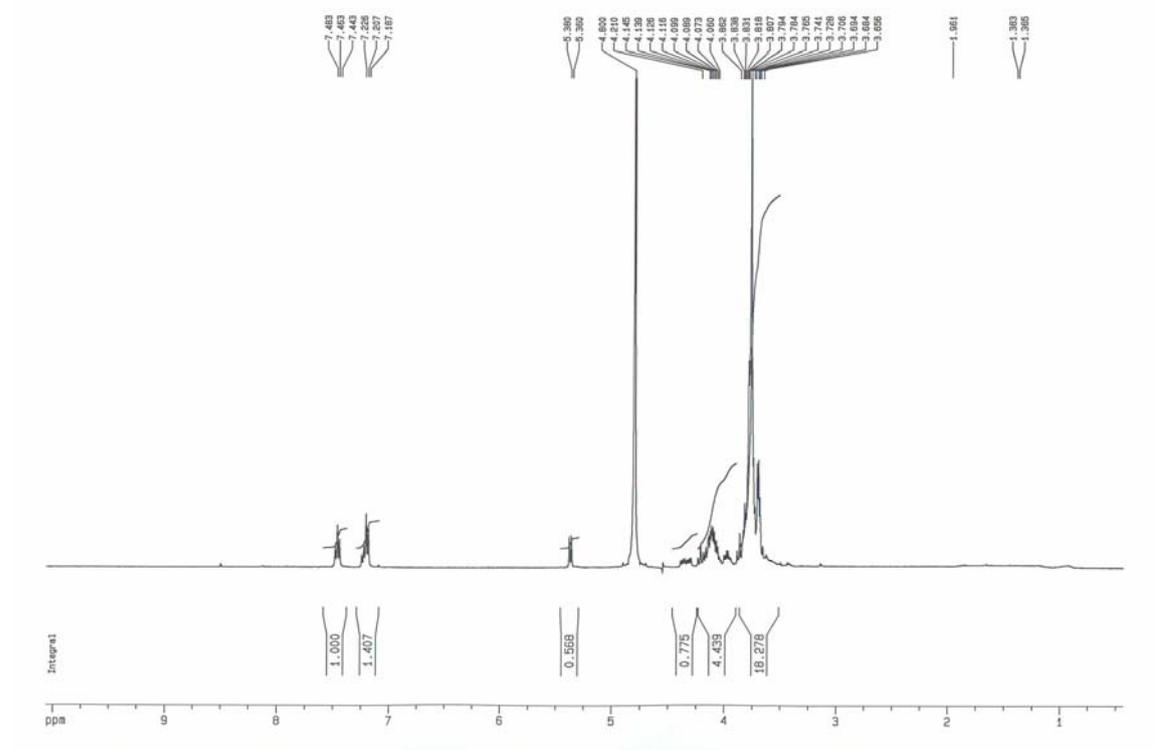


Figura 6 – Spettro ^1H NMR (D_2O , 400 MHz, 298 K) del composto ciclico **1**

Analogamente, lo spettro ^{31}P NMR (*Figura 7*) mostra un unico segnale per i due atomi di fosforo, che sono magneticamente equivalenti.

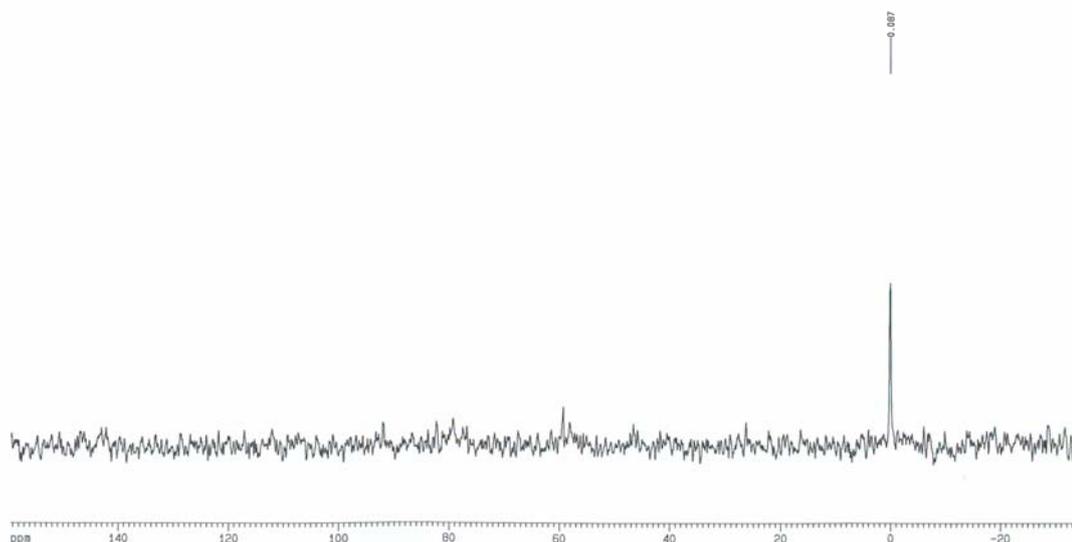


Figura 7 – Spettro ^{31}P NMR (D_2O , 161.98 MHz, 298 K) del composto ciclico **1**

Questo disaccaride presenta due motivi strutturali peculiari: la presenza di ponti fosfodiesterici tra le unità glucosidiche 4,6-legate costituenti il ciclo, e gli ossidrili in posizione 2 e 3 di ciascun monomero impegnati in una struttura mimica del [18]-crown-[6].

Nonostante in letteratura siano presenti svariatissimi esempi di macrocicli, fra cui anche ciclodestrine e calixareni variamente derivatizzati con unità di etere corona, è questo il primo esempio di macrociclo in cui unità di etere corona sono direttamente fuse a strutture glucosidiche. Da notare che il composto coordinato a due equivalenti di ioni monovalenti (Na^+ , K^+ o altri) risulta una specie polare ma elettricamente neutra, proprietà fortemente desiderabile in un potenziale ionoforo.

Su questo nuovo derivato macrociclico sono attualmente in corso, in collaborazione con laboratori specializzati, esperimenti tesi a verificare le proprietà di trasporto di ioni H^+ , Na^+ o K^+ attraverso sistemi mimici di membrane cellulari, nonché saggi di attività antibiotica, antivirale e antitumorale.

Attualmente sono disponibili dati di attività antifungina, saggiata nei laboratori dalla dott.ssa Anna Catania del Centro di Sperimentazione Preclinica dell'Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, che hanno mostrato per il composto **1** solo una limitata attività (max. inibizione 20% per concentrazione di substrato **1** = 10 μM) nei confronti delle specie *Candida krusei* e *Candida glabrata*.

3.0 NUCLEOSIDI CROWN: SINTESI E PROPRIETÀ CONFORMAZIONALI

Come già descritto, gli eteri corona sono degli eccellenti ligandi per cationi e le loro capacità di complessazione sono state ampiamente studiate negli ultimi trent'anni.

Le caratteristiche e l'utilità di questi macrocicli sono state oggetto di numerosi studi e di essi sono stati sintetizzati un gran numero di derivati⁵⁴. Di notevole interesse è l'introduzione di *scaffold* chirali sulla struttura dell'etere corona, in questo modo convertito in un recettore, utile come potenziale reagente chirale o come catalizzatore per reazioni enantioselettive.

In questo contesto, molti carboidrati recanti nello scheletro piranosico o furanosico uno o più eteri corona sono stati descritti e proposti come modelli per processi di riconoscimento chirale⁵⁵.

In letteratura sono, però, pochi gli esempi di combinazione di *scaffold* nucleosidici con eteri corona. Un esempio riguarda la sintesi e lo studio dell'attività biologica di un etere corona legato ad un arile-5'-fosfato diestere derivato dell'AZT (3'-azido-timidina) e della 2',3'-dideoossiuridina, proposti come primi prototipi di una nuova classe di nucleotidi studiati come potenziali farmaci⁵⁶ (Figura 8).

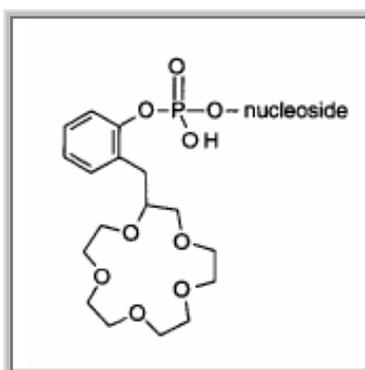


Figura 8 – Scaffold nucleosidici funzionalizzati con eteri corona

Più recentemente è stata descritta la sintesi di nuovi derivati dell'AZT, coniugati in posizione 5' a residui di ciclam e di biciclam, attraverso un linker flessibile di cinque atomi di carbonio⁵⁷ (Figura 9).

⁵⁴ Molotov, Y.A. *Macrocyclic Compounds in Analytical Chemistry*, 1997, Wiley, New York.

⁵⁵ Miethchen, R.; Fehring, V. *Liebigs Ann.*, 1997, 553-561.

⁵⁶ Morin, G.T.; Smith, B.D. *Tetrahedron Lett.*, 37, 3101-3104.

⁵⁷ Dessolin, J.; Galea, P.; Vlieghe, P.; Chermann, J.-C.; Kraus, J.-L. *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 229-241.

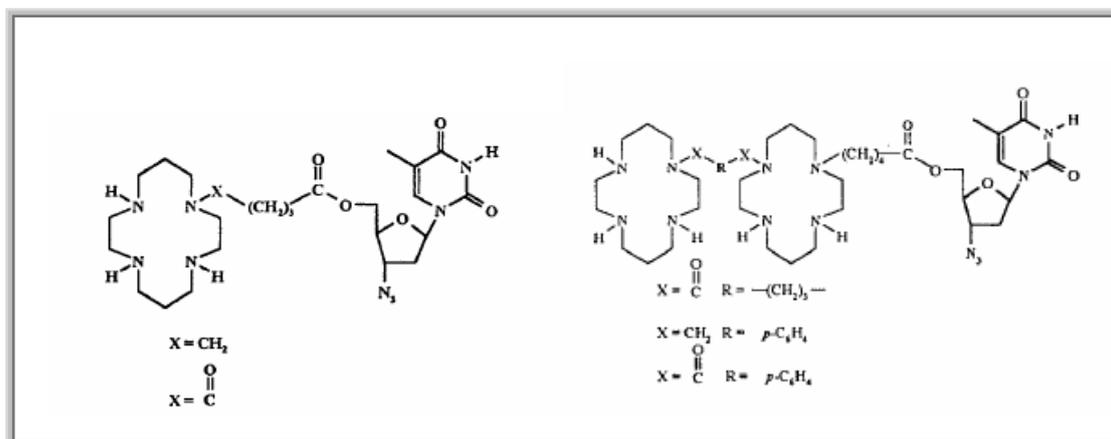


Figura 9 – AZT coniugati con unità di ciclam e bicyclam

Un altro esempio significativo ha previsto l'introduzione di un poliaza-crown anfifilico all'estremità di un filamento oligonucleotidico (Figura 10); la duplex di DNA risulta stabilizzata se nello scheletro oligonucleotidico è presente un residuo di poliaza-crown⁵⁸.

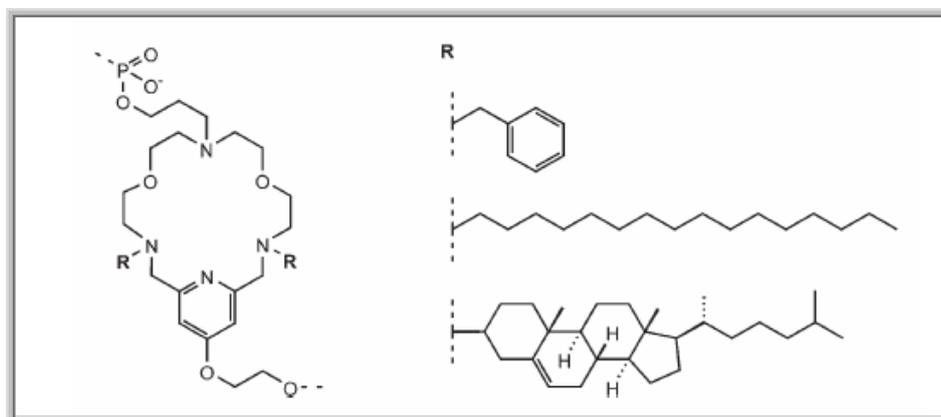


Figura 10 – Introduzione di un poliaza-crown anfifilico in un filamento oligonucleotidico di DNA

Molte sono le strategie sintetiche volte alla preparazione di analoghi di nucleosidi, apportando modifiche sia a livello della nucleo base, sia a livello dello zucchero, al fine di ottenere agenti terapeutici non tossici, efficaci soprattutto come antivirali e/o antitumorali. Nell'ambito dei nucleosidi modificati sullo zucchero, particolare attenzione è rivolta a nucleosidi legati ad anelli a quattro, cinque e sei atomi, come substrati conformazionalmente

⁵⁸ Rohr, K.; Vogel, S. *Chem. Bio. Chem.* **2006**, 7, 463-470.

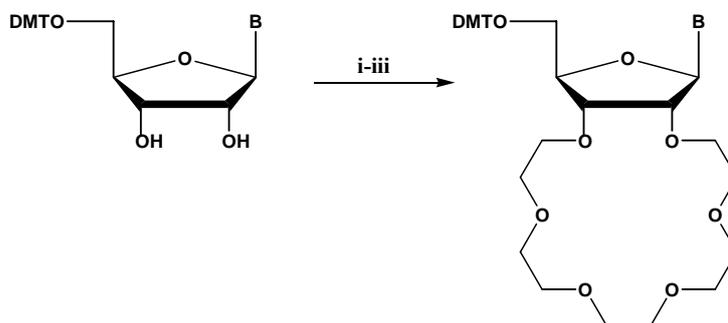
bloccati, facilmente riconoscibili dalle chinasi cellulari⁵⁹, o come *building block* per oligonucleotidi modificati biologicamente attivi⁶⁰.

Nel corso di questo lavoro di ricerca, è stato iniziato uno studio volto alla sintesi di nuovi nucleosidi modificati, aventi unità di etere corona fusi sull'anello furanosico. Ci si aspetta che anelli di ampie dimensioni, come gli eteri corona, pur convertendo il nucleoside in un sistema biciclico, possano solo parzialmente bloccare gli equilibri conformazionali del ribosio. D'altro canto, le eccellenti capacità complessanti degli eteri corona nei confronti di cationi di interesse biologico, come Na^+ e K^+ , possono significativamente aumentare le capacità antimicrobiche, antivirali e/o antifungine dei nucleosidi.

3.1 STRATEGIA SINTETICA

Qui è proposta una procedura sintetica generale per la preparazione di nuovi derivati ribonucleosidici biciclici, recanti un motivo strutturale quale il [18]-crown-[6] fuso sulle posizioni 2' e 3' del residuo del ribosio.

Il trattamento di un nucleoside 5'-DMT-protetto con un eccesso di pentaetilenglicole ditosilato in presenza di una base forte, ad esempio nelle classiche condizioni di reazione di *Williamson*, consente la formazione di nucleosidi derivatizzati in posizione 2' e 3' a dare mimici del [18]-crown-[6]. Assumendo, infatti, completa la prima reazione di alchilazione di un gruppo OH libero dell'unità ribosidica, la vicinanza del secondo gruppo OH in posizione *cis*, associata all'effetto "templato" di uno ione metallico, come Na^+ o K^+ , può favorire la ciclizzazione rispetto a dimerizzazioni indesiderate (*Schema 5*).



- i. Coupling con pentaetilenglicole ditosilato;
ii. deprotezione della base; iii. detritilazione.

Schema 5 – Strategia sintetica generale per la preparazione di nucleosidi fusi con residui di [18]-crown[6]

⁵⁹ a) Mathe, C.; Perigaud, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 9, 1489-1505.

⁶⁰ a) Herdewijn, P. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1489, 167-179. b) Cobb, A.J.A. *Org. Bio. Chem.* **2007**, 5, 3260-3275. c) Kaur, H.; Babu, B.R.; Maiti, S. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4672-4697.

Come primo *target* sintetico, è stato preso in considerazione il derivato dell'uridina **10** (uridina-crown, *Figura 11*)⁶¹.

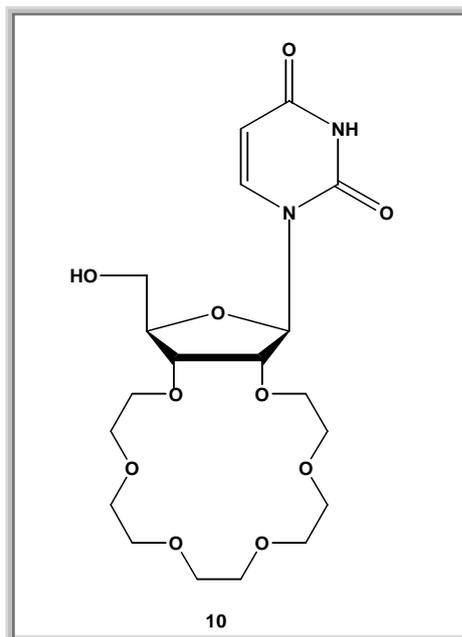


Figura 11 – Uridina-Crown

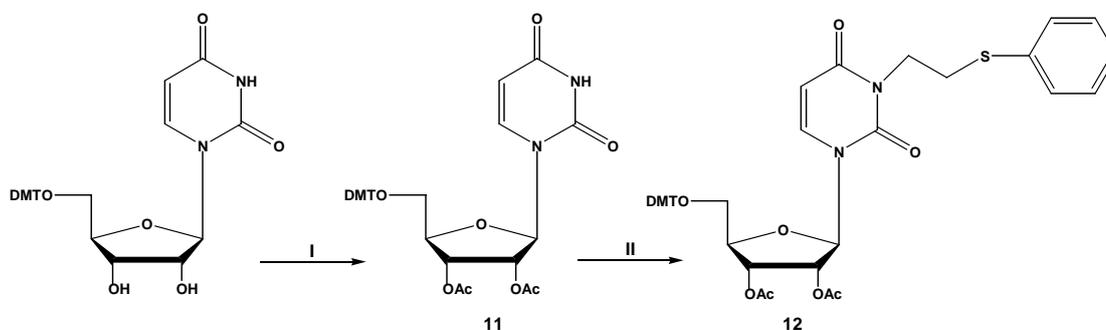
Per ottenere una alchilazione selettiva degli ossidrili in posizione 2' e 3' del ribosio, è stato necessario introdurre un gruppo protettore temporaneo per mascherare l'NH in posizione 3 della nucleobase. A questo scopo è stato prescelto il gruppo 2-(feniltio)etile, che può essere facilmente inserito sull'N-3 dell'uridina mediante una reazione di *Mitsunobu* ed è stabile alle condizioni basiche drastiche richieste per la successiva alchilazione degli ossidrili in 2' e 3' del ribosio. Il 2-(feniltio)etile è un gruppo protettore del tipo “*safety catch*”, il cui uso per la protezione di basi eterocicliche di nucleosidi è stato messo a punto nel gruppo di ricerca in cui è stato svolto questo lavoro.⁶² Molto stabile ad un'ampia varietà di condizioni, solo dopo ossidazione del tioetere a solfone, tale gruppo può essere rimosso facilmente per trattamento basico, con rese quantitative, mediante un meccanismo di β -eliminazione.

Nello schema di reazione qui messo a punto, è stato utilizzato come prodotto di partenza il derivato dell'uridina protetta in posizione 5' con il gruppo dimetossitritile (DMT), disponibile commercialmente, e si è operata una protezione degli ossidrili 2' e 3' per reazione con anidride acetica e piridina. Il composto **11**, così ottenuto, è stato poi sottoposto a reazione

⁶¹ Coppola, C.; D'Onofrio, J.; Di Fabio, G.; De Napoli, L.; Montesarchio, D. *Nucleic Acids Symposium Series No. 52*, **2008**, 667-668.

⁶² D'Onofrio, J., De Napoli, L., Di Fabio, G., Montesarchio, D. *Synlett*, **2006**, 6, 845-848.

di Mitsunobu con il 2-(feniltio)etanolo in presenza di tributilfosfina e ADDP in benzene anidro, che ha fornito il nucleoside **12** atteso con una resa del 90% (Schema 5).



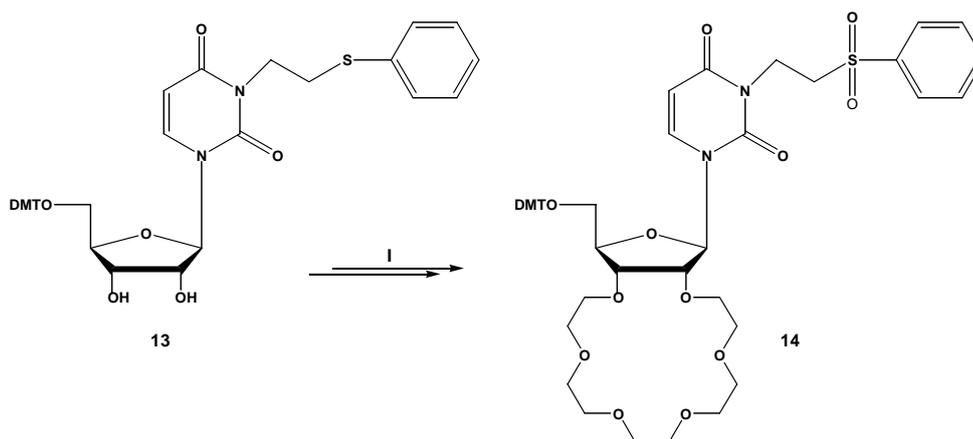
- I. Ac_2O , Piridina, 8 ore, t.a. (resa pressocchè quantitativa);
 II. $\text{PhSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, Bu_3P -ADDP, benzene, 18 ore, t.a. (90%)

Schema 5 – Protezione dell'NH della base eterociclica

Il composto **12** è stato, quindi, trattato con una soluzione 2 M di NaOH in diossano / H_2O , 1:1, (v/v) per 8 ore a 50 °C che ha fornito il derivato **13**, deacetilato in posizione 2' e 3' del ribosio, con una resa quasi quantitativa.

La reazione di formazione del [18]-crown-[6] sul nucleoside **13** è stata condotta in presenza di un largo eccesso di NaH (5 eq), utilizzando pentaetilenglicole ditosilato, disponibile commercialmente, come reattivo elettrofilo. La reazione, condotta in THF anidro a ricadere per 12 ore, ha previsto appropriate condizioni di diluizione, per evitare possibili eventi di polimerizzazione non desiderati e favorire, invece, la reazione di condensazione intramolecolare. La reazione è stata monitorata mediante TLC, e alla scomparsa del prodotto di partenza è stata effettuata, *one-pot*, l'ossidazione del tioetere a solfone del gruppo protettore della base eterociclica mediante aggiunta di MCPBA, lasciando il sistema a temperatura ambiente per un'ora (Schema 6).

Dopo purificazione su colonna cromatografica, il prodotto desiderato **14** è stato isolato in forma pura, con resa del 70% per i due step di sintesi.

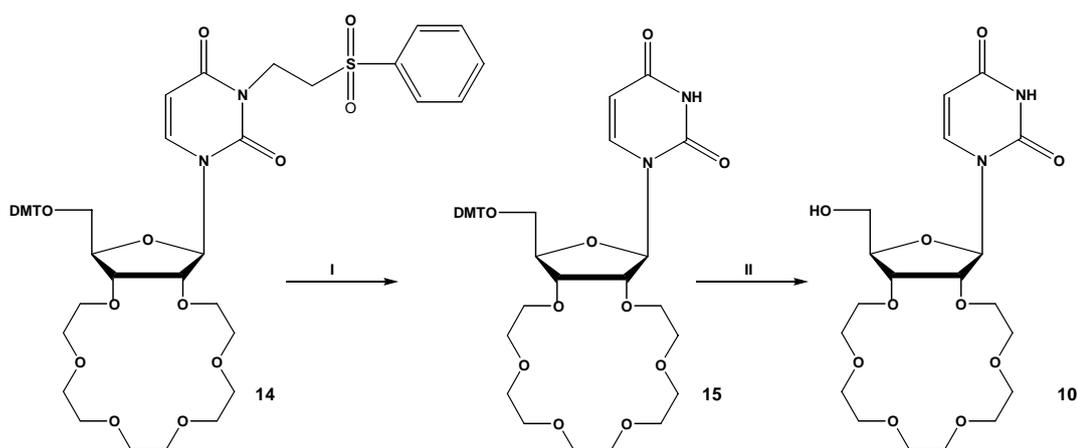


I. a) Ts-PEG-Ts, NaH, THF, 12 ore, a ricadere; b) MCPBA, 1 ora, t.a. (70% per i due step).

Schema 6 – Sintesi del derivato **14**

Una volta condotta a completezza la reazione di ossidazione, il gruppo protettore della base eterociclica è reso suscettibile di rimozione mediante un meccanismo di β -eliminazione. Questo passaggio è stato effettuato con successo mediante trattamento basico con una soluzione 2 M di NaOH in diossano /H₂O, 1:1 (v/v) per 8 ore a 50 °C. Questa procedura ci ha permesso di ottenere, dopo purificazione mediante cromatografia su colonna di gel di silice, il derivato **15** deprotetto sulla base, con una resa pressochè quantitativa.

L'ultimo passaggio per l'ottenimento del *target* sintetico ha previsto la rimozione del gruppo DMT dall'ossidrilico in posizione 5' del ribosio. A tale scopo, il derivato **15** è stato trattato con una soluzione all'1% di TCA in CH₂Cl₂ per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo ripetuti lavaggi con solvente organico, il nucleoside **10**, idrosolubile, è stato purificato mediante cromatografia ad esclusione molecolare su colonna Sephadex G25, eluita con H₂O/etanolo, 4:1 (v/v), che ne ha consentito l'isolamento in forma pura con una resa pressochè quantitativa (*Schema 7*).



- I. 2M NaOH in diossano/H₂O 1:1 (v/v), 8 ore, 50 °C (quantitativa);
 II. 1% TCA in CH₂Cl₂, 30 min, t.a. (quantitativa).

Schema 8 – Step finali per la sintesi del target nucleotidico **10**

I composti sintetizzati sono stati caratterizzati mediante spettroscopia ¹H e ¹³C-NMR e spettrometria di massa MALDI o ESI.

Studi preliminari di analisi conformazionale *via* NMR hanno mostrato che le costanti di accoppiamento *J* sono pressochè identiche, nell'ambito dell'errore sperimentale, a quelle determinate nello stesso solvente (D₂O) per l'uridina, indicando che la conformazione del ribosio presente sul nucleoside derivatizzato **10** non è significativamente alterata rispetto alla conformazione del nucleoside libero.

Questo aspetto è particolarmente interessante ai fini del riconoscimento da parte delle chinasi cellulari, enzimi chiave in una serie di processi biologici che trasformano i nucleosidi (eventuali farmaci) nei corrispondenti 5'-monofosfato che risultano essere le specie biologicamente attive.

Su questo nuovo derivato sono attualmente in corso, in collaborazione con laboratori specializzati, saggi di attività antibiotica, antivirale e antitumorale.

4.0 PARTE SPERIMENTALE

PROCEDURE GENERALI

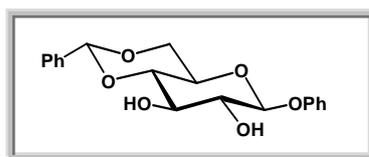
Le analisi TLC sono state effettuate su lastre di gel di silice Merck (60, F254). I prodotti di reazione sono stati evidenziati mediante luce UV e poi per trattamento con una soluzione acida ossidante (acido acetico/acqua/acido solforico 10:4:5 v/v/v). Per le cromatografie su colonna è stata utilizzata gel di silice Merck (Kieselgel 40, 0.063-0.200 mm) e, per la purificazione dei composti finali, una colonna ad esclusione molecolare Sephadex G25.

Sono stati impiegati setacci molecolari 3 Å in perle ca. 2 mm. Gli spettri di massa ESI (ioni positivi e/o negativi) sono stati eseguiti con uno spettrometro Waters Micromass ZQ. Gli spettri di massa MALDI sono stati eseguiti con uno spettrometro MALDI DEPRO in modalità Linear e/o Reflectron. Gli spettri NMR sono stati eseguiti su spettrometri Bruker WM-400, Varian-Gemini 300 e Varian-Inova 500. I *chemical shift* sono espressi in ppm utilizzando come riferimento il segnale residuo del solvente ($\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm, $\text{CD}_3\text{OD} = 3.31$, $\text{D}_2\text{O} = 4.80$); i *chemical shift* degli spettri ^{13}C sono riferiti al segnale del solvente ($\text{CDCl}_3 = 76.9$ ppm, $\text{CD}_3\text{OD} = 49.5$); i valori di J sono espressi in Hz. Gli spettri ^{31}P NMR sono stati registrati utilizzando una soluzione all'85% di H_3PO_4 contenente alcune gocce di D_2O come riferimento esterno.

SINTESI DEL CROWN-CYPLOS, 1

SINTESI DEL DERIVATO 4: 200 mg (0.780 mmol) di fenil- β -D-glucopiranoside sono stati sciolti in 2.2 mL di DMF anidra. Alla miscela, sotto agitazione, sono stati aggiunti, nell'ordine, 7.5 mg (0.0040 mmol) di PTSA e 245 μ L (1.63 mmol) di α,α -dimetossitoluene. La reazione è stata lasciata sotto agitazione a 4 °C ed è stata controllata mediante TLC utilizzando come sistema eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 99:1 (v/v). Dopo 48 ore la miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta, ridisciolta in CHCl_3 , versata in un imbuto separatore e lavata due volte con una soluzione acquosa satura di NaCl. La fase organica è stata recuperata, anidrificata su sodio solfato anidro, filtrata e seccata sotto vuoto. 250 mg (0.725 mmol) di prodotto pulito desiderato **4** sono stati recuperati mediante cristallizzazione da CHCl_3 , corrispondenti ad una resa del 93%.

4: solido bianco amorfo, $R_f = 0.4$ [$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 98:2, (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.52-7.00 (segnali complessi, 10H, protoni aromatici); 5.54 [s, 1H, (Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$)]; 5.02 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1); 4.36 (dd, $J = 6.6$ e 10.0 Hz, 1H, H-3); 3.96-3.54 (segnali sovrapposti, 5H, H-2, H-4, H-5, H-6_a e H-6_b).

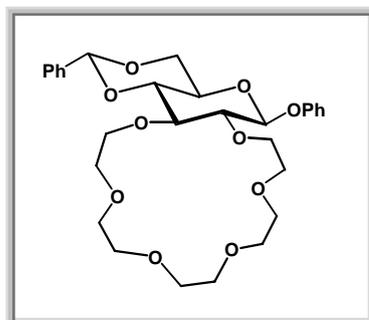
^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 156.7, 129.5, 129.3, 128.3, 126.9, 126.2, 123.2 e 116.8 (carboni aromatici); 101.9 (Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$); 101.0 (C-1); 80.2 (C-5); 74.2 (C-3); 73.1 (C-2); 68.5 (C-4); 66.4 (C-6).

ESI-MS (ioni positivi): calcolato per $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_6$, 344.126; m/z , trovato 367.19 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 383.25 ($\text{M} + \text{K}^+$).

SINTESI DEL DERIVATO 5: A 250 mg (0.725 mmol) del derivato **4**, sciolti in 19 mL di THF anidro, sono stati aggiunti 104 mg di NaH (sospensione al 60% in olio minerale, 4.35 mmol); dopo 10 minuti sono stati aggiunti 540 mg di pentaetilenglicole ditosilato (1.08 mmol) e la miscela è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente. Dopo 20 minuti sono stati aggiunti altri 13 mL di THF anidro e la reazione è stata lasciata a ricadere per 12 ore. Dopo aggiunta di CH_3OH , la miscela è stata seccata a pressione ridotta, ridisciolta in CHCl_3 , versata in un imbuto separatore e lavata due volte con una soluzione acquosa satura di NaCl.

La fase organica è stata recuperata, anidrificata su sodio solfato anidro, filtrata, seccata sotto vuoto e purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice eluita con CHCl_3 . Successive eluizioni con CHCl_3 contenente percentuali crescenti di CH_3OH (da 0% a 5%) hanno permesso di recuperare 352 mg (0.645 mmol) di prodotto **5**, pari ad una resa dell'89%.

5: olio bianco, $R_f = 0.6$ [$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 98:2 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.49-7.03 (segnali complessi, 10H, protoni aromatici); 5.55 [s, 1H, (Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$)]; 5.06 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1); 4.35 (dd, $J = 5.0$ e 10.5 Hz, 1H, H-4); 4.09-4.00 [segnali sovrapposti, 5H, 2x($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc) e H-6_a]; 3.79 (t, $J = 10.0$ e 10.0 Hz, 1H, H-3); 3.73-3.58 [segnali sovrapposti, 17H, 4x($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) e H-6_b]; 3.56-3.47 (segnali sovrapposti, 2H, H-2 e H-5).

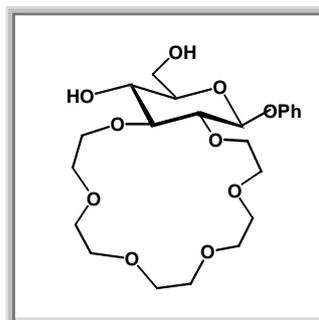
^{13}C NMR (CDCl_3 , 175 MHz): δ 157.0, 137.1, 129.6, 129.4, 128.8, 128.1, 127.8, 125.9, 122.8 e 116.8 (carboni aromatici); 101.7 (C-1); 101.0 (Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}$); 82.3 (C-2); 81.5 e 80.8 [2x($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc)]; 72.7 e 72.6 [2x($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc)]; 70.8, 70.7, 70.6, 70.5 e 70.4 [3x($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) e, sovrapposto, C-6]; 68.5 (segnali sovrapposti, C-4 e C-3); 66.0 (C-5).

ESI-MS (ioni positivi): calcolato per $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_{10}$, 546.25; m/z , trovato 568.59 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 584.57 ($\text{M} + \text{K}^+$).

SINTESI DEL DERIVATO 6: 352 mg (0.645 mmol) del derivato **5** sono stati messi a reagire con 14 mL di una soluzione di TFA al 10% in CH_2Cl_2 (v/v). La reazione è stata lasciata sotto agitazione a 0 °C per 4 ore. Il decorso della reazione è stato controllato mediante TLC utilizzando come sistema eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 95:5 (v/v). La miscela di reazione è stata, quindi, neutralizzata con una soluzione satura di NaHCO_3 , versata in un imbuto separatore e lavata due volte con una soluzione acquosa satura di NaCl . La fase organica è stata, quindi, anidrificata su sodio solfato anidro, filtrata e seccata. La miscela di reazione è stata purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice impaccata in CHCl_3 . Successive eluizioni con CHCl_3 contenente percentuali crescenti di CH_3OH (da 0% a 10%)

hanno permesso di recuperare 295 mg (0.645 mmol) di prodotto **6** con una resa pressoché quantitativa.

6: olio bianco, $R_f = 0.3$ [$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 95:5 (v/v)].



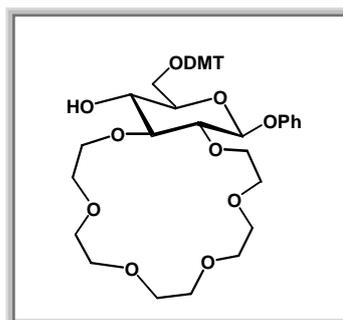
^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.29-6.99 (segnali complessi, 5H, protoni aromatici); 4.99 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-1); 4.29-4.25 [m, 1H, ($\text{CH}_2\text{CH}_a\text{O}$ -Gluc-C-2)], 4.06-3.83 [segnali sovrapposti, 4H, H-6_a, ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc-C-3) e ($\text{CH}_2\text{CH}_b\text{O}$ -Gluc-C-2)]; 3.79-3.60 [segnali sovrapposti, 18H, 4x($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), H-4 e H-6_b]; 3.48 [segnali sovrapposti, 2H, H-2 e H-5]; 3.40 (m, 1H, H-3).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 175 MHz): δ 157.0 129.5, 122.5 e 116.3 (carboni aromatici); 101.2 (C-1); 84.6 (C-3); 82.1 (C-5); 75.3 (C-2); 72.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc-C-2); 71.7, 71.5 e 71.4 [($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc-C-3), 2x($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc)]; 70.6, 70.5, 70.3, 70.1 e 70.0 [3x($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) e, sovrapposto, C-4]; 62.6 (C-6).

ESI-MS (ioni positivi): calcolato per $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$, 458.21; m/z , trovato 480.59 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 496.56 ($\text{M} + \text{K}^+$).

SINTESI DEL DERIVATO 7: 295 mg (0.645 mmol) del prodotto **6** sono stati sciolti in 5 mL di piridina anidra. Successivamente sono stati aggiunti 283 mg (0.839 mmol) di 4,4'-dimetossitriifenilmetilcloruro (DMTCl) e la reazione è stata tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente e controllata mediante TLC utilizzando come sistema eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 95:5 (v/v). Dopo 12 ore, la miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta e purificata su colonna cromatografica impaccata con CH_2Cl_2 contenente 1% di piridina (v/v). Successive eluizioni con CH_2Cl_2 contenenti volumi crescenti di CH_3OH (fino ad arrivare al 5%) hanno portato al recupero di 480 mg (0.632 mmol) di prodotto **7** pulito, corrispondente ad una resa del 98%.

7: olio giallo, $R_f = 0.8$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 95:5 (v/v)].



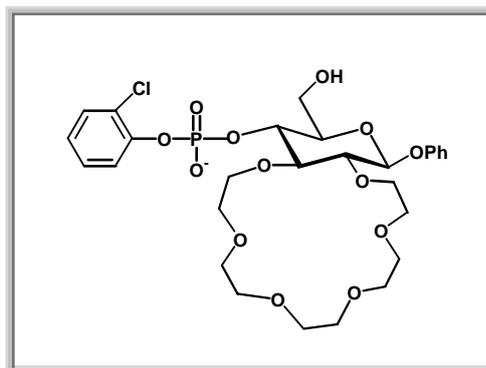
^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.45-6.75 (segnali complessi, 18H, protoni aromatici); 4.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-1); 4.27-4.23 [m, 1H, ($\text{CH}_2\text{CH}_a\text{O}$ -Gluc-C-2)]; 4.12-4.08 [m, 1H, ($\text{CH}_2\text{CH}_a\text{O}$ -Gluc-C-3)]; 4.02-3.98 [m, 1H, ($\text{CH}_b\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc-C-3)]; 3.93-3.88 [m, 1H, ($\text{CH}_a\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc-C-2)]; 3.77 (s, 6H, $2\times\text{OCH}_3$ del gruppo DMT); 3.73-3.62 [segnali sovrapposti, 16H, $4\times(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$]; 3.58 (tripletto apparente, $J = 10.0$ e 8.5 Hz, 1H, H-4); 3.53-3.48 [segnali sovrapposti, 2H, H-2 e H-5]; 3.45-3.42 (m, 1H, H-6_a); 3.37-3.31 (segnali sovrapposti, 2H, H-3 e H-6_b).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 175 MHz): δ 158.3, 157.8, 157.2, 154.6, 144.8, 136.7, 135.8, 134.5, 130.0, 129.3, 128.1, 127.7, 126.6, 125.0, 122.4, 118.0, 116.8 e 113.0 (carboni aromatici); 101.3 (C-1); 86.1 (C quaternario del gruppo DMT); 85.0 (C-3); 82.2 (C-5); 74.5 (C-2); 73.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc-C-2); 71.8, 71.3 e 71.2 [$(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc-C-3), $2\times(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc)]; 70.9, 70.8, 70.6, 70.5, 70.4 e 70.2 [$2\times(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$ e, sovrapposto, C-4]; 63.6 (C-6); 55.1 $2\times(\text{OCH}_3$ del gruppo DMT).

ESI-MS (ioni positivi): calcolato per $\text{C}_{43}\text{H}_{52}\text{O}_{12}$, 760.35; m/z , trovato 782.1 ($\text{M} + \text{Na}^+$).

SINTESI DEL DERIVATO 2: A 152 mg (0.201 mmol) di derivato **7** sciolto in 2.2 mL di piridina anidra, sono stati aggiunti 111 mg (1.61 mmol) di 1,2,4-triazolo previamente tenuti a seccare sotto vuoto. Sono stati poi aggiunti, a 0 °C, 225 μL (1.61 mmol) di TEA e 130 μL (0.804 mmol) di 2-clorofenildiclorofosfato. La miscela di reazione è stata, poi, lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente, controllando l'andamento della reazione mediante TLC, utilizzando come sistema eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 95:5 (v/v). Dopo 3 ore la miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta, ridisciolta in AcOEt, versata in un imbuto separatore e lavata due volte con una soluzione acquosa satura di NaCl. La successiva purificazione è stata effettuata su colonna di gel di silice, impaccata in CH_2Cl_2 contenente 0.1% di TFA (v/v). Mediante successive eluizioni con CH_2Cl_2 contenenti percentuali di CH_3OH crescenti (fino ad arrivare al 10%) sono stati recuperati 120 mg (0.185 mmol) di prodotto **2** pulito, corrispondenti ad una resa del 92%.

2: olio giallo, $R_f = 0.3$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 95:5 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.71-6.85 (segnali complessi, 9H, protoni aromatici); 4.96 (segnale slargato, 1H, H-1); 4.66-4.60 (m, 1H, H-4); 4.00-3.36 [segnali sovrapposti e slargati, 15H, H₂-6, H-2, H-5, 10x(OCH₂CH₂O) e H-3].

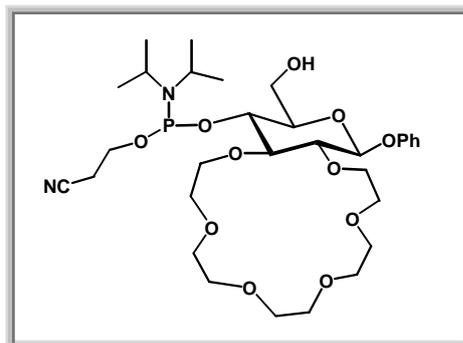
^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 157.4, 149.6, 129.4, 127.7, 125.1, 123.2, 122.5 e 116.8 (carboni aromatici); 101.6 (C-1); 83.2 (C-3); 80.0 (C-5); 76.2 (C-2); 70.9, 70.7, 70.0 e 69.5 [5x(OCH₂CH₂O) e, sovrapposto, C-4]; 60.6 (C-6).

^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz): δ -3.1.

ESI-MS (ioni negativi): calcolato per $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{ClO}_{12}\text{P}$, 648.17; m/z , trovato 648.88 (M-H^-).

SINTESI DEL DERIVATO 3: 175 mg di derivato **7** (0.231 mmol) sono stati sciolti in 2 mL di CH_2Cl_2 anidro e lasciato in presenza di setacci molecolari attivati. Sono stati poi aggiunti 320 μL (1.85 mmol) di DIPEA e, goccia a goccia, 205 μL (0.93 mmol) di 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilamminoclorofosforamidato, sotto flusso di azoto anidro. La reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente e controllata mediante TLC utilizzando come sistema eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 98:2 (v/v). Dopo due ore la reazione è stata interrotta e la miscela è stata concentrata a pressione ridotta. Il grezzo così ottenuto, seccato a pressione ridotta, è stato purificato su colonna di gel di silice impaccata in AcOEt/n -esano 7:3 (v/v) contenente 1% di TEA. Tramite eluizioni successive con AcOEt/n -esano, fino ad arrivare ad eluire con solo AcOEt contenente 1% di TEA, sono stati recuperati 213 mg (0.221 mmol) di prodotto **2** puro, corrispondenti ad una resa del 96%.

2: olio bianco, miscela di diastereoisomeri, $R_f = 0.8$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 95:5 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.44-6.70 (segnali complessi, 36H, protoni aromatici); 4.99 [m, 2H, 2x(H-1)]; 4.20-3.87 [segnali sovrapposti, 8H, 2x($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc-C-2) e 2x($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc-C-3)]; 3.75 [s, 12H, 4x(OCH_3 del gruppo DMT)]; 3.79-3.43 [segnali sovrapposti, 42H, 2x(H-4), 8x($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2x($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 2x(H-6)]; 3.42-3.22 {segnali sovrapposti, 10H, 2x(H-3); 2x(H-2); 2x(H-5), 2xN[$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$] $_2$ }; 2.75-2.55 [m, 4H, 2x($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$)]; 1.32-0.84 {segnali sovrapposti, 24H, 2xN[$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$] $_2$ }.

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 158.2, 157.2, 157.1, 145.0, 144.9, 136.2, 136.1, 136.0, 135.8, 130.1, 130.0, 129.3, 128.2, 128.1, 127.5, 126.5, 122.3, 116.7, 116.6 e 112.8 (carboni aromatici); 117.6 e 117.2 (CN); 101.0 e 100.9 (C-1); 85.8 e 85.7 (C quaternari del DMT); 84.8 e 84.1 (C-3); 82.5 e 82.4 (C-5); 75.3 e 75.2 (C-2); 72.6, 72.5, 72.3 e 72.2 [2x($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc-C-2) e 2x($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc-C-3)]; 70.8, 70.7, 70.6, 70.5, 70.5 e 70.4 [8x($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$)]; 70.2 [2x(C-4)]; 63.6 e 63.2 (C-6); 58.4 e 58.2 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$); 55.0 [4x(OCH_3 del gruppo DMT)]; 42.9, e 42.7 {N[$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$] $_2$ }; 24.3 e 24.2 {N[$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$] $_2$ }; 22.8 e 22.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$).

^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz): δ 151.1 e 150.4.

ESI-MS (ioni positivi): calcolato per $\text{C}_{52}\text{H}_{69}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}$, 960.45; m/z , trovato 982.79 ($\text{M} + \text{Na}^+$).

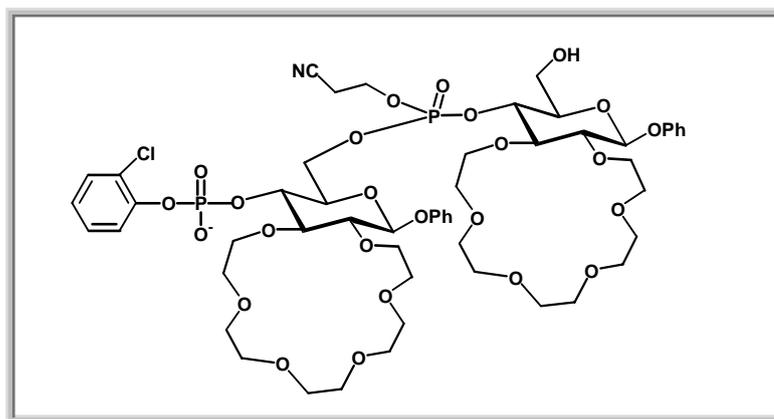
SINTESI DEL DIMERO LINEARE 8:

120 mg (0.185 mmol) del derivato **2** e 213 mg (0.222 mmol) del derivato **3** sono stati introdotti in uno stesso pallone di reazione ed anidrificati per ripetute coevaporate con CH_3CN anidro sotto vuoto. Sono stati, quindi, aggiunti 6 mL di una soluzione 0.25 M di DCI in CH_3CN precedentemente tenuta a contatto con setacci molecolari attivati. La reazione è stata tenuta sotto agitazione per 3 ore a temperatura ambiente. L'andamento della reazione è stato seguito mediante TLC utilizzando come sistema eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 95:5 (v/v). Dopo 3 ore è stata effettuata, quindi, la reazione di ossidazione aggiungendo 425 μL di una soluzione 5.5 M di *t*-ButOOH in *n*-decano. Dopo 30 minuti la miscela di reazione è stata concentrata, ridisciolta in CH_2Cl_2 , versata in un imbuto separatore e lavata due volte con una soluzione

acquosa satura di NaCl. La fase organica è stata anidrificata su sodio solfato anidro, filtrata e concentrata. La purificazione è stata effettuata mediante cromatografia su colonna di gel di silice impaccata con CH_2Cl_2 con l'aggiunta di 1% di Py (v/v). Mediante eluizioni con CH_2Cl_2 contenente volumi di CH_3OH crescenti fino ad arrivare al 5% di CH_3OH , addizionato dell'1% di Py (v/v), sono stati recuperati 140 mg (0.092 mmol) di prodotto **8** puro, corrispondente ad una resa del 50%,.

Il prodotto così ottenuto è stato messo a reagire con 3 mL di una soluzione 1% di TCA in CH_2Cl_2 (v/v) per 30 min a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata seccata sotto vuoto e purificata su colonna di gel di silice impaccata con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 98:2 (v/v) ed eluita con CH_2Cl_2 contenente percentuali crescenti di CH_3OH fino al 10%. Sono stati recuperati 113 mg (0.092 mmol) di prodotto pulito **8**, corrispondenti ad una resa pressoché quantitativa.

8: olio giallo, $R_f = 0.3$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 95:5 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): segnali molto slargati e non risolti; δ 7.77-6.98 (segnali sovrapposti, 14H, protoni aromatici); 4.85 [segnale slargato, 2H, 2x(H-1)]; 4.65-3.32 [segnali sovrapposti, 48H, 2x($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc-C-2) e 2x($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Gluc-C-3); 2x(H-4); 2x(H₂-6), 8x($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) e ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$)]; 3.07-2.50 [segnali sovrapposti, 8H, 2x(H-2), 2x(H-5), 2x(H-3) e ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$)].

^{13}C NMR (CDCl_3 , 175 MHz): δ 156.9, 149.8, 135.7, 129.5, 127.4, 123.6, 122.8 e 117.0 (C aromatici); 101.8 e 101.6 (C-1); segnale slargato centrato a 81.8 [2x(C-5) e 2x(C-2)]; segnale slargato centrato a 70.4 [10x($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2x(C-3) e 2x(C-4)]; 65.3 [(C-6) vicino al fosfato]; 62.0 [(C-6) legato all'OH]; 60.8 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$); 29.5 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$).

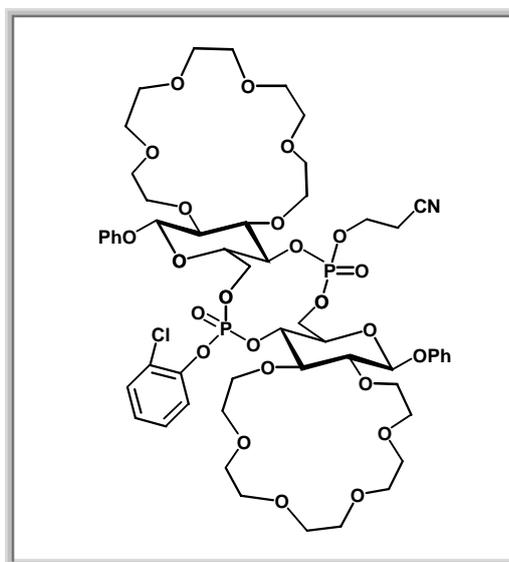
^{31}P NMR (CDCl_3 , 161.98 MHz): segnali sovrapposti e slargati, centrati a -6.9.

MALDI-MS (ioni positivi): calcolato per $\text{C}_{52}\text{H}_{73}\text{ClNO}_{25}\text{P}_2$, 1220.36; m/z , trovato 1243.67 (M + Na^+).

SINTESI DEL DIMERO CICLICO 9:

30 mg (0.0245 mmol) di derivato **8** sono stati sciolti in 23 mL di piridina anidra. Sono, quindi, stati aggiunti, nell'ordine, 3 mg di DMAP (0.02 mmol) e 218 mg (0.74 mmol) di 1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazolo (MSNT). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 12 ore a temperatura ambiente, su setacci molecolari attivati e controllata mediante TLC utilizzando come sistema eluente CH₂Cl₂/CH₃OH 95:5 (v/v). La miscela di reazione, portata a secco a pressione ridotta, è stata poi diluita con CH₂Cl₂, versata in un imbuto separatore e lavata due volte con una soluzione acquosa satura di NaCl. La fase organica è stata anidrificata su sodio solfato anidro, filtrata e purificata su colonna di gel di silice impaccata con CH₂Cl₂ ed eluita con CH₂Cl₂ contenente volumi crescenti di CH₃OH, fino ad arrivare al 15%. Sono stati recuperati 24 mg (0.019 mmol) di prodotto **9** pulito, corrispondenti ad una resa dell'83%.

9: olio giallo, miscela di diastereoisomeri, $R_f = 0.5$ [CH₂Cl₂/CH₃OH, 95:5 (v/v)].



¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 7.49-6.87 (segnali complessi, 28H, protoni aromatici); 5.23-5.08 [segnali sovrapposti, 4H, 4x(H-1)]; 4.59-4.34 [segnali sovrapposti, 12H, 4x(CH₂CH₂O-Gluc-C-2) e 2x(OCH₂CH₂CN)]; 4.18-3.40 [segnali sovrapposti, 96H, 4x(CH₂CH₂O-Gluc-C-3); 4x(H-3); 2x(H-4); 16x(OCH₂CH₂O); 4x(H₂-6); 4x(H-2); 4x(H-5); 2.78 [m, 4H, 2x(OCH₂CH₂CN)].

¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ 165.1, 158.7, 147.2, 140.8, 138.7, 133.3, 132.2, 131.5, 131.2, 129.7, 128.4, 123.8, 123.2, 124.5, 118.4, 118.2 e 117.9 (carboni aromatici); 102.9 e 102.4 (C-1); 83.0, 81.8, 80.0, 79.7 e 79.4 (C-3 e C-5); 76.9 e 76.7 (C-2); 74.0, 73.5, 71.9

[2x(OCH₂CH₂O) e (C-4)]; 69.9, 68.4, 68.0 e 67.5 (C-6); 64.9 [2x(OCH₂CH₂CN)]; 31.2 [2x(OCH₂CH₂CN)].

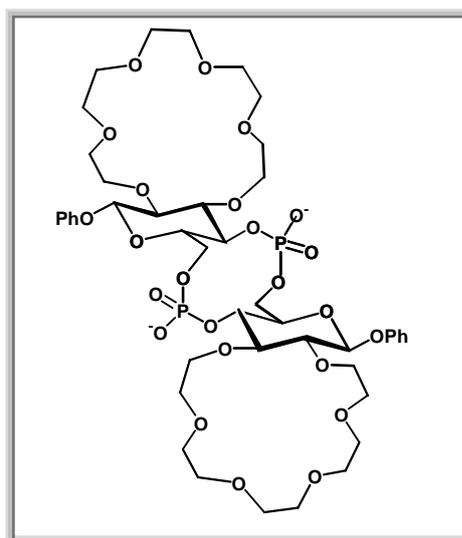
³¹P NMR (CD₃OD, 161.98 MHz): δ -1.25, -3.10, -3.59 e -5.70.

MALDI-MS (ioni positivi): calcolato per C₅₃H₇₂ClNO₂₄P₂, 1203.36; *m/z*, trovato 1242.37 (M + K⁺).

SINTESI DEL CROWN-CYPLOS 1

24 mg (0.019 mmol) di prodotto **9** sono stati sciolti in 500 μL di piperidina anidra e lasciati sotto agitazione per 12 ore a 60 °C. Il controllo della reazione è stato effettuato mediante TLC utilizzando come sistema eluente CH₂Cl₂/CH₃OH, 85:15 (v/v). Dopo aver verificato la totale scomparsa del prodotto di partenza, la miscela di reazione è stata quindi seccata, ridisciolta in 500 μL di idrossido di ammonio e lasciata sotto agitazione a 60 °C per altre 12 ore. La reazione è stata controllata mediante TLC utilizzando come sistema eluente CH₂Cl₂/CH₃OH, 7:3 (v/v). La miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta, il residuo ridisciolto in H₂O e purificato su colonna ad esclusione molecolare Sephadex G25, eluita con H₂O/EtOH 4:1 (v/v). Da controllo per via spettrofotometrica, le frazioni che mostravano assorbimento a λ = 264 nm sono state riunite e portate a secco, fornendo 15 mg (0.014 mmol) di composto **1** puro, con una resa del 73% per i due step di sintesi.

1: olio bianco, sale di ammonio, *R_f* = 0.3 [CH₂Cl₂/ CH₃OH, 85:15 (v/v)].



¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 7.48-7.19 (segnali complessi, 10H, protoni aromatici); 5.37 [d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2x(H-1)]; 4.39-3.93 [segnali sovrapposti, 8H, 2x(CH₂CH₂O-Gluc-C-2) e 2x(CH₂CH₂O-Gluc-C-3)]; 4.21 [m, 2H, 2x(H-4)]; 3.86 [m, 2H, 2x(H-3)]; 3.74-3.63 [segnali

sovrapposti, 36H, 8x(OCH₂CH₂O) e 2x(H₂-6)]; 3.71-3.67 [segnali sovrapposti, 4H, 2x(H-2), 2x(H-5)].

³¹P NMR (CD₃OD, 161.98 MHz): δ 0.087.

ESI-MS (ioni negativi): calcolato per C₄₆H₆₄O₂₄P₂, 1038.36; *m/z*, trovato 1038.79 (M – H)⁻; 517.82 (M – 2H)²⁻.

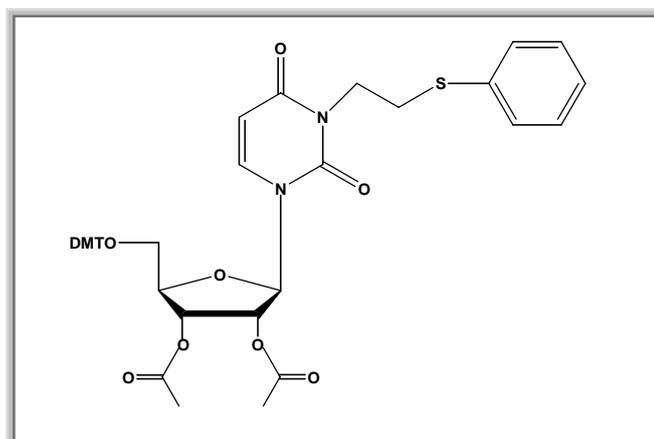
SINTESI DELL'URIDINA CROWN 10

SINTESI DI 12: 500 mg (0.92 mmol) di 5'-*O*-dimetossitriifenilmetil-uridina sono stati trattati con 3 mL di piridina e 1.5 mL di anidride acetica a temperatura ambiente. La reazione è stata tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente e monitorata per TLC, utilizzando come sistema eluente CHCl₃/ CH₃OH 95:5, (v/v) fino a scomparsa del prodotto di partenza. La miscela è stata, quindi, portata a secco sotto pressione ridotta, diluita con CH₂Cl₂, versata in un imbuto separatore e lavata due volte con acqua. La fase organica è stata recuperata, anidrificata su sodio solfato anidro, filtrata, seccata sotto vuoto e purificata mediante colonna di gel di silice eluita con CH₂Cl₂ contenente percentuali crescenti di CH₃OH (da 0 a 5%), in presenza di alcune gocce di TEA. Sono stati, così, recuperati 576 mg (0.92 mmol) di prodotto **11**, corrispondente ad una resa quasi quantitativa.

Il derivato **11** è stato sciolto in 3 mL di benzene anidro e trattato con 2-(feniltio)-etanolo (80 μ L, 0.73 mmol) e tributilfosfina (270 μ L, 1.1 mmol) a 0 °C sotto agitazione. Dopo 10 minuti il sistema è stato portato a temperatura ambiente e sono stati aggiunti 280 mg di ADDP (1.1 mmol), lasciando la miscela sotto agitazione per 18 ore.

La reazione è stata interrotta portando a secco sotto pressione ridotta la miscela e lavando il grezzo, ridisciolto in acetato di etile, con acqua. La fase organica è stata recuperata, anidrificata su sodio solfato anidro, filtrata, seccata sotto vuoto e purificata mediante colonna di gel di silice eluita con *n*-esano/acetato di etile, 3:2 (v/v). Sono stati recuperati 639 mg (0.82 mmol) del composto **12** puro, con una resa del 90%.

12: olio, *R_f* = 0.3 [*n*-esano/acetato, 7:3 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.67 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-6-*Uridina*); 7.44-6.83 (segnali sovrapposti, 18H, protoni aromatici); 6.22 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, H-1'); 5.60-5.54 (segnali sovrapposti, 2H, H-2' e H-3'); 5.37 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-5-*Uridina*); 4.23 (m, 1H, H-4'); 4.17-4.13 [m, 2H, (Ph-S-CH₂-CH₂-N-*Uridina*)]; 3.78 [s, 6H, 2x(OCH₃ del gruppo *DMTr*)]; 3.51-3.45 (m, 2H, H₂-5'); 3.15 [t, $J = 7.5$ e 7.0 Hz, 2H, (Ph-S-CH₂-CH₂-N-*Uridina*)]; 2.10 [s, 6H, 2x(CH₃C=O)].

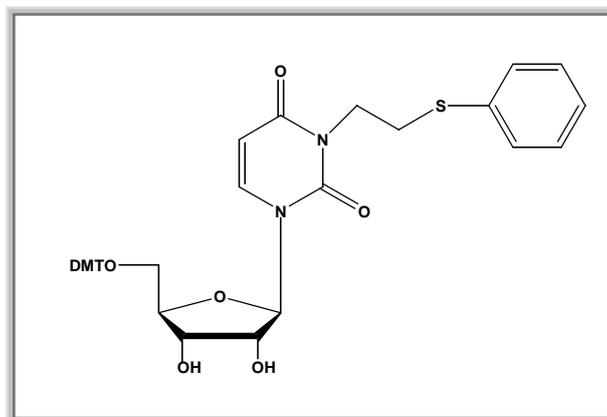
^{13}C NMR (CDCl_3 , 175 MHz): δ 169.5 e 169.4 [2x(CH₃C=O)]; 162.0 (C-4); 143.7 (C-6); 150.8 (C-2); 137.6, 135.4, 134.9, 134.8, 134.6, 130.0, 129.8, 128.8, 127.9, 128.4, 127.1, 126.3, 125.7 e 113.2 (C aromatici); 102.2 (C-5); 87.3 (C-quaternario del *DMTr*); 86.4 (C-1'); 81.6 (C-4'); 73.0 (C-3'); 70.7 (C-2'); 62.2 (C-5'); 55.1 [2x(OCH₃ del gruppo *DMTr*)]; 40.6 (Ph-S-CH₂-CH₂-N-*Uridina*); 29.5 (Ph-S-CH₂-CH₂-N-*Uridina*); 20.4 e 20.3 [2x(CH₃C=O)].

MALDI-MS (ioni positivi): calcolato per C₄₂H₄₂N₂O₁₀S, 766.26; m/z , trovato 486.26 [(M - DMT) + Na⁺] e 502.45 [(M - DMT) + K⁺].

SINTESI DI 13: 639 mg del derivato **12** (0.82 mmol) sono stati sciolti in 5 mL di una soluzione 2 M di NaOH in diossano/H₂O, 1:1 (v/v) e tenuti sotto agitazione per 8 ore a 50 °C. Dopo aver allontanato il diossano sotto pressione ridotta, il grezzo di reazione è stato ridisciolti in CH₂Cl₂ e lavato due volte con acqua. La fase organica è stata recuperata, anidrificata su sodio solfato anidro, filtrata, seccata sotto vuoto e purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice eluita in CH₂Cl₂ con percentuali crescenti di CH₃OH (da 0 a 5%), in presenza di alcune gocce di TEA.

Il derivato **13** è stato ottenuto in forma pura con una resa pressochè quantitativa (550 mg, 0.80 mmol).

13: olio, $R_f = 0.5$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 97:3 (v/v)].



^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.80 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-6-*Uridina*); 7.64-6.81 (segnali sovrapposti, 18H, protoni aromatici); 5.86 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-1'); 5.65 [banda slargata, 2H, 2x(OH)]; 5.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5-*Uridina*); 4.37 (t, $J = 5.0$ e 5.0 Hz, 1H, H-3'); 4.24 (tripletto apparente, $J = 3.5$ e 4.0 Hz, 1H, H-2'); 4.19-4.14 [segnali sovrapposti, 3H, (Ph-S- CH_2 - CH_2 -N-*Uridina*) e H-4']; 3.47-3.43 (m, 2H, H₂-5'); 3.16 [tripletto apparente, $J = 5.5$ e 7.5 Hz, 2H, (Ph-S- CH_2 - CH_2 -N-*Uridina*)].

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ 162.3 (C-4); 151.0 (C-2); 144.2 (C-6); 158.5, 138.1, 135.2, 129.9, 128.8, 128.4, 128.0, 127.8, 126.9, 125.8, 123.8 e 113.1 (C aromatici); 101.3 (C-5); 91.0 (C-1'); 83.9 (C-4'); 75.2 (C-2'); 69.7 (C-3'); 62.1 (C-5'); 55.0 [2x(OCH₃ del gruppo *DMTr*)]; 40.4 (Ph-S- CH_2 - CH_2 -N-*Uridina*); 29.7 (Ph-S- CH_2 - CH_2 -N-*Uridina*).

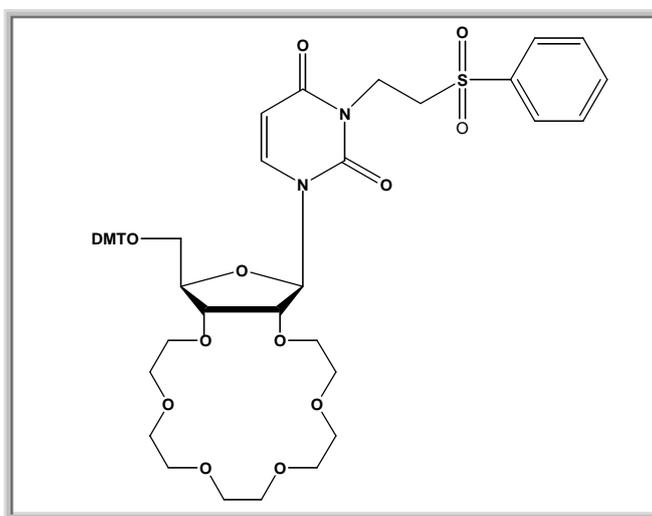
MALDI-MS (ioni positivi): calcolato per $\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$, 682.23; m/z , trovato 402.23 [(M - DMT) + Na^+] e 418.23 [(M - DMT) + K^+].

SINTESI DI 14: A 550 mg (0.80 mmol) del derivato **13**, sciolti in 17 mL di THF anidro, sono stati aggiunti 96 mg di NaH (sospensione al 60% in olio minerale, 4.00 mmol); dopo 10 minuti sono stati aggiunti 655 mg di pentaetilenglicole ditosilato (1.2 mmol) e la miscela è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente. Dopo 20 minuti sono stati aggiunti 12 mL di THF anidro e la reazione è stata lasciata a ricadere per 12 ore. Alla scomparsa del prodotto di partenza, valutata monitorando la reazione mediante TLC in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 97:3,

sono stati aggiunti nell'ambiente di reazione 412 mg (2.4 mmol) di MCPBA e la miscela è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per un'ora.

Dopo aver allontanato il THF sotto pressione ridotta, la miscela di reazione è stata ridisciolta in CH_2Cl_2 e lavata due volte con una soluzione acquosa satura di NaHCO_3 . La fase organica è stata recuperata, anidrificata su sodio solfato anidro, filtrata, seccata sotto vuoto e purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice eluita con CH_2Cl_2 contenente percentuali crescenti di CH_3OH (da 0 a 5%), in presenza di alcune gocce di TEA. Sono stati recuperati 512 mg (0.56 mmol) del derivato **14** con una resa del 70% per i due step di sintesi.

14: olio, $R_f = 0.3$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 97:3 (v/v)].



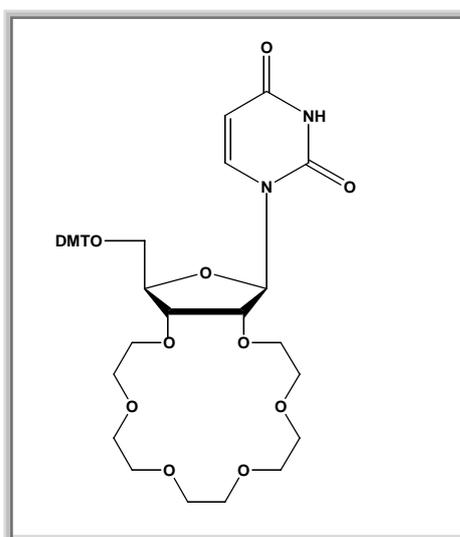
^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.97 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-6-Uridina); 7.90-6.82 (segnali sovrapposti, 18H, protoni aromatici); 5.87 (singoletto slargato, 1H, H-1'); 5.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5-Uridina); 4.53 (tripletto apparente, $J = 4.5$ e 4.0 Hz, 1H, H-2'); 4.37 (t, $J = 5.0$ e 5.0 Hz, 1H, H-3'); 4.26 [t, $J = 7.0$ e 7.0 Hz, 2H, (Ph-SO₂-CH₂-CH₂-N-Uridina)]; 4.21 (m, 1H, H-4'); 3.98-3.57 [segnali sovrapposti, 22H, 5x(O-CH₂-CH₂-O) e H₂-5']; 3.49 [t, $J = 7.0$ e 7.0 Hz, 2H, (Ph-SO₂-CH₂-CH₂-N-Uridina)].

^{13}C NMR (CDCl_3 , 175 MHz): δ 161.9 (C-4); 150.1 (C-2); 144.3 (C-6); 158.5, 138.9, 138.4, 135.3, 135.1, 133.7, 129.9, 129.6, 129.1, 128.0, 127.8, 126.9 e 113.1 (C aromatici); 100.9 (C-5); 89.0 (C-1'); 86.7 (C-4' e C quaternario del gruppo *DMTr*); 80.9 (C-2'); 75.3 (C-3'); 70.6, 70.4, 70.3, 69.6 e 69.3 [5x(O-CH₂-CH₂-O)]; 60.7 (C-5'); 55.0 (OCH₃ del gruppo *DMTr*); 52.4 (Ph-SO₂-CH₂-CH₂-N-Uridina); 34.6 (Ph-SO₂-CH₂-CH₂-N-Uridina).

MALDI-MS (ioni positivi): calcolato per $\text{C}_{47}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{S}$, 916.37; m/z , trovato 636.68 [(M - DMT) + Na^+] e 652.77 [(M - DMT) + K^+].

SINTESI DI 15: 512 mg (0.56 mmol) del derivato **14** sono stati trattati con 5 mL di una soluzione 2 M di NaOH in diossano/H₂O, 1:1 (v/v) e tenuti sotto agitazione per 8 ore a 50 °C. Dopo aver allontanato il diossano sotto pressione ridotta, la miscela di reazione è stata ridisciolta in CH₂Cl₂ e lavata due volte con acqua. La fase organica è stata recuperata, anidrificata su sodio solfato anidro, filtrata, seccata sotto vuoto e purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice eluita con CH₂Cl₂ contenente percentuali crescenti di CH₃OH (da 0 a 5%), in presenza di alcune gocce di TEA, ottenendo così il composto **15** in forma pura (400 mg 0.53 mmol) con una resa pressochè quantitativa.

15: olio, $R_f = 0.3$ [CH₂Cl₂/CH₃OH, 95:5 (v/v)].



¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 8.09 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-6-Uridina); 7.92-6.83 (segnali sovrapposti, 13H, protoni aromatici); 5.94 (singoletto slargato, 1H, H-1'); 5.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5-Uridina); 4.35 (m, 1H, H-3'); 4.23-4.21 (segnale slargato, 2H, H-2' e H-4'); 3.96-3.59 [segnali sovrapposti, 20H, 5x(O-CH₂-CH₂-O)]; 3.79 (s, 6H, 2x(OCH₃)); 3.56-3.45 (m, 2H, H₂-5').

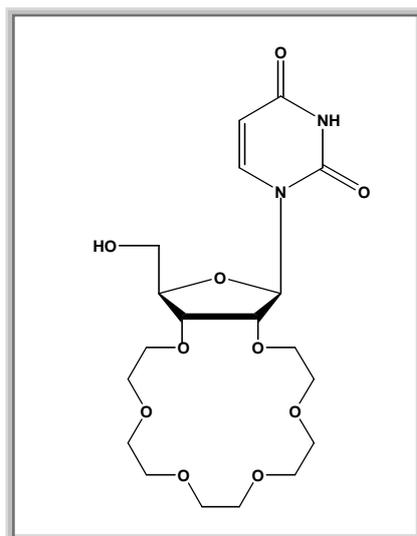
¹³C NMR (CDCl₃, 175 MHz): δ 162.7 (C-4); 149.6 (C-2); 144.3 (C-6); 158.5, 140.2, 135.2, 135.0, 130.0, 129.4, 128.0, 127.9, 127.0 e 113.1 (C aromatici); 101.7 (C-5); 88.3 (C-1'); 86.8 (C quaternario del gruppo *DMTr*); 81.0 (C-2'); 79.9 (C-4'); 75.4 (C-3'); 70.6 70.4, 70.3, 69.7, 69.4 [5x(O-CH₂-CH₂-O)]; 60.7 (C-5'); 55.1 (OCH₃ del gruppo *DMTr*).

MALDI-MS (ioni positivi): calcolato per C₃₉H₄₈N₂O₁₂, 748.34; m/z , trovato 468.49 [(M - DMT) + Na⁺] e 484.45 [(M - DMT) + K⁺].

SINTESI DI 10: 100 mg (0.001 mmol) del composto **15** sono stati trattati con 1 mL di una soluzione di TFA all'1% in CH₂Cl₂ per 30 minuti a temperatura ambiente. La miscela di

reazione è stata poi concentrata sotto pressione ridotta, ridisciolta in etere etilico e lavata due volte con acqua bidistillata. La fase acquosa è stata portata a secco sotto pressione ridotta e purificata su colonna ad esclusione molecolare Sephadex G25, eluita con H₂O/EtOH 4:1 (v/v). Da controllo per via spettrofotometrica, le frazioni che mostravano assorbimento a $\lambda = 264$ nm sono state riunite e portate a secco, fornendo 40 mg (0.001 mmol) di composto **10** puro con una resa presocchè quantitativa.

10: olio bianco, $R_f = 0.3$ [CH₂Cl₂/CH₃OH, 7:3 (v/v)].



¹H NMR (D₂O, 500 MHz): δ 7.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-6-Uridina); 6.06 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-1'); 5.88 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5-Uridina); 4.33 (dd, $J = 5.5$ e 3.5 Hz, 1H, H-2'); 4.26-4.24 (m, 1H, H-4'); 4.13 (dd, $J = 5.5$ e 6.0 Hz, 1H, H-3'); 3.98-3.95 (ramo AB di un sistema ABX, $J = 3.0$ e 12.0 Hz, H-5_a'); 3.93-3.90 (m, 2H, H-5_b'); 3.85-3.69 [segnali sovrapposti, 20H, 5x(O-CH₂-CH₂-O)].

¹³C NMR (D₂O, 175 MHz): δ 161.7 (C-4); 152.0 (C-2); 143.4 (C-6); 104.8 (C-5); 90.5 (C-1'); 84.3 (C-4'); 82.4 (C-2'); 78.6 (C-3'); 72.4, 72.3, 72.1, 72.0, 71.8 e 71.7 [5x(O-CH₂-CH₂-O)]; 63.0 (C-5').

MALDI-MS (ioni positivi): calcolato per C₁₉H₃₀N₂O₁₀, 446.18; m/z , trovato 468.90 (M + Na⁺) e 484.85 (M + K⁺).

CONCLUSIONI

Oggetto di questo lavoro di ricerca è stato la sintesi e la caratterizzazione di nuovi macrocicli anfifilici, costituiti da uno scheletro disaccaridico formato da due unità fenil- β -D-glucopiranosidiche legate mediante ponti 4,6-fosfodiesteri, derivatizzate con catene a diverso grado di lipoficità (CyPLOS anfifilici, *Cyclic Phosphate-Linked Oligosaccharides*).

Tali composti sono stati sintetizzati allo scopo di ottenere nuovi ionofori artificiali, molecole in grado di assicurare il trasporto di ioni di interesse biologico attraverso le membrane cellulari. La progettazione di questi potenziali ionofori si è basata sull'impiego di un macrociclo, formato da unità saccaridiche biocompatibili legate attraverso legami fosfodiesteri (*Figura 1*), chimicamente ed enzimaticamente stabili, carichi negativamente in un ampio intervallo di pH, che possono fungere sia da sito di legame per cationi, sia da unità di ancoraggio dello ionoforo –una volta strutturatosi nel doppio strato fosfolipidico– all'interfaccia membrana-acqua.

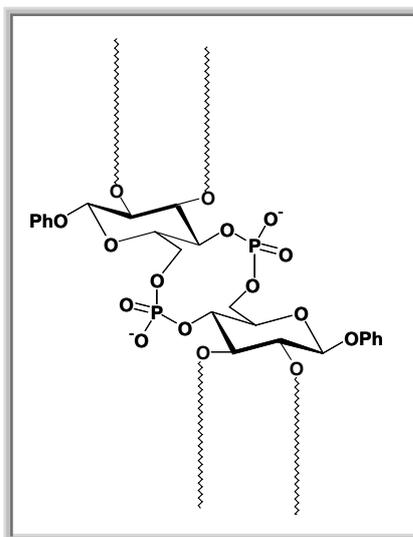


Figura 1 – Struttura generale del CyPLOS anfifilico

Altro motivo strutturale essenziale di queste molecole è la presenza di catene lineari lipofile sugli ossidrili in posizione 2 e 3 delle unità saccaridiche che, rendendo complessivamente anfifilica la molecola e promuovendo la formazione di superstrutture (quali micelle inverse o altri sistemi), hanno lo scopo di inserirsi all'interno del doppio strato fosfolipidico e consentire il passaggio degli ioni.

In particolare è stata realizzata la sintesi dei derivati **1a**, **1b**, **1c** e **6** (Figura 2); quest'ultimo rappresenta un analogo del macrociclo **1b** recante all'estremità dei tentacoli lipofili residui di dansile, fluorofori utili per studi di riconoscimento specifico.

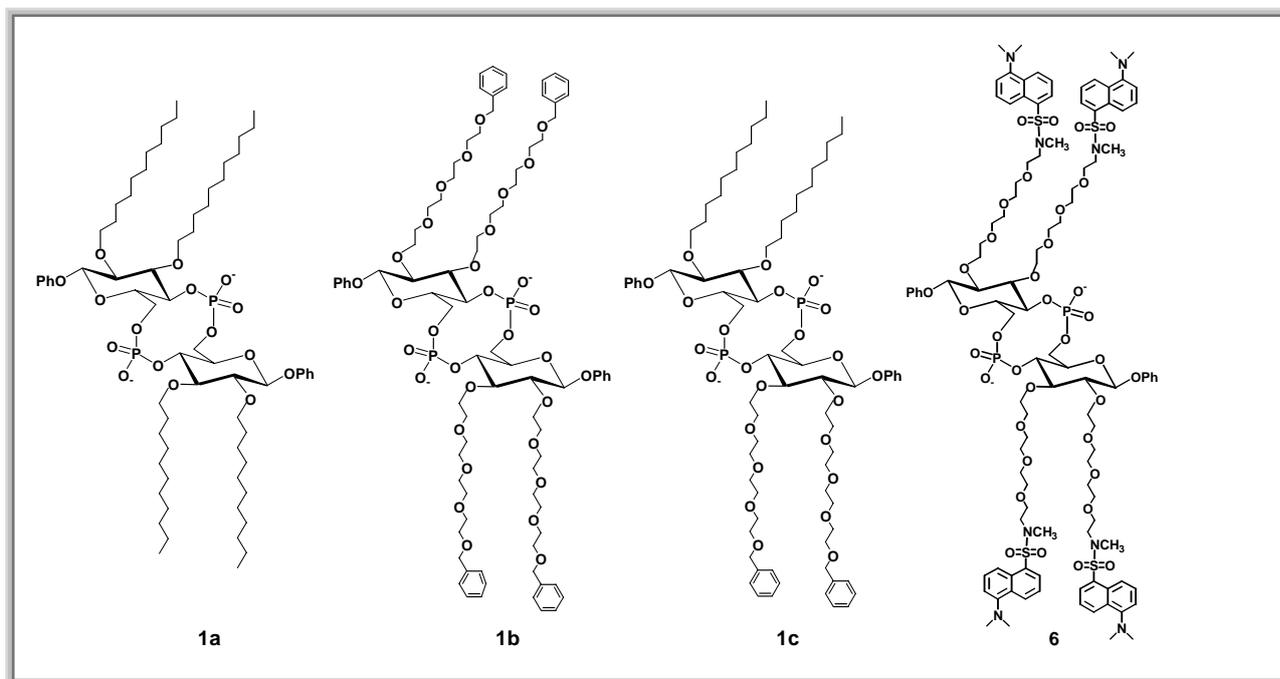


Figura 2 – CyPLOS anfifilici sintetizzati

L'inserimento delle catene lipofile sulle unità saccaridiche è stato realizzato mediante classica reazione di *Williamson*. Per la preparazione dei macrocicli è stata sfruttata ed ottimizzata una chimica nota nelle strategie di sintesi in fase solida di oligonucleotidi: la chimica del fosorammidito, per le reazioni di dimerizzazione, e la chimica del fosfortriestere, nei passaggi di ciclizzazione.

I composti finali sono risultati solubili in solventi organici mostrando buone capacità di auto-aggregazione, studiate mediante spettroscopia ^1H - e ^{31}P -NMR al variare della temperatura e della concentrazione.

Pertanto, seguendo la variazione della larghezza delle linee spettrali degli spettri NMR al variare della concentrazione è stato possibile definire, per questi composti, i valori di concentrazione di aggregazione critica (*c.a.c.*) che hanno mostrato i composti **1b**, **1c**, e **6** caratterizzati da una maggiore propensione a formare larghi aggregati stabili.

Di questi macrocicli sono state studiate la capacità di inserirsi in un doppio strato fosfolipidico e funzionare come trasportatori di ioni.

Un plausibile modello di azione per questi ionofori prevede che la porzione anionica del macrociclo sia disposta sulla superficie polare della membrana ed i tentacoli anfifilici siano inseriti all'interno del *core* idrofobico della membrana. I dati di attività ionofora per i derivati **1a**, **1b** e **1c** hanno mostrato il CyPLOS **1b** come il più attivo evidenziando, inoltre, che la specie coinvolta nel processo di trasporto è monomericamente.

Su questo derivato sono stati, quindi, concentrati i nostri sforzi e sono stati condotti studi di selettività nei confronti di vari cationi e anioni. Variando la natura dei cationi presenti in soluzione (metalli alcalini appartenenti al gruppo I), non si è notata significativa discriminazione da parte dello ionoforo, mentre maggiore selettività è stata riscontrata nei confronti degli anioni, con gli alogenuri (Br^- , I^- , Cl^-), e ioni NO_3^- e ClO_4^- efficacemente trasportati.

Sul macrociclo **6** sono tuttora in corso studi per saggiarne l'attività ionofora. Spettri di fluorescenza, registrati su tale molecola in vari sistemi solventi, hanno mostrato che i residui di dansile presenti sono molto sensibili alla polarità del mezzo in cui sono dispersi, potendo quindi funzionare come utili *probe* per monitorare la localizzazione dello ionoforo in membrana e, quindi, fornire utili informazioni sull'attività ed il suo meccanismo d'azione.

Su questi quattro derivati sono, attualmente, in corso studi di caratterizzazione microstrutturale, mediante approfondite analisi chimico-fisiche, basate su tecniche quali *static* e *dynamic light scattering*, *scattering* di neutroni (*SANS*) e microscopia a trasmissione elettronica (*cryo-TEM*), per studiare in dettaglio la formazione di super-strutture stabili in acqua, in soluzioni acquose pseudo-fisiologiche ed in solventi organici.

Parallelamente ai CyPLOS anfifilici, è stata realizzata la sintesi del derivato **1**, da noi denominato crown-CyPLOS (*Figura 3*), per il quale è stata utilizzata una strategia sintetica analoga a quella già precedentemente messa a punto per i CyPLOS anfifilici.

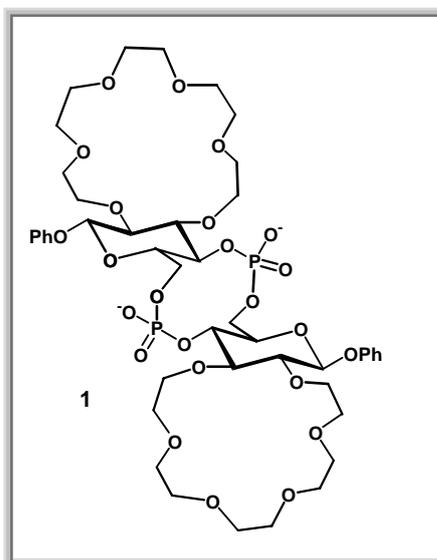


Figura 3 – crown-CyPLOS **1**

Questo disaccaride presenta due motivi strutturali peculiari: la presenza di ponti fosfodiesterici tra le unità glucosidiche 4,6-legate costituenti il macrociclo, e gli ossidrili in posizione 2 e 3 di ciascun monomero impegnati in una struttura mimica del [18]-crown-[6], quale potenziale ligando di cationi di interesse biologico.

A differenza dei CyPLOS anfifilici, questo composto ciclico non è solubile in solventi organici e non ha mostrato capacità di auto-aggregazione, il che non ha consentito lo studio dell'attività ionofora, non essendo in grado di ripartirsi nei sistemi mimici di membrana.

Su questo nuovo derivato macrociclico sono attualmente in corso, in collaborazione con laboratori specializzati, saggi di attività antibiotica, antivirale e antitumorale. Attualmente sono disponibili dati di attività antifungina, saggiata su una serie di isolati clinici della specie *Candida*, che hanno mostrato per il composto **1** solo una limitata attività (max. inibizione 20% per conc. 10 μ M) nei confronti delle specie *Candida krusei* e *Candida glabrata*.

Per quanto riguarda, quindi, i CyPLOS anfifilici possiamo concludere dicendo che con questo lavoro sono state progettate, sintetizzate delle nuove molecole anfifiliche, ionofori artificiali per cationi di interesse biologico.

Sono state inoltre studiate le loro proprietà di auto-aggregazione, determinandone i valori di *c.a.c.*, la loro attività ionofora e biologica.

Più in generale, da un punto di vista sintetico, è stata messa a punto una nuova strategia sintetica generale per la formazione di nuovi macrocicli a struttura saccaridica in cui è possibile variare a piacimento:

- la natura dello scheletro saccaridico;
- la posizione dei ponti fosfodiesterici fra le varie unità saccaridici;
- la natura dei tentacoli che conferiscono anfifilicità.

Inoltre, nel corso di questo lavoro di ricerca, è stato iniziato uno studio volto alla sintesi di nuovi nucleosidi modificati, aventi unità di eteri corona fusi sull'anello furanosico.

E' stato sintetizzato, in sei step e con una resa totale del 45%, il derivato uridina-crown **10** (Figura 4) che ha previsto, come passaggio cruciale, l'inserimento di un gruppo protettore del tipo "safety cath", il 2-(feniltio)-etile, per mascherare in maniera transiente la nucleobase e consentire la successiva elaborazione sintetica del residuo ribosidico.

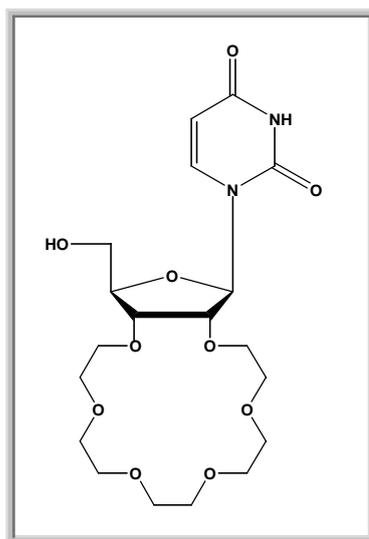


Figura 4 – Uridina-crown **10**

Ci si aspetta che anelli di ampie dimensioni, come gli eteri corona, pur convertendo il nucleoside in un sistema biciclico, possano solo parzialmente bloccare gli equilibri conformazionali del ribosio lasciando, quindi, pressochè immutate le loro capacità di riconoscimento da parte delle chinasi cellulari, enzimi chiave nella trasformazione di profarmaci nucleosidici in metaboliti nucleotidici dotati di proprietà farmacologiche.

D'altro canto, le eccellenti capacità leganti degli eteri corona nei confronti di cationi di interesse biologico, come Na^+ e K^+ , possono significativamente aumentare le capacità antimicrobiche, antivirali e/o antifungine dei nucleosidi, così modificati.

Per il derivato **10** sono, attualmente, in corso studi di attività biologica su varie linee cellulari.