

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

FEDERICO II

Facoltà di Farmacia



DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO

XXVI CICLO - 2011/2014

***“Strategie sintetiche per l’ottenimento di glicoglicerolipidi
bioattivi”***

Dr. Dario Pagano

Tutor

Dr.Emiliano Manzo

Prof.ssa Maria Valeria D’Auria

Coordinatore

Prof.ssa Maria Valeria D’Auria

INDICE

INTRODUZIONE	5
CAPITOLO 1: Derivati lipidici e bioattività	8
1.1. <i>I lipidi bioattivi</i>	8
1.2. <i>I glicoglicerolipidi</i>	10
1.2.1. β -Galattosil- e β -Glucosil- 1,2-O-diacilgliceroli	11
1.2.2. α -6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli	12
1.2.3. β -6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli	13
1.3. <i>Obiettivo del lavoro</i>	15
CAPITOLO 2: Sintesi dei derivati glicoglicerolipidici	16
2.1. <i>L'approccio sintetico</i>	16
2.2. <i>Sintesi di β-Glucosil- e β-Galattosil-1,2-O-diacilgliceroli</i>	17
2.3. <i>Sintesi chemo-enzimatica di α-6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli</i>	20
2.4. <i>Sintesi di β-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli</i>	26
2.5. <i>Sintesi stereospecifica di β-Glucosil- e β-6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli</i>	30
CAPITOLO 3: Glicoglicerolipidi fluorescenti	32
3.1. <i>Glicoglicerolipidi & fluorescenza</i>	32
3.2. <i>Sintesi di β-monogalattosil- 1,2-O-diacilgliceroli fluorescenti</i>	33
3.3. <i>Saggi enzimatici</i>	38
CAPITOLO 4: Immunità e lipidi	42
4.1. <i>Immunità naturale e immunità acquisita</i>	42
4.2. <i>Le cellule del sistema immunitario</i>	43
4.2.1. <i>La maturazione dei linfociti</i>	44

4.2.2.	L'incontro con l'antigene	47
4.2.3.	Gli anticorpi	49
4.2.4.	Reazione antigene-anticorpo	52
4.3	<i>Il complesso maggiore di istocompatibilità</i>	53
4.4	<i>Immunopatologia</i>	57
4.4.1.	Reazioni di ipersensibilità	57
4.4.2.	Malattie autoimmuni	64
4.5	<i>Antigeni lipidici</i>	66
4.6	<i>Sistema immunitario vs antigeni glicolipidici</i>	67
4.6.1.	I linfociti T Natural Killer (NKT)	67
4.6.2.	Le cellule dendritiche (DC)	69
4.6.3.	Le proteine CD1	72
4.6.4.	I recettori Toll-like	75
4.7	<i>Vaccini ed adiuvanti</i>	76
CAPITOLO 5:	Saggi farmacologici	79
5.1.	<i>Test preliminari in vitro</i>	79
5.2.	<i>Test in vivo su β-sulfochinovosil- distearoilgliceroli per la valutazione dell'attività adiuvante</i>	81
CAPITOLO 6:	Sezione sperimentale	83
6.1.	<i>β-Galattosil e β-Glucosil- 1,2-O-diacilgliceroli</i>	83
6.1.1.	Procedure generali	83
6.1.2.	Procedure sintetiche e dati spettrali	83
6.2.	<i>α-6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli</i>	89
6.2.1.	Procedure generali	89
6.2.2.	Fonte dell'enzima	89
6.2.3.	Procedure sintetiche e dati spettrali	90
6.3.	<i>β-6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli</i>	102
6.3.1.	Procedure generali	102
6.3.2.	Procedure sintetiche e dati spettrali	102
6.4.	<i>β-glucosil e β-6'-sulfochinovosil- 1,2-O-diastearoilgliceroli diastereopuri</i>	108
6.4.1.	Procedure generali	108
6.4.2.	Dati spettrali dei prodotti finali	109

6.5.	<i>β-galattosil- 1,2-O-diacilgliceroli fluorescenti</i>	113
6.5.1.	Procedure generali	113
6.5.2.	Procedure sintetiche e dati spettrali	113
6.5.3.	Preparazione delle proteine e attività LAH di tuberi di patata	121
6.5.4.	Idrolisi enzimatica di sonde fluorescenti	121
6.5.5.	Analisi degli acidi grassi	123
CAPITOLO 7:	Conclusioni	124
	RINGRAZIAMENTI	127
	BIBLIOGRAFIA	129

Introduzione

I lipidi sono una classe di composti molto vasta per varietà strutturale e funzionale; essi costituiscono un gruppo molto eterogeneo di sostanze organiche praticamente insolubili in acqua, presenti in tutti gli organismi viventi e in grado di assolvere a due funzioni fondamentali; infatti, oltre a rappresentare una fondamentale riserva energetica per l'organismo, sono componenti strutturali delle membrane cellulari di tutti i tessuti. Essi possono essere classificati in due grandi gruppi: lipidi semplici e composti; tale classificazione è basata essenzialmente sui prodotti ottenuti dai processi d'idrolisi: i lipidi primari, in seguito a tale processo, non danno più di due tipi di prodotti differenti, mentre dai lipidi composti non si ottengono meno di tre prodotti. Sono lipidi semplici i mono-, di- e tri-acilgliceroli (meglio conosciuti come trigliceridi), che derivano dall'esterificazione degli acidi grassi col glicerolo; inoltre in questo gruppo rientrano anche gli steroli, gli esteri di steroli, le cere, i tocoferoli, e gli acidi grassi liberi. I lipidi complessi, invece, includono i glicerofosfolipidi o anche detti fosfolipidi, caratterizzati da uno scheletro costituito dal glicerolo, uno o più acidi grassi e un gruppo fosforico come porzione polare; e i glicolipidi come i glicoglicerolipidi e i glicosfingolipidi, che contengono carboidrati come porzione polare. Sono classificati come glicerofosfolipidi gli acidi fosfatidici, la cardiolipina (difosfatidilglicerolo), la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, il fosfatidilglicerolo, la fosfatidilserina e il fosfatidilinositolo. Invece, tra i più conosciuti glicoglicerolipidi ritroviamo i mono-, i di-galattosildiilgliceroli, e i 6'-sulfochinovosildiilgliceroli, questi ultimi meglio conosciuti come sulfolipidi, principali componenti delle membrane dei cloroplasti, coinvolti nei processi fotosintetici (Fahy et al., 2009). Per le importanti funzioni fisiologiche svolte da entrambe le suddette famiglie, ma più in generale dall'intera classe di lipidi, oltre alla biosintesi endogena, risulta necessaria una loro assunzione

tramite l'alimentazione. Nello specifico, i glicolipidi, presenti in tutti gli organismi viventi, inclusi batteri e piante, sono i principali componenti delle membrane cellulari e oltre ad avere un'importante funzione di risorsa energetica, svolgono un ruolo fondamentale nei meccanismi di riconoscimento e di comunicazione cellulare. L'interesse degli studiosi nei confronti dei glicolipidi, sia intracellulari che extracellulari, è dovuto quindi alle importanti proprietà biologiche che caratterizzano la maggior parte di queste molecole (Oshida et al., 1994; Nakato et al., 2000). A dimostrazione di quanto detto, gli organismi marini ed in particolare microalghe hanno rappresentato, e rappresentano tutt'ora, una fonte naturale da cui si è attinto per ampliare gli studi a riguardo. Grazie alla loro abbondanza in molte specie marine è stato possibile attribuire ai galattolipidi un ruolo cruciale in numerosi automatismi fisiologici; essi infatti rappresentano la parte più abbondante dei modulatori lipidici di segnali inter- ed intra- cellulari conosciuti in diverse specie di diatomee ed è stata riscontrata una loro presenza all'interno dei tilacoidi, a dimostrazione di un loro coinvolgimento nei processi fotosintetici. Nel corso degli ultimi anni molti membri afferenti alla classe dei glicolipidi, in particolare galattosilidiacilgliceroli e ceramidi (glicosfingolipidi con una sfingosina acilata, **Figura 1**, pag.11), hanno attratto l'attenzione da parte della comunità biomedica in virtù delle loro proprietà anti-tumorali, ipoglicemizzanti e immunologiche (Matsubara et al., 2005; Shirahashi et al., 1993; Colombo et al., 1996; Colombo et al. 2005; Nagatsu et al., 1994; Jiang, 2011; Di Libero e Mori, 2005; Di Libero, 2004). A tal proposito hanno trovato grande applicazione le α -galattosil-ceramidi (α -Gal-Cer, **Figura 1**, pag.11), ovvero ceramidi estratti dalla spugna *Agelas mauritanus*, poiché sono risultati composti molto attivi sulle cellule del sistema immunitario; in particolare, essi formano complessi con una particolare classe di proteine: le CD1. Il loro impiego è risultato fondamentale per incrementare la conoscenza e ottenere importanti informazioni sul ruolo e sul meccanismo d'azione di questa classe proteica, implicata nelle genesi delle risposte immunologiche (Brossay et al., 1998). Monogalattosilidiacilgliceroli

isolati e caratterizzati dalla diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum*, hanno invece dimostrato di possedere un'attività apoptotica diretta e quindi di potenziale applicazione come chemioterapici (Adrianasolo et al., 1998) (**Figura 1**, pag.11). Analogamente i 6'-sulfochinovosildiacylgliceroli (**Figura 1**, pag.11) sono caratterizzati da altre numerose attività quali quella anti-tumorale, di inibizione della trascrittasi inversa dell'HIV, antivirale nei confronti dell'AIDS e di inibizione rispetto all' α e β DNA-polimerasi. (Di Libero e Mori, 2005; Di Libero, 2004; Sahara et al., 1997; Ohta et al., 1998; Ishiyama et al., 1997; Sun et al., 1999; Chen et al., 1998; Deng et al., 1999; Ma et al., 1999; Golik et al., 1997; Loya et al., 1998; Gustafson et al., 1989; Mizushina et al., 1998; Hanashima et al., 1999). Siccome si tratta di sperimentazioni effettuate su molecole di origine naturale, sarebbe fondamentale ottenere maggiori informazioni riguardo la bioattività dei glicolipidi e i meccanismi d'interazione coi vari bersagli e in quest'ottica, una tappa fondamentale è quella di riuscire ad conseguire una più ampia disponibilità di composti d'interesse. Il problema principale è poter disporre di composti puri e a composizione nota ma ciò non è sempre possibile a causa delle difficoltà che si incontrano nell'isolamento e nella purificazione di questi ultimi da fonti naturali. A tal proposito diviene fondamentale ricorrere ad efficienti metodiche sintetiche che permettano di ottenere composti puri e derivati di molecole naturali aventi composizione chimica definita ed in quantità sufficienti per effettuare test ed esperimenti.

CAPITOLO 1

Derivati lipidici e bioattività

1.1. I lipidi bioattivi

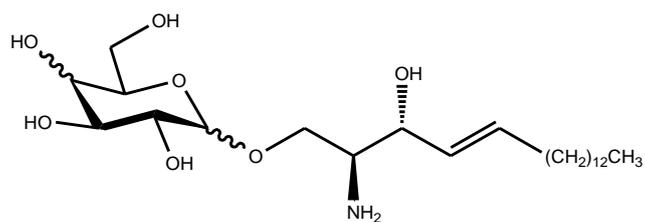
Il concetto di “lipidi bioattivi”, generalmente espresso per definire cambiamenti morfologici che avvengono sui lipidi che si traducono in conseguenze funzionali, è stato per decenni in sviluppo ma ha iniziato a guadagnare la giusta rilevanza negli ultimi 20 anni, promettendo di occupare il centro della scena della ricerca biologica e farmacologica nel secolo attuale. Questa tardiva considerazione ha le sue radici in precedenti idee e preconcetti riguardo il coinvolgimento dei lipidi esclusivamente nel metabolismo energetico e nella struttura delle membrane cellulari che hanno impedito di avere una visione più ampia riguardo il loro ruolo come vere e proprie sostanze funzionali, quindi bioattive. In realtà questi ostacoli derivano principalmente dalle numerose difficoltà intrinseche che si incontrano lavorando con i lipidi, i loro enzimi ed i loro target. In alcuni studi pionieristici, fu osservato il rapido turnover degli inositolo-fosfolipidi in sezioni pancreatiche stimulate con l'acetilcolina (Hokin, e Hokin, 1953) tuttavia non fu data la giusta importanza a queste considerazioni per la funzione delle cellule ed il discorso intrapreso fu lasciato relativamente in stand-by per diversi anni, fino a quando fu reso noto che il diacilglicerolo (DAG) e l'inositolo-1,4,5-trifosfato (IP3) sono rispettivamente coinvolti nella regolamentazione della protein-chinasi C (PKC) e nel rilascio del calcio (Nishizuka, 1992), ovvero in specifici meccanismi che portano a risposte cellulari diverse tra loro. Concettualmente, la dimostrazione di un'attivazione diretta della PKC da parte del DAG ha cementato l'idea che un lipide (per il quale era già stato confermato un ruolo nel metabolismo intermedio) potrebbe regolare meccanismi di segnalazione cellulare, inaugurando in tal modo “l'era dei lipidi bioattivi”. Gli studi negli ultimi quattro decenni hanno definito anche il ruolo chiave svolto dagli eicosanoidi (e altri

prodotti del metabolismo dell'acido arachidonico) come molecole lipidiche di segnalazione inter- ed intra- cellulare che sono principalmente coinvolte nella mediazione delle risposte infiammatorie (Serhan e Savill, 2005). Ulteriori studi hanno dimostrato che molti prodotti secondari del metabolismo degli inositolo-fosfolipidi, come il fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP3), fungono anche da intermedi essenziali nella segnalazione cellulare. Altre molecole regolatrici derivanti dai glicerolipidi sono l'acido fosfatidico (PA), monoacilgliceroli e anandamide (ligandi candidati per i recettori cannabinoidi), acido lisofosfatidico (LAF) e il fattore attivante le piastrine (Platelet-Activating Factor, PAF). Altro gruppo di lipidi bioattivi che sono saliti alla luce della ribalta nei due decenni passati è quello degli sfingolipidi; il primo di questi ad essere identificati è stato sfingosina che esercita effetti pleiotropici su protein-chinasi ed altri diversi substrati. In particolare, la sfingosina ed i suoi relativi derivati sfingoidi svolgono un'importante parte nella regolazione del citoscheletro di actina, dell'endocitosi, ciclo cellulare e apoptosi (Smith et al., 2000). Particolare enfasi è stata posta su alcuni sfingolipidi come ceramide e sfingolipide-1-fosfato (S1P) in quanto la ceramide media molti meccanismi di risposta allo stress cellulare, inclusa la regolazione dell'apoptosi (Obeid et al., 1993) e la senescenza cellulare (Venable et al., 1995), mentre l'S1P svolge un ruolo cruciale nella sopravvivenza cellulare, la migrazione cellulare e l'infiammazione (Hla, 2004). Recentemente sono stati associati alla famiglia degli sfingolipidi bioattivi le ceramidi-1-fosfato (C1P), anch'esse coinvolte nei processi infiammatori e di traffico vescicolare (Chalfant e Spiegel, 2005; Mitsutake et al., 2004; Hinkovska-Galcheva et al., 2005) le glucosil-ceramidi implicate a loro volta nel traffico post-Golgi e nei meccanismi di resistenza ai farmaci (Radin et al., 1993; Gouaze-Andersson e Cabot, 2006), lisosfingomieline e diidroceramidi. Anche se negli ultimi anni si sono moltiplicate le conoscenze riguardo la bioattività dei derivati lipidici, comprese le risposte generate e le diverse sottoclassi coinvolte, rimane comunque complicato chiarire i principi che regolano il funzionamento dei lipidi bioattivi proprio

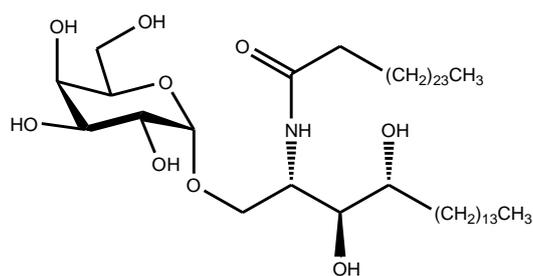
perché sono implicati in tanti processi cellulari con livelli di complessità ancora da decifrare; inoltre non è nemmeno chiara la correlazione che intercorre tra i cambiamenti strutturali dei mediatori lipidici e gli effetti funzionali che ne derivano.

1.2. I glicoglicerolipidi

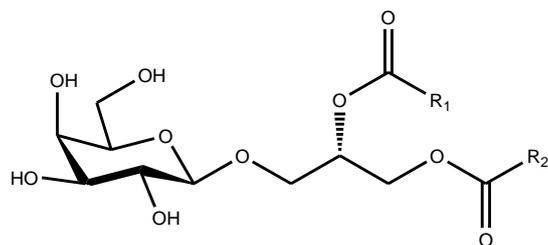
I Glicoglicerolipidi sono molecole onnipresenti negli organismi viventi aventi funzioni strutturali e ricoprendo un ruolo indispensabile in numerosi meccanismi di modulazione di segnali intra- ed extra- cellulari (Oshida et al., 1994; Nakato et al., 2000; Murakami et al., 2003). Essi appartengono alla classe dei glicolipidi che raggruppa una serie di derivati molto vari dal punto di vista funzionale e strutturale ma, come mostrato in **Figura 1**, sono tutti caratterizzati da uno scheletro comune. I glicolipidi infatti sono molecole anfipatiche, costituite da una parte zuccherina che rappresenta la porzione polare la quale è legata attraverso un legame glicosidico alla parte idrofobica della molecola costituita, ad esempio, da una sfingosina nel caso delle glicoceramidi, o dal diacilglicerolo nei glicoglicerolipidi. I derivati glicoglicerolipidici rinvenuti in natura possono differire tra loro per l'unità zuccherina (mono- o di-saccaridica), che può essere ad esempio un galattosio, un glucosio o un sulfochinovosio, ovvero un deossiglucosio solfonato; per le catene aciliche legate al glicerolo (mono- o di- acilato) che possono essere di diversa lunghezza e composizione (sature e mono- e poli- insature); o per la configurazione le legame glicosidico (α o β).



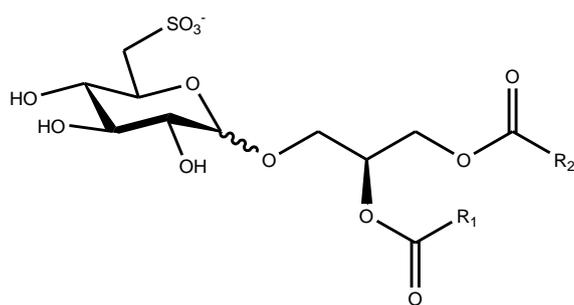
Glicoceramide



α-Gal-Cer



β-Galattosil diacilglicerolo



6'-Sulfochinovosil diacilglicerolo

Figura 1. Esempi di glicolipidi bioattivi

1.2.1. β -Galattosil- e β -Glucosil--1,2-O-diacilgliceroli

All'interno della famiglia dei glicoglicerolipidi, i mono- (*MGDG*) e i di- (*DGDG*) galattosil diacilgliceroli rappresentano il 70-80% dei lipidi di membrana nelle cellule fotosintetiche (Jacob e Miller, 1986) e comprendono la più abbondante classe dei lipidi nella biosfera. Negli ultimi anni analoghi naturali e sintetici di *MGDG* e *DGDG* hanno attirato l'interesse della comunità biomedica per le proprietà biologiche e per le attività antivirali (Reshef et al., 1997; Loya et al., 1998), antitumorali (Tokuda et al., 1996; Masaki et al., 1996; Sahara et al. 1997; Adrianasolo et al., 2008) antinfiammatorie e immunomodulanti (Máñez et al., 1999; Berge et al., 2002; Larsen et al. 2003; Seki et al., 2002). In particolare, la risposta immunitaria innata attivata da glicolipidi sta emergendo come un processo chiave contro le infezioni batteriche e virali, nonché nell'immunosorveglianza dei tumori e nell'autoimmunità (De Libero e Mori, 2005). Le proprietà immunogeniche dei lipidi dipendono dalle caratteristiche strutturali della molecola; infatti molto recentemente è stato dimostrato che il riconoscimento di *MGDG* e *DGDG* da parte delle cellule T natural killer è strettamente dipendente dalla composizione degli acidi grassi del residuo diacilglicerolico (Kinjo et al., 2011).

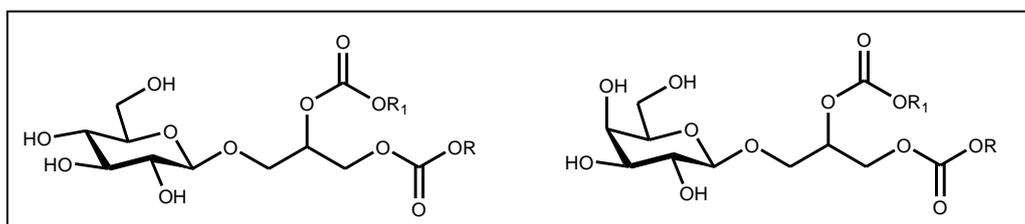


Figura 2. β -Glucosil- e β -Galattosil- 1,2-O-diacilgliceroli

1.2.2. α -6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli

Gli α -6'-Sulfochinovosil-diacilgliceroli (*SQDG*), vale a dire gli 1,2-di-O-acil-3-O-(6'-deossi-6'-sulfo- α -D-glucopiranosil)-sn-gliceroli (Benson et al., 1959), sono i principali costituenti delle membrane dei cloroplasti degli organismi fotosintetici (Mizushina et al., 1998; Tulloch et al., 1973; Kates, 1970; Davies et al., 1965; Weier e Benson, 1965; Ohta et al., 1998), ma sono stati anche rinvenuti nei batteri (Sahara et al., 1997). Le molecole di *SQDG* svolgono un ruolo diretto nei processi fotosintetici e come tali, hanno attirato l'attenzione della comunità scientifica. In realtà l'interesse riscontrato per questi composti non è solo dovuto al loro ruolo biologico ma anche per le importanti proprietà farmacologiche che detengono; infatti è stato riscontrato un potere antivirale (Sahara et al., 1997, Ohta et al., 2001) e antitumorale (Gustafson et al., 1989; Loya et al., 1998; Reshef et al., 1997), ma di notevole interesse sono la capacità immunomodulante (Matsumoto et al., 2002) e di inibizione della DNA polimerasi (Mizushina et al., 1998; Murakami et al., 2002; Hanashima et al., 2001; Hanashima et al., 2000) che state attribuite a questa classe di composti.

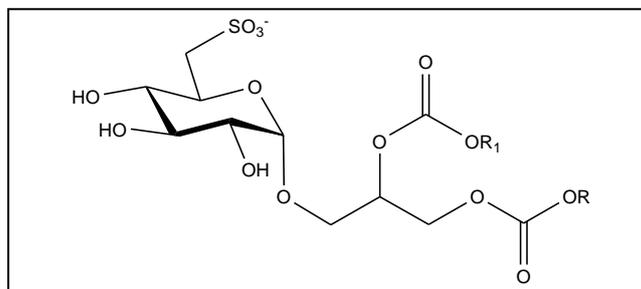


Figura 3. α -6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli

1.2.3. β -6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli

Come detto i sulfoglicoglicerolipidi sono analoghi solfonici del D-glucosio legati al glicerolo esterificato con catene di acido grasso, ed in particolare i 6'-sulfochinovosil-monoacilgliceroli (SQMG) e i 6'-sulfochinovosil-diacilgliceroli (SQDG) hanno mostrato attività biologiche e farmacologiche molto interessanti come antitumorali (Sahara et al., 1997; Ohta et al., 2001), di inibizione del recettore della selectina P (Golik et al., 1997) di inibizione della trascrittasi inversa del virus dell'immunodeficienza umana HIV (Loya et al., 1998; Reshef et al., 1997), ed antivirali (Gustafson et al., 1989). Ho comunque già parlato nel paragrafo precedente delle capacità e delle eccellenti potenzialità di questa classe di composti (paragrafo 1.1.2.), evidenziando proprietà biologiche specifiche soprattutto per quanto riguarda l'attività immunomodulante (Matsumoto et al., 2002) e di inibizione della DNA polimerasi (Murakami et al., 2002; Hanashima et al., 2001; Hanashima et al., 2000; Mizushina et al., 2003; Mizushina et al., 1998). I sulfoglicoglicerolipidi naturali sono caratterizzati da una α -configurazione del carbonio anomero; in natura infatti non sono stati rinvenuti derivati che possiedono configurazione β ; tuttavia la bioattività dei β -6'-sulfochinovosil-diacilgliceroli sintetici è stata valutata ed in letteratura sono riportati diversi studi che attribuiscono a quest'ultimi un potere immunomodulante e di inibizione della DNA polimerasi addirittura maggiore di quella riportata per gli SQMG e SQDG naturali, accompagnata da una totale assenza di tossicità sui tessuti tranne che nei confronti dei linfociti. (Ohta et al., 2001; Matsumoto et al., 2000)

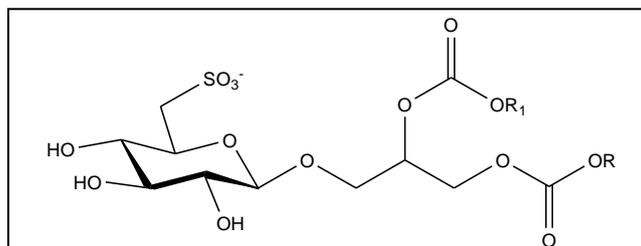


Figura 4. β -6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli

1.3. Obiettivo del lavoro

La valutazione della bioattività dei lipidi, ed in particolare dei glicoglicerolipidi, rappresenta un target scientifico di enorme rilevanza e nello specifico, approfondire le conoscenze riguardo le interazioni esistenti tra questa classe di composti e il sistema immunitario è sicuramente un obiettivo tanto importante quanto affascinante. Come si può constatare, i diversi livelli di complessità e l'elevata specificità di questo processi richiedono una purificazione accurata degli antigeni lipidici; tuttavia le operazioni di isolamento di questi composti da fonti naturali risultano spesso troppo complicate a causa delle omologie strutturali che caratterizzano i derivati presenti in natura. Per questa ragione, la preparazione di glicoglicerolipidi attraverso metodiche sintetiche è considerato un passo cruciale per affrontare valutazione e sviluppo di questa classe di molecole. A tal proposito, durante il mio Dottorato di ricerca, svolto presso l'Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR di Pozzuoli, mi sono impegnato nell'ideare e realizzare metodiche sintetiche efficienti e versatili finalizzate all'ottenimento di derivati glicoglicerolipidici di cui è stato valutato il potere immunomodulante attraverso test farmacologici.

CAPITOLO 2

Sintesi dei derivati glicoglicerolipidici

2.1. L'approccio sintetico

L'ottenimento di analoghi naturali e sintetici dei β -glicosil-1,2-diacilgliceroli è stato raggiunto mediante una generale, semplice e versatile procedura sintetica realizzata mediante la metodica del tricloroacetimidato, con trifluoruro di boro eterato come catalizzatore acido e l'uso di monosaccaridi peracetilati che garantissero un'elevata stereoselettività β nella reazione di glicosilazione tra lo zucchero donatore e il 1,2-O-isopropilidenglicerolo glicerolo accettore. Inoltre tale approccio sintetico è stato realizzato al fine di ottenere derivati regio- e stereo-isomerici enantiomericamente puri, incluso quelli con catene aciliche poliinsature. In letteratura sono già presenti numerose metodiche per l'ottenimento dei β -glicosil-1,2-diacilgliceroli; tuttavia nella maggior parte dei casi (Amara et al., 2009; Mannock et al., 1990; Gent e Gigg, 1975; Lafont et al., 2006; Sias et al., 2004) tali metodiche preferiscono utilizzare zuccheri perbenzilati come molecole di partenza, in quanto l'utilizzo del benzile come gruppo protettore permette una più agevole deprotezione finale in presenza dei gruppi esterei presenti sulla porzione gliceridica, i quali non risentono delle condizioni di idrogenolisi necessaria per la debenzilazione. Altre strategie sintetiche di letteratura utilizzavano la metodologia basata su derivati con il bromo in posizione anomeric dello zucchero donatore; tale metodica tuttavia risentiva della bassa stabilità ed elevata tossicità di tali bromoderivati così come dell'elevato costo dei promotori acidi associati alla reazione di glicosilazione di Koenigs-Knorr, le cui condizioni sono generalmente impiegate per la sintesi di glicolipidi a partire da zuccheri piranosici acetato-protetti (Janwitayanuchit et al., 2003; Cateni et al., 2007; Wehrli e Pomeranz, 1969; Cateni et al., 2008; Paulsen, 1982). La metodica del tricloroacetimidato a partire da zuccheri peracetilati e utilizzata in questo

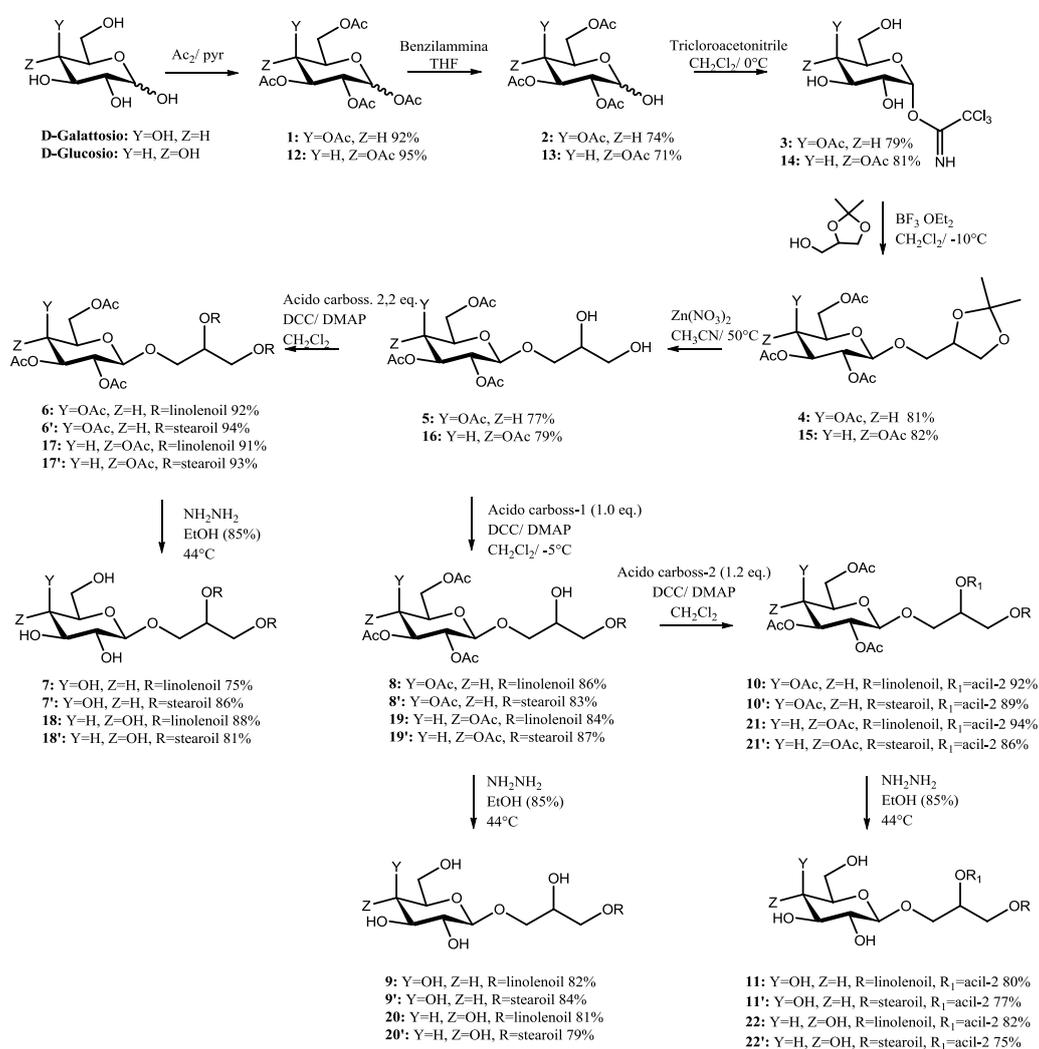
lavoro di tesi offre vari vantaggi rispetto alle procedure normalmente utilizzate di letteratura ed elencate in precedenza. In particolare l'utilizzo dell'acetato rispetto al benzile come gruppo protettore offre la possibilità di introdurre sulla porzione gliceridica anche catene aciliche insature poichè in tal modo si bypassa l'utilizzo di idrogeno per l'eventuale debenzilazione evitando così la riduzione delle insaturazioni presenti in catena e determinando nel contempo un'elevata stereoselettività nella reazione di accoppiamento portando esclusivamente a derivati β -anomerici. Un altro importante vantaggio di tale metodica risiede nella possibilità di utilizzare nella reazione di glicosilazione 1,2-O-isopropiliden-gliceroli enantiopuri, il cui uso è compatibile con le condizioni di reazione elaborate, a differenza delle condizioni sperimentali utilizzate da Koenigs-Knorr e dalle procedure che utilizzano il galattosil bromuro (Wehrli e Pomeranz, 1969; Wickberg, 1958; Shingu et al., 2003) che non sono in grado di evitare l'epimerizzazione al C-2 della porzione gliceridica (Amara et al., 2009). L'approccio sintetico così ideato e realizzato per l'ottenimento di β -6'-sulfochinovosil-, β -galattosil- e β -glucosil- mono- e diacilgliceroli contenenti acidi grassi sia saturi che insaturi si è rivelato particolarmente efficiente e versatile dando accesso a regio- e stereo- composti puri.

2.2. Sintesi di β -Glucosil- e β -Galattosil-1,2-O-diacilgliceroli (Manzo et al., 2012 a)

L'accesso agli analoghi naturali e sintetici dei β -glico-1,2-diacilgliceroli è stato raggiunto dunque con una sintesi stereoselettiva versatile e semplice che è stata realizzata attraverso una glicosilazione stereoselettiva che coinvolge un derivato zuccherino tricloroacetimidato e peracetilato donatore di legame glicosidico e l'1,2-O-isopropilidenglicerolo glicerolo che funge da accettore. Come mostrato nello **schema 1**, la sintesi inizia con l'acetilazione dello zucchero, seguito da deacetilazione selettiva del gruppo ossidrile anomero con la benzilamina (composti **2** e **13**). Lo step di accoppiamento con l'1,2- O-

isopropilidenglicerolo attraverso la metodica del tricloroacetimidato (Schmidt e Michel, 1980; Schmidt, 1986) ha dato galattosil- (**4**) e glucosil- (**15**) derivati in buone rese (circa 81% e 82%, rispettivamente); infatti, come detto in precedenza, il gruppo acetato in posizione C-2' dello zucchero orienta l'attacco equatoriale con altissima stereoselettività attraverso la formazione di un intermedio acetossonio. I dioli **5** e **16** sono stati quantitativamente ottenuti mediante idrolisi selettiva degli intermedi isopropilidenici impiegando nitrato di zinco esaidrato in acetonitrile (Vijayasaradhi et al, 2000). La DCC, unitamente a uno o due equivalenti di acidi grassi liberi (ad esempio linolenico e stearico), rende poi possibile l'acilazione dando come prodotti alternativamente i derivati mono- e di- acilati; rispettivamente **8** e **6**. Infatti quantità equimolari di reagenti e basse temperature (da -5 a 0 °C) hanno infatti determinato esterificazione solamente al C-1 del glicerolo, e sebbene l'acilazione del gruppo ossidrilico secondario del glicerolo è stata talvolta riportata (Chen et al., 1996) non sono state riscontrate acilazioni al C-2 utilizzando tali condizioni sperimentali. Questa procedura facilita, quindi, una graduale introduzione di vari residui acilici al C-1 ed al C-2 del glicerolo, permettendo così di controllare la regiospecificità al momento dell'introduzione delle catene di acidi grassi sui glicolipidi sintetici (ad esempio **10** e **10'**). Infine, la selettiva rimozione dei gruppi acetati sull'unità zuccherina con idrazina monoidrata ha portato ai derivati glicolipidici desiderati: i β -galattosil-diacilgliceroli (**7** e **11**) e i β -galattosil-monoacilgliceroli (**9**) se il substrato di partenza era il galattosio, mentre utilizzando come unità zuccherina il glucosio è possibile ottenere i β -glucosil-diacilgliceroli (**18** e **22**) e i β -glucosil-monoacilgliceroli (**20**). Solitamente la reazione di idrazinolisi finale non potrebbe essere applicata a substrati insaturi perchè anch'essa possibile causa di idrogenazione parziale di doppi legami (Bashkatova et al., 1971; Bashkatova et al., 1972; Bashkatova et al., 1973; Kaplum et al., 1977; Shvets et al., 1973; Batrakov et al., 1976; Nagatsu et al., 1994; Mannock et al., 1987) eventualmente presenti sulle catene aciliche, ma tale inconveniente può essere efficacemente risolto riducendo la

quantità di idrazina (2,4 moli per unità di acetato) e mantenendo la temperatura di reazione non oltre i 45 °C. [75-88 % è la resa per i derivati linolenoil **7** (1,2-di-linolenoil-3-O-[1'-β-galattosil]-glicerolo), **11** (1-linolenoil-2-stearoil-3-O-[1'-β-galattosil]-glicerolo), **18** (1,2-di-linolenoil-3-O-[1'-β-glucosil]-glicerolo), e **22** (1-stearoil-2-linolenoil-3-O-[1'-β-glucosil]-glicerolo)].



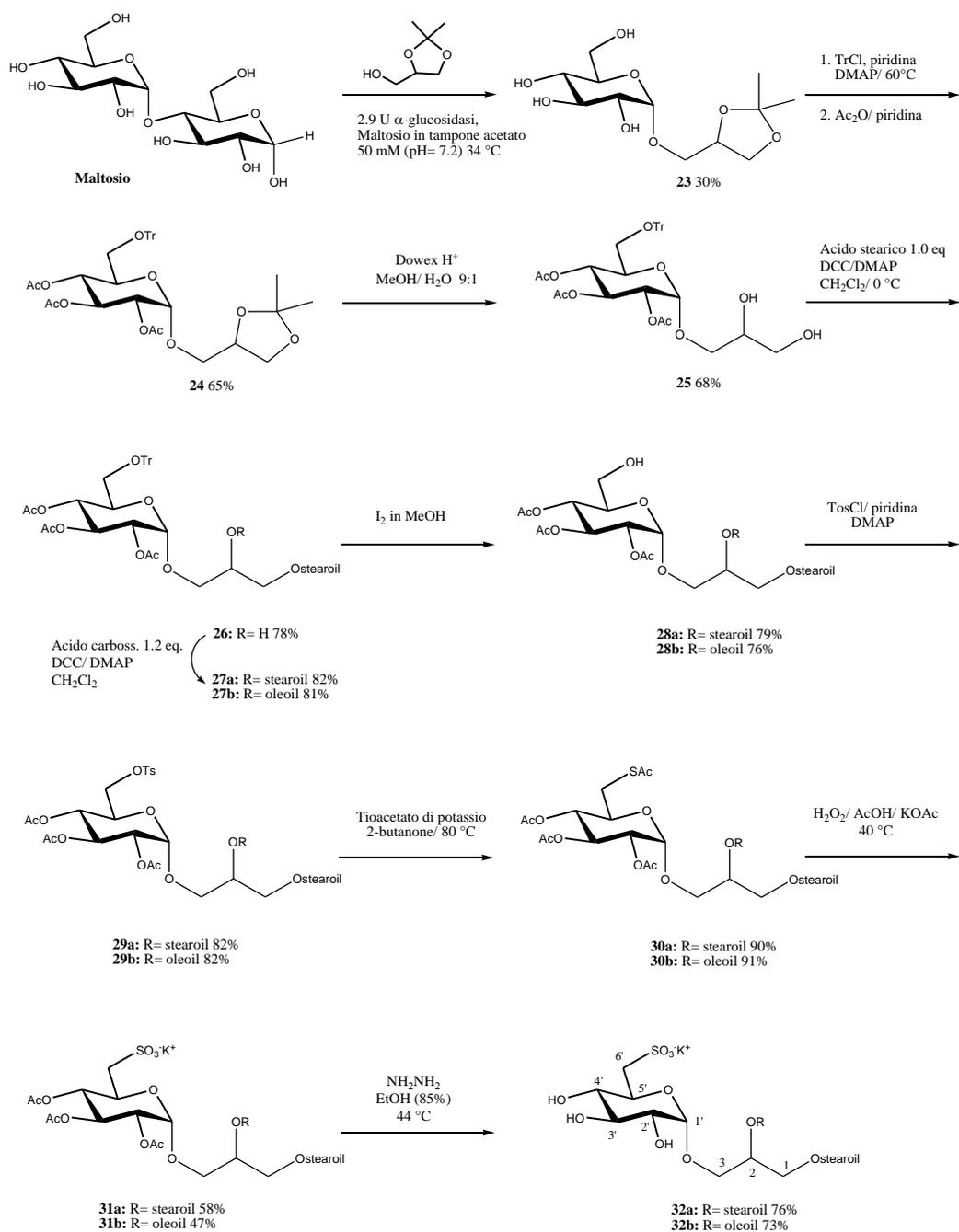
Schema 1. Sintesi di β-galattosil- e β-glucosil- mono- e di- acilgliceroli

2.3. Sintesi chemo-enzimatica di α -6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli (Manzo et al., 2012 b)

In letteratura sono presenti metodiche per l'ottenimento degli α -sulfochinovosil-1,2-diacilgliceroli ed in particolare vari approcci per la preparazione di α -glicosilderivati; purtroppo la maggior parte di tali procedure prevede l'utilizzo dei benzili quali gruppi protettori dello zucchero con lo svantaggio, già evidenziato, di non poter introdurre catene aciliche insature sulla porzione gliceridica ed inoltre in tali metodiche risulta complicato ovviare ad una parziale perdita di stereoselettività nella formazione del legame α -glicosidico (Demchenko, 2003; Davis, 1999). Tuttavia l'impiego di enzimi per la costruzione stereospecifica di legami glicosidici è un nuovo strumento tecnologico che sfrutta la capacità da parte di alcune glicosil idrolasi (endo- ed eso- glicosidasi) (Trincone e Giordano, 2006) o glicosiltransferasi (Koeller e Wong, 2000) di trasferire una unità di zucchero da diversi donatori ad accettori specifici. In particolare, alcune glicosil-idrolasi (EC 3.2.1.) sono funzionalmente impiegate per l'idrolisi dei legami glicosidici ed allo stesso tempo sono anche in grado di catalizzare la formazione di tali legami in maniera stereospecifica (processi di transglicosilazione); tali enzimi hanno perciò trovato applicazione nella sintesi enzimatica di oligosaccaridi e glicoconiugati (Trincone e Giordano, 2006). Recentemente, uno studio dell'attività catalitica del mollusco marino del Mediterraneo, l'*Aplysia fasciata*, ha prodotto una raccolta di glicosil-idrolasi in grado di formare legami glicosidici (Trincone et al., 2006) ed in una valutazione preliminare è emerso che l'enzima maggiormente responsabile di tale attività è l' α -glucosidasi che ha mostrato un promettente potenziale di glicosidazione del glicerolo libero (Andreotti et al., 2008). L'impiego dell' α -glucosidasi dell'*Aplysia fasciata* è dunque risultato il passo fondamentale per un approccio sintetico nuovo e semplice per la preparazione degli SQDG. Come mostrato nello schema sintetico (**Schema 2**) per l'ottenimento di sulfochinovosil-diacilgliceroli

naturali (Sasaki et al., 2001; Cedergren e Hollingsworth, 1994), la transglicosilazione catalizzata dall' α -glucosidasi rappresenta il primo step della metodica chemo-enzimatica, in cui l'enzima indirizza il trasferimento di un'unità di glucosio dal maltosio (4-O- α -D-glucopiranosil-D-glucosio) al (rac)-1,2-O-isopropilidenglicerolo. I prodotti derivanti da questa reazione sono stati esclusivamente i 3- α -glicosil-derivati dell' 1,2-O- isopropilidenglicerolo. In particolare il 3- α -glucosil-1,2-O- isopropilidenglicerolo (**23**) è stato il composto maggiormente ottenuto (30% di resa) insieme ad una miscela di di- e tri-saccaridi analoghi (23% e 6% le rese, rispettivamente). In letteratura sono riportati alcuni esempi di O- α -D-glicosilazione del glicerolo (Sawai e Hehere, 1962; Takenaka e Uchiyama, 2000; Nakano et al., 2003) ed è stato interessante verificare che l'attività dell'*A. fasciata* risulta superiore o quantomeno in linea coi risultati derivanti da questi processi noti. Per confermare la bontà del potenziale sintetico dell'enzima derivante dal mollusco, è stata testata anche la capacità di glicosidazione del glicerolo libero di glicosidasi commerciali, impiegando condizioni sperimentali molto simili a quelle utilizzate per ottenere il legame α -glicosidico, ed è stato interessante notare che sia adoperando una transglicosidasi derivante dall'*Aspergillus niger*, sia l' α -glucosidasi di *Bacillus stearothermophilus* è stato ottenuto il composto **23** con rese inferiori al 2%. Questi risultati sono ampiamente inferiori a ciò che è stato realizzato usufruendo dell'attività dell' α -glucosidasi di *A. fasciata*, suggerendo di fatto che quest'ultimo enzima può rappresentare una valida alternativa per la sintesi di diversi tipi di glicolipidi. La tritilazione del gruppo ossidrilico primario del composto **23** seguita da peracetilazione hanno prodotto l'intermedio **24** che è stato convertito nel successivo **25** mediante idrolisi selettiva del residuo isopropilidenico con Dowex H⁺ in metanolo / acqua 9:1 (Park et al., 1994). Per questo step ho stato scelto di utilizzare una resina debolmente acida anzichè catalizzatori più comunemente impiegati, ma decisamente più energici (es. HCl, HBr o TFA) al fine di evitare un'indesiderata rimozione del gruppo tritilico.

Nonché apertura del legame glicosidico. Nello spettro ^1H NMR del composto **24**, i segnali anomeric dei due diastereoisomeri a δ 5.18 e 5.16 ppm erano distinguibili in un rapporto di 1:1, mettendo in risalto l'assenza di diastereospecificità nell'attività dell' α -glucosidasi. Successivamente la DCC ha favorito la condensazione del residuo glicerolico con 1 o 2 equivalenti di acidi grassi liberi (cioè stearico e oleico) dando come prodotti i diacilderivati **27a** e **28b**. In accordo con precedenti osservazioni (Manzo et al., 2012 a), l'acilazione dell'idrossile primario è in gran parte favorita nella reazione di accoppiamento con quantità equimolari di reagenti (**composto 26**); infatti impiegando un solo equivalente di acido non sono stati rinvenuti prodotti monoacilati in posizione 2 ma esclusivamente in posizione 1. Tramite l'applicazione di queste condizioni è dunque possibile ottenere prodotti regiospecifici puri. La rimozione selettiva del residuo tritilico con iodio in metanolo (Wahlstrom e Ronald, 1998) (**28a/28b**) e la successiva tosilazione dell'alcool primario ha dato i composti **29a/29b**, i quali dopo la sostituzione del gruppo tosile col tioacetato (Fernandez-Bolanos et al., 1993) (**30a/30b**), sono stati facilmente convertiti nei composti **31a/31b**, da cui è ottenuta la funzione solfonica in 6' del sulfochinovosio attraverso una reazione di ossidazione utilizzando perossido di idrogeno (Fernandez-Bolanos et al., 1993). L'ultimo step, ovvero la rimozione dei gruppi acetili, è stata efficacemente realizzata adoperando idrazina monoidrata in etanolo all'85%; è stata così completata la sequenza di reazioni finalizzate all'ottenimento di 1,2-di-stearoil-3-O-(1'- α -6'-sulfochinovosil)-glicerolo e 1-stearoil-2-oleoil-3-O-(1'- α -6'-sulfochinovosil)-glicerolo (rispettivamente **32a** e **32b**).



Schema 2. Sintesi degli α -6'-Sulfochinovosil-1,2-O-dialcigliceroli

Come detto, la procedura ideata e realizzata ha consentito l'introduzione graduale di vari residui acilici e quindi il controllo della regiospecificità degli SQDG risultanti. L'uso di altre catene derivanti da acidi grassi quali palmitico (C-16), caprinico (C-10) e 5-dodecenoico ha permesso di ottenere una piccola libreria di regioisomeri, tra cui anche alcuni prodotti naturali, e come evidenziato in **Tabella 1**, le rese complessive sono state buone (14-23 %) indipendentemente dalla natura dei sostituenti acilici. L'unica eccezione, tra l'altro prevista, riguarda l'impiego di catene sature (ad esempio 10:0 / 16:0), che ha portato a risultati migliori a causa della minore suscettibilità delle catene aciliche stesse ad essere ossidate dal perossido di idrogeno nello step di conversione a solfonato rispetto a catene mono e poliinsature. Sono stati così ottenuti gli α -6'-sulfochinovosil-diacilgliceroli mediante un processo chemoenzimatico molto versatile, ricorrendo per la prima volta ad un approccio enzimatico per la preparazione del substrato di partenza. Inoltre, evitando le procedure che coinvolgono l'attivazione dei donatori chimici e utilizzando maltosio come donatore, l'intermedio chiave 3- α -glucosil-1,2-O-isopropilidene (**23**) è stato ottenuto mediante una glicosilazione stereoselettiva del glicerolo protetto usufruendo, come detto, dell'attività dell' α -glucosidasi del mollusco marino *Aplysia fasciata*. L'accoppiamento enzimatico ha permesso un controllo rigoroso della stereoselettività del legame α -glicosidico, mentre l'uso dell'acetato come gruppo protettore ha favorito la sintesi di derivati saturi, insaturi o misti con alte rese. Sebbene disponibili in commercio, gli 1,2-O-isopropiliden gliceroli enantiopuri non sono stati testati in questo lavoro ma il loro uso è compatibile con le condizioni sperimentali dell'accoppiamento enzimatico (pH 5.8) (Green et al., 1999). La procedura proposta è di applicazione generale e permette la preparazione di regio- e stereo-derivati puri di α -6'-sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli, consentendo così a questa classe di composti un realistico accesso sintetico al laboratorio per verificarne l'uso biologico ed eventualmente farmacologico.

Tabella 1. I diversi derivati degli α -6'-sulfochinovosil diacilgliceroli sintetizzati utilizzando la metodica descritta nello **schema 3**.

	Catena acilica al C-1	Catena acilica al C-2	Resa*
Derivato 32c	C18:0	C18:0	~21%
Derivato 32d	C18:0	C18:1	~16%
Derivato 32e	C18:1	C18:1	~14%
Derivato 32f	C16:0	C18:1	~18%
Derivato 32g	C18:0	C16:0	~22%
Derivato 32h	C10:0	C12:1	~17%
Derivato 32i	C10:0	C10:0	~23%
Derivato 32l	C12:1	C12:1	~14%

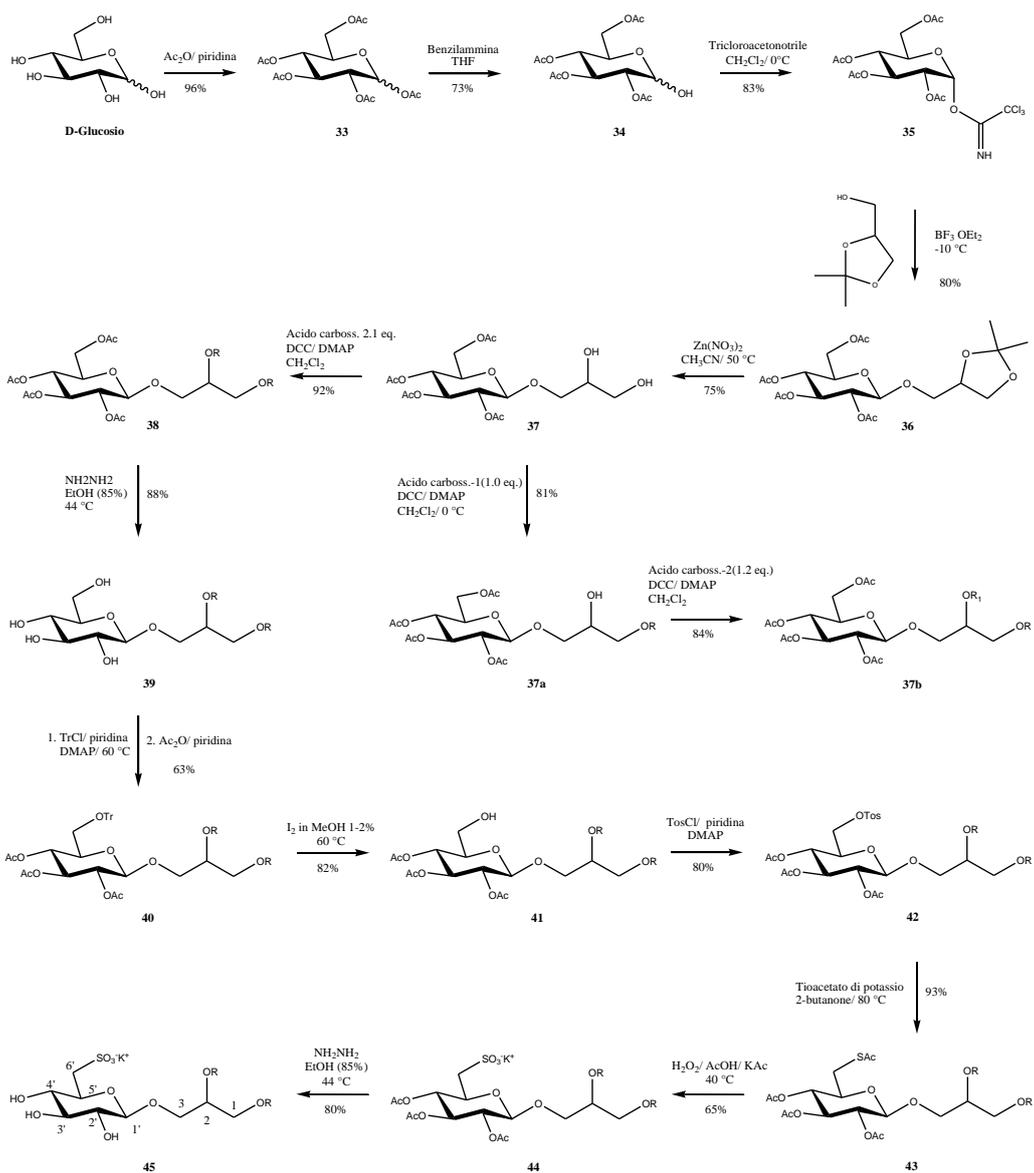
* Tutte le rese sono state calcolate a partire dalla reazione di esterificazione del composto **25**

2.4. Sintesi di β -Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli

Per l'ottenimento degli analoghi non naturali degli SQDG, ovvero i β -6'-sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli, ho fatto ricorso alle metodiche precedentemente sviluppate e realizzate; poter ricalcare infatti la strategia adottata per il conseguimento degli α -6'-sulfochinovosil-diacilgliceroli ho seguito sin da subito l'approccio più giusto e logico per raggiungere il nostro intento, in quanto gli step sintetici che consentono di convertire il glucosio nel 6'-sulfochinovosio si sono rivelati particolarmente efficaci e redditizi in termini di resa complessiva e di quasi tutti i prodotti intermedi. Tuttavia, come visto in precedenza, per l'ottenimento della configurazione α del carbonio anomero dei SQDG era stato necessario ricorrere ad un approccio chemo-enzimatico a causa delle difficoltà riscontrate quando si impiegano metodiche sintetiche esclusivamente chimiche, il cui limite principale è rappresentato dalla parziale perdita di stereoselettività al momento della formazione del legame α -glicosidico (Demchenko, 2003; Davis, 1999). Nel caso della formazione di legami β -glicosidici invece è possibile affidarsi a reazioni chimiche, evitando di dover far ricorso a procedure enzimatiche che, per quanto valide allo scopo, sono associate ad operazioni preliminari di preparazione e isolamento enzimatico complesse ed inoltre non garantiscono rese eccezionali dei prodotti desiderati. In virtù di queste considerazioni ho fatto affidamento allo stesso approccio sintetico utilizzato per la formazione del legame β -glicosidico per l'ottenimento dei derivati β -glucosil- e β -galattosil- diacilgliceroli (Manzo et al., 2012 a) che prevede l'impiego di substrati peracetilati e la metodica del tricloroacetimmidato (Schmidt e Michel, 1980; Schmidt, 1986) per lo step di accoppiamento dello zucchero col glicerolo. La metodica messa a punto può essere quindi considerata un "mix" delle due sintesi precedentemente ideate e realizzate. Come si vede nello **schema 3**, la sintesi inizia con l'acetilazione del D-glucosio con anidride acetica e piridina, seguita da deacetilazione selettiva della posizione anomera con benzilammina. L'accoppiamento con 1,2-O-

isopropilidenglicerolo glicerolo, utilizzando la metodologia del tricloroacetimidato, ha permesso di ottenere il derivato **36** con rese elevate (circa 80%). I gruppi acetato determinano l'elevata stereoselettività della reazione orientando in β la formazione del legame glicosidico, come dimostra il valore di H-1' ($\delta = 4.61$, $J = 7.7$ Hz) nello spettro $^1\text{H-NMR}$. L'idrolisi selettiva del residuo isopropilidenglicerolico è stata effettuata con nitrato di zinco esaidrato in acetonitrile (Vijayasradhi et al., 2000), ottenendo il composto **37**, mentre la DCC ha favorito l'esterificazione del glicerolo con uno o due equivalenti di acidi grassi liberi (es. stearico o linolenico), permettendo di conseguire alternativamente i derivati mono- e di- acilati, **37a** e **38** rispettivamente. In questo modo la procedura ha permesso l'introduzione graduale di due differenti catene aciliche sulle posizioni libere del glicerolo, rendend così possibile controllare la sequenza di introduzione degli acidi grassi in posizione -1 e -2 del glicerolo, stabilendo così la regiospecificità della reazione e dei glicolipidi derivanti dalla sua applicazione. A tal riguardo, anche in questo caso, non è stata osservata alcuna acilazione in posizione -2 del glicerolo nell'intermedio **37a**. La rimozione selettiva di gruppi acetato sull'unità zuccherina con idrazina monoidrata ha portato all'ottenimento dei β -glucosil-1,2-diacilgliceroli (composto **39**); in particolare utilizzando 2,4 moli di idrazina per unità di acetato ed una temperatura di reazione inferiore a 45 °C, ho riscontrato rese superiori all'88%. Dopo la tritilazione del gruppo alcolico primario (posizione 6') del glucosio, è stata effettuata una nuova acetilazione (composto **40**), con successiva detritilazione (Wahlstrom e Ronald, 1998) (composto **41**) per consentire l'introduzione del *tosile* in posizione C-6' dello zucchero (composto **42**). Il *tosile* è un ottimo gruppo uscente, utile per favorire la successiva reazione di sostituzione nucleofila in C-6' con un gruppo tioacetato (Fernandez-Bolanos et al., 1993) (composto **43**), che a sua volta è stato ossidato dal perossido di idrogeno per ottenere la funzione solfonica (Amara et al., 2009) del 6'sulfochinovosio (composto **44**). L'ultimo step ha

previsto una nuova deacetilazione con idrazina monoidrata permettendo di conseguire come prodotti finali gli 1,2-di-stearoil-3-O-(1'- β -6'-sulfochinovosil)-gliceroli (composto **45**, 86%). Anche i β -6'-sulfochinovosil-diacilgliceroli e β -6'-sulfochinovosil-monoacilgliceroli sono stati ottenuti attraverso una sintesi chimica versatile e semplice che è basata sulla formazione del legame β -glicosidico con alta stereoselettività tra il donatore, tricloroacetimidato-glucosio e l'1,2-O-isopropilidenglicerolo glicerolo, che è l'accettore. Ancora una volta un ruolo chiave è rappresentato dalla scelta del gruppo protettore delle funzioni ossidriliche dello zucchero, ovvero gli acetati, che guidano la stereoselettività della reazione di accoppiamento attraverso la formazione di uno ione acetossonio, dando esclusivamente derivati β -anomerici e consentono allo stesso tempo di introdurre nella sintesi catene acide sia sature che insature poiché le condizioni di rimozione (idrazina monoidrata) salvaguardano l'integrità delle insaturazioni. Inoltre, anche se la metodica presenta diversi step, questi sono tutti di semplice realizzazione e con alte rese offrendo inoltre la possibilità di introdurre due diverse catene aciliche sul glicerolo (vedi composti **37a** e **37b**) permettendo così di ottenere β -6'-sulfoquinovosil-diacilgliceroli regiopuri con composizione mista delle catene aciliche mista.



Schema 3. Sintesi dei β -6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli

2.5. Sintesi stereospecifica di β -Glucosil- e β -6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli

Come abbiamo detto in precedenza, l'applicazione della metodica sviluppata, garantisce l'opportunità di ottenere composti regiopuri, grazie alla possibilità di indirizzare le catene aciliche sulle due posizioni disponibili sul glicerolo sul glicerolo, ma anche derivati stereopuri, ovvero molecole in cui la configurazione del C-2 del glicerolo è nota e la purezza del prodotto non è alterata dalla presenza dell'altro diastereoisomero nemmeno in minima parte. Tutto ciò è possibile impiegando 1,2-O-isopropiliden-gliceroli enantiopuri (reperibili in commercio), la cui chiralità viene conservata nella fase di accoppiamento col donatore del legame glicosidico. In letteratura è infatti riportato che l'utilizzo della metodica tricloroacetimidato/trifluoruro di boro eterato per la formazione del legame β -glicosidico evita l'epimerizzazione al C-2 degli 1,2-O-isopropiliden-gliceroli enantiomerici, cosa che invece si verifica impiegando le condizioni sperimentali della reazione di Koenigs-Knorr o le procedure di accoppiamento che prevedono l'uso di galattosil-bromuri (Wehrli e Pomeranz, 1969; Wickberg, 1958; Shingu et al., 2003). Quindi, dopo aver apportato modifiche sulla scelta degli zuccheri da impiegare, sulle catene aciliche da introdurre sul glicerolo e sulla configurazione del carbonio anomero, ho realizzato le sintesi stereospecifiche di β -Glucosil e β -6'-sulfochinovosil- 1,2-O-diacilgliceroli. Ovviamente ho applicato le metodiche realizzate per gli altri glicoglicerolipidi da me precedentemente sintetizzati, ma stavolta sono stati utilizzati 1,2-O-isopropiliden-gliceroli enantiopuri, che mi hanno permesso di ottenere i due diastereoisomeri dei β -glucosil- (**46** e **47**) e i due diastereoisomeri dei β -6'-sulfochinovosil- 1,2-diacilgliceroli (**48** e **49**), tutti diacilati con catene sature (acido stearico).

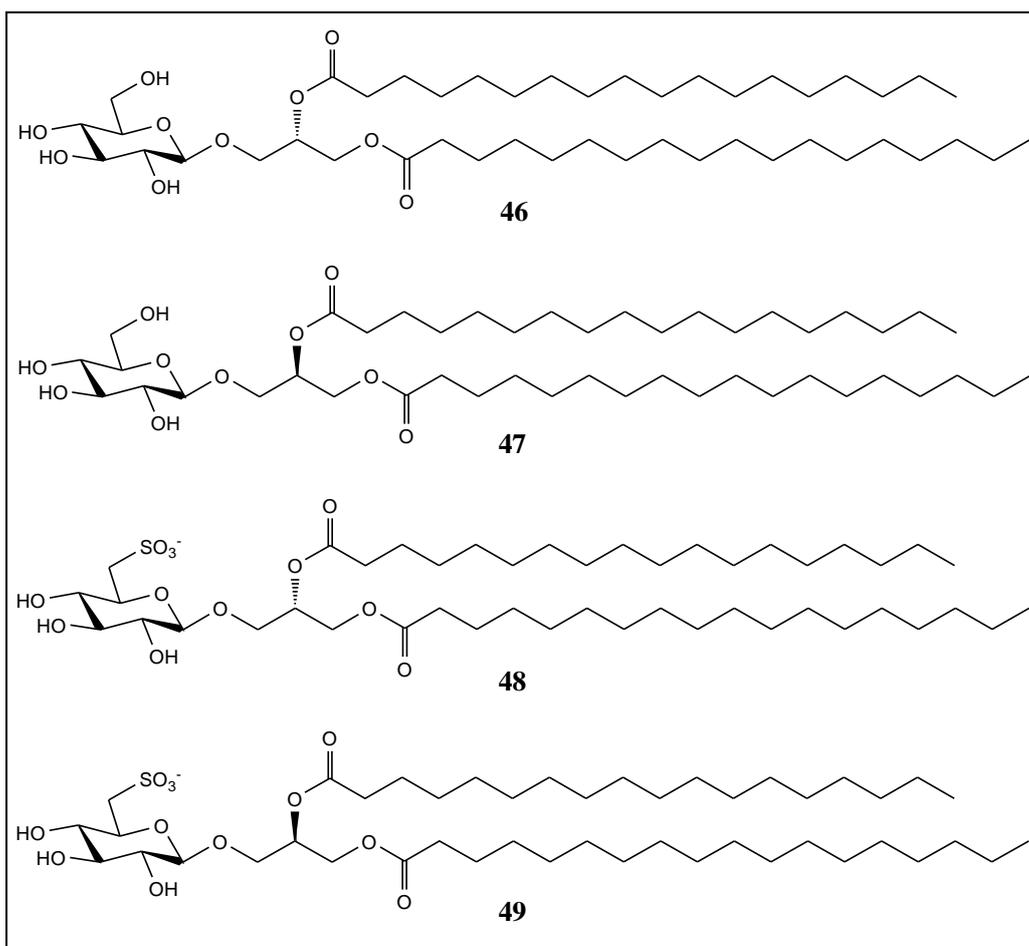


Figura 5. (2S)-1,2-di-stearoil-3-O-(1'-β-6'-glucosil)-glicerolo (**46**);
 (2R)-1,2-di-stearoil-3-O-(1'-β-6'-glucosil)-glicerolo (**47**);
 (2S)-1,2-di-stearoil-3-O-(1'-β-6'-sulfochinovosil)-glicerolo (**48**);
 (2R)-1,2-di-stearoil-3-O-(1'-β-6'-sulfochinovosil)-glicerolo (**49**).

CAPITOLO 3

Glicoglicerolipidi fluorescenti

3.1. Glicoglicerolipidi & fluorescenza

La fluorescenza, proprietà che hanno alcune sostanze di riemettere radiazioni elettromagnetiche precedentemente assorbite, ha avuto finora larga applicazione nella chimica e nella biochimica. Tra le varie applicazioni possibili c'è la possibilità di studiare e riconoscere biomolecole quali enzimi, anticorpi, oligonucleotidi ma anche cellule e tessuti (Borisov e Wolfbeis, 2008; Reymond, 2009). Tra i vari probe fluorescenti comunemente utilizzati assumono un ruolo centrale i derivati antracenicici (Molotkovsky et al., 1991) e i BODIPY (Boldyrev e Molotkovsky, 2006) che legati a galattosilceramidi offrono un valido strumento per lo studio della struttura delle membrane biologiche e i derivati pirenici, che legati a derivati di diacilglicerolo, sono utili nello studio di attività lipasiche (Zandonella et al., 1997). I probe fluorescenti assumono quindi particolare importanza nello studio di attività enzimatiche e, in tal senso, sono definiti biosensori in quanto capaci di riconoscere specie biomolecolari interagendo con esse e potendo così essere facilmente rivelate grazie alle normali tecniche fluorimetriche; a tal riguardo una semplice applicazione sfrutta proprio le reazioni specifiche catalizzate da certi enzimi che portano a prodotti facilmente rivelabili se fluorescenti. In questo contesto, un appropriato saggio di attività enzimatica è uno step cruciale per la scoperta e lo sviluppo di nuovi biocatalizzatori. In generale l'attività enzimatica può essere seguita mediante reazioni enzimatiche condotte su substrati naturali e non, e il progresso della reazione può essere monitorato usando differenti metodologie analitiche come l'HPLC, la gas-cromatografia, l'NMR, la spettrometria di massa o semplicemente una TLC (Reymond, 2009). Nel dettaglio, le galattolipasi, specifiche acilidrolasi ampiamente presenti nelle piante verdi (Matsuda e Hirayama, 1979; Sahrah et al., 1994), catalizzano l'idrolisi graduale

dei legami esterei dei mono- e di- galattosildiacylgliceroli. Al fine di purificare tali galattolipasi e/o trovare nuove attività enzimatiche, sono state sviluppate differenti metodiche basate sul controllo dell'attività idrolitica di mono- e digalattosildiacylgliceroli e i saggi di fluorescenza per le biotrasformazioni sono uno strumento essenziale per tali studi enzimatici. Inoltre, i probe fluorescenti potrebbero aprire la strada anche per ulteriori studi di localizzazione di tali molecole all'interno della cellula al fine di chiarire la loro naturale funzione e meccanismo di azione, ma anche per approfondimenti sul loro metabolismo, sull'omeostasi lipidica in generale oppure per incrementare le conoscenze sulla biosintesi dei DGDG a partire dagli MGDG. Per questi motivi, ho pensato di applicare la strategia sintetica sinora descritta al fine di ottenere β -galattosildiacylgliceroli fluorescenti poichè mai preparati finora e potenzialmente utili come "strumento" di valutazione dell'attività enzimatica. In particolare tra tutti i metodi di controllo possibili, la cromatografia su strato sottile rappresenta una via molto semplice e di facile applicazione per seguire l'attività di idrolisi lipidica.

3.2. Sintesi di β -monogalattosil-1,2-O-diacilgliceroli fluorescenti

L'obiettivo del lavoro era riuscire ad ideare e realizzare un'opportuna metodica sintetica per l'ottenimento di β -galattosildiacylgliceroli fluorescenti (**Figura 6**, composti **50** e **51**) funzionalizzati nella porzione glicerolica da acido arachidonico e da un gruppo acilico pireneacetico modificato (lunghezza d'onda di eccitazione 342 nm e lunghezza d'onda di emissione 376 nm), che presenta una fluorescenza intensa e visibile mediante l'eccitazione con una lampada con emissione a 366 nm. Il pirene è tra fluorofori più comuni ed è stato largamente utilizzato come metodo di rivelazione di fluorescenza per una vasta gamma di molecole, tra cui i lipidi (Rasmussen e Hermetter, 2008). La scelta del gruppo pireneacetico, come tag fluorescente per i β -galattosil diacylgliceroli, era basata su diversi fattori: elevato coefficiente di estinzione con fluorescenza stabile,

inerzia chimica e compatibilità con studi biologici, stabilità durante la sintesi chimica, facilità d'uso e disponibilità. Inoltre, un altro vantaggio è rappresentato dal fatto che nel caso di cellule foto sintetiche (cianobatteri, piante ed alghe) l'emissione blu-verde del pirene non è coperta da quella rossa della clorofilla.

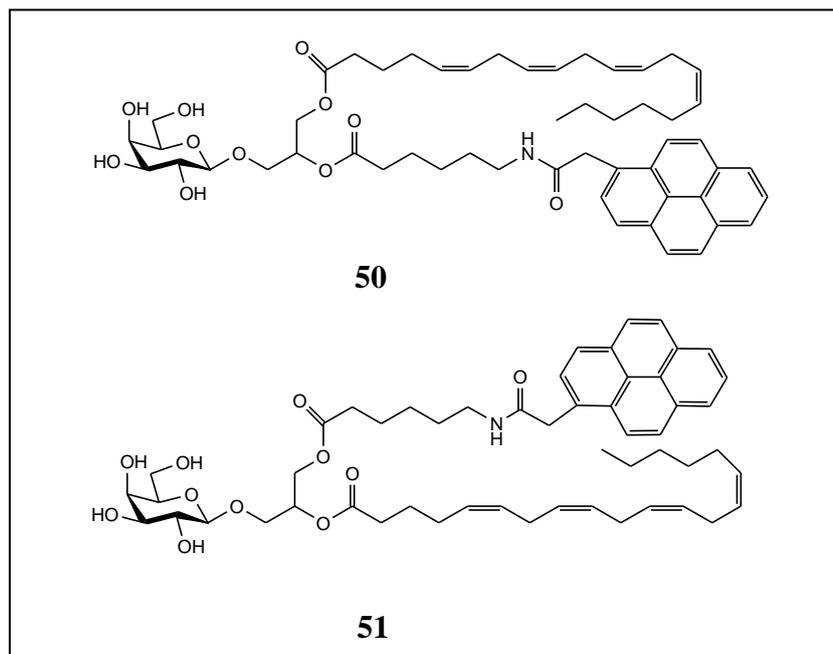
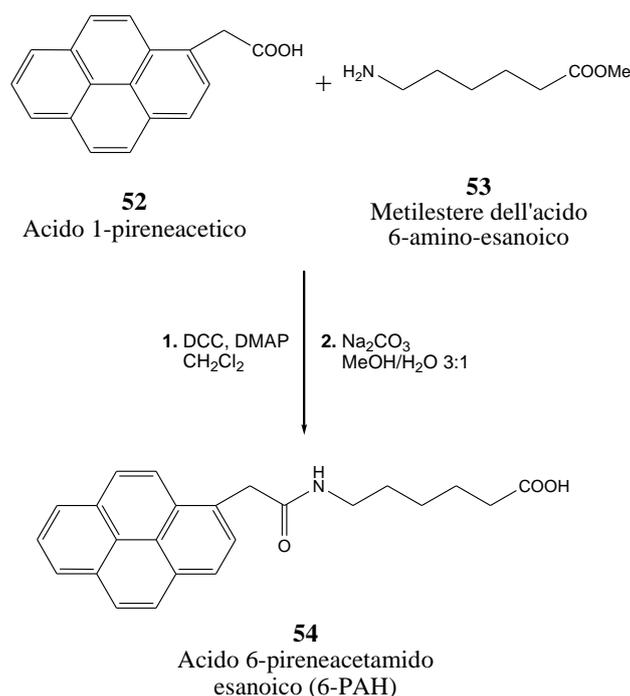


Figura 6. I due regioisomeri β -galattosil diacilgliceroli fluorescenti

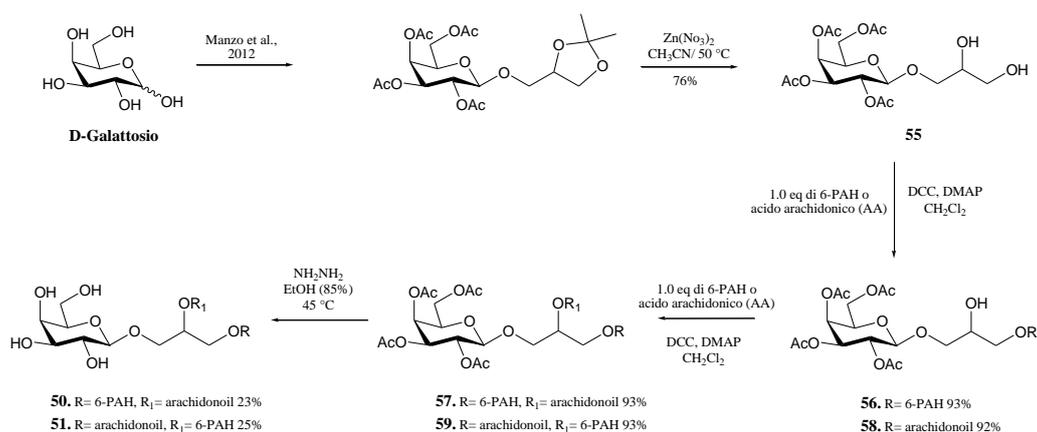
Nello **schema 4** è mostrata la sintesi della porzione pireneacetica fluorescente prima che fosse accoppiata al sintone β -galattosilglicerolico; in particolare si può notare la reazione di condensazione tra l'acido 1-pireneacetico (**52**) (reperibile in commercio) e l'estere metilico dell'acido 6-amino-esanoico (**53**), utilizzando N,N'-dicicloesilcarbodiimide (DCC) e 4-dimetilamminopiridina (DMAP), che ci ha permesso di ottenere il metilestere del gruppo fluorescente e, dopo idrolisi alcalina, la sua forma acida, ovvero l'acido 6-pireneacetamido-esanoico (composto **54**) (6-PAH).



Schema 4. Sintesi dell'acido 6-pireneacetamido-esanoico

Nello **schema 5** è mostrata la sintesi dei β -galattosil diacilgliceroli accoppiati all'acido arachidonico e al probe pireneacetico fluorescente precedentemente preparato. La procedura di sintesi è ovviamente sviluppata secondo la metodica sinora descritta e presente in letteratura (Manzo et al. 2012), ovvero siamo partiti con un'acetilazione del gruppo D-galattosio, seguita da deacetilazione selettiva del gruppo idrossilico anomero con benzilammina. L'accoppiamento con l'1,2-O-isopropilidenglicerolo mediante la metodologia del trichloroacetimidato/trifluoruro di boro eterato (Manzo et al., 2012 a; Schmidt e Michel, 1980; Schmidt, 1986) ha dato il derivato β -galattosil-1,2-O-isopropilidenglicerolico in buone rese (80%). Anche in questo caso si può notare come il gruppo acetato in C-2' dello zucchero orienti l'attacco equatoriale con altissima stereoselettività, come dimostrato mediante analisi ¹H-NMR che ha mostrato segnali solo per il β -isomero ($\delta = 4.51$, $J = 7.7$ Hz, H-1'). Il diolo (composto **55**) è stato quantitativamente ottenuto mediante idrolisi selettiva dell'*acetone* con nitrato di zinco esaidrato in aceto nitrile (Manzo et al., 2012

a, Schmidt e Michel, 1980; Schmidt, 1986; Vijayasradhi et al., 2000). A questo punto il glicerolo libero è stato esterificato con un equivalente di acido 6-pireneacetamido-esanoico precedentemente preparato (**Schema 5**) o di acido arachidonico (AA), producendo alternativamente i monoacil derivati, rispettivamente **56** e **58**. In particolare, quantità equimolari di reagenti garantiscono l'esterificazione esclusivamente della posizione C-1 del glicerolo (Manzo et al., 2012 a), come indicato dagli spettri NMR (per esempio **7**) che ha mostrato shift di segnale per i protoni H₂-1 segnali a δ 4.12, intervallo lungo correlazione di H₂-1 per l'estere carbossilico a δ 173,4 e risonanze di H-2 a 3,94 ppm. Successivamente, l'introduzione sul C-2 dei composti **56** e **58** dell'acido arachidonico e dell'acido 6-pireneacetamido-esanoico ha portato rispettivamente ai derivati diacilati **57** e **59**, i quali, tramite rimozione selettiva dei gruppi acetati sull'unità zuccherina con idrazina idrata sono stati convertiti a regioisomeri fluorescenti dei β -galattosil-diacilgliceroli, ovvero il 3-O- β -galattosil-1-[6''-acetamido]-esanoil-2-arachidonoil-glicerolo e il 3-O- β -galattosil-1-arachidonoil-2-[6''-acetamido]-esanoil-glicerolo (rispettivamente **50** e **51**) che differiscono tra loro per le posizioni che le catene aciliche occupano sul glicerolo; in quest'ultima reazione non abbiamo ottenuto rese elevate a causa di parziali idrogenazioni dei doppi legami delle catene arachidonoiliche (Mannock et al., 1987; Nagatsu et al., 1994; Janwitayanuchit, 2003; Bashkatova et al., 1971; Bashkatova et al.; 1973).



Schema 5. Sintesi dei β -galattosil-1,2-O-diacilgliceroli fluorescenti

In solventi organici e soluzioni tamponate (pH= 7.2), i probe **50** e **51** hanno evidenziato spettri di fluorescenza simile a quelli del pirene con un picco principale di eccitazione a 342 nm e due bande di emissione a 376 e 395 nm (**Figura 7**). L'emissione fluorescente potrebbe essere facilmente controllata individuando direttamente i prodotti su lastre TLC attraverso la visualizzazione mediante lampada UV ad una lunghezza d'onda di 365 nm. Significativamente, l'intensità di emissione è rimasta stabile durante il *work-up* chimico e anche le macchie fluorescenti erano rilevabili entro 30 minuti dallo sviluppo TLC, il che può essere importante per molte potenziali applicazioni di questi glicolipidi.

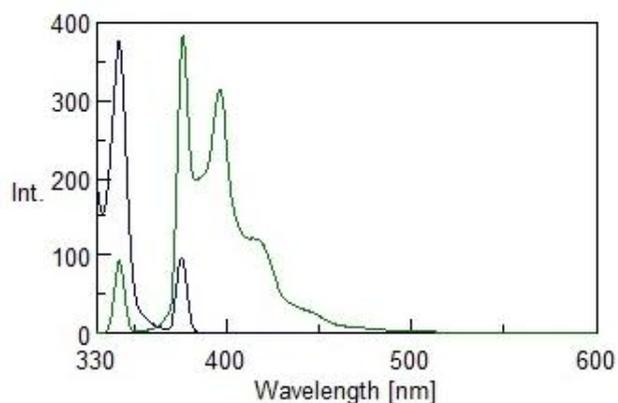


Figura 7. Spettri di eccitazione (nero) e emissione (verde) del 3-O- β -galattosil-1-[6''-acetamido]-esanoil-2-arachidonoil-glicerolo (**50**) in MeOH ad una concentrazione di 7,4 mM.

3.3. Saggi enzimatici

I tuberi di patata contengono enzimi in grado di idrolizzare i galattolipidi (Andrews et al., 1988); queste proteine sono appartenenti alla classe delle acil-idrolasi lipolitiche (LAH), rappresentano fino al 40% delle proteine totali nei tuberi e la loro attività è sufficiente per idrolizzare rapidamente molecole fosfolipidiche e galattolipidiche naturali e non (Shah, 2005; Matos e Pham-Thi, 2009; Matos et al., 2001). Per questo motivo, abbiamo deciso di testare l'idrolisi dei composti **50** e **51** su omogenati di patate al fine di verificare se il fluoroforo influenzasse il riconoscimento dei β -galattosil-diacilgliceroli da parte degli enzimi LAH. Gli omogenati proteici dei tuberi di patata sono stati ottenuti mediante precipitazione con solfato di ammonio 40-70% seguita da dialisi (Macrae et al., 1998; Anderson et al., 2002), mentre l'attività LAH è stata testata con successo su galattolipidi naturali ottenuti da diatomee marine in accordo con le condizioni presenti in letteratura (D'Ippolito et al., 2004). A questo punto, due aliquote di omogenato di tubero di patata sono state incubate separatamente, ognuna contenente 200 μ g di sonda fluorescenti diverse, rispettivamente **50** e **51**. Dopo un'ora di incubazione, mentre il composto **50** rimane sostanzialmente inalterato, l'analisi TLC ha evidenziato la scomparsa quasi completa del composto **51**, con formazione di una macchia fluorescente avente Rf inferiore (**Figura 8 a-b**). Per caratterizzare il prodotto, gli estratti organici derivanti dal buffer di incubazione sono stati metilati con CH_2N_2 e purificati mediante cromatografia su gel di silice. Le analisi NMR e MS della macchia fluorescente neoformata hanno evidenziato la presenza di una miscela dei composti **60** e **61**, ovvero rispettivamente il 3-*O*- β -galattosil-1-[6''-acetamido]-esanoil-glicerolo e il 3-*O*- β -galattosil-2-[6''-acetamido]-esanoil-glicerolo (**Figura 9**) in rapporto 15:85 derivanti dal composto **51** che ha subito idrolisi della catena di acido arachidonico (**figura 8c**). Il derivato **60** è il prodotto della migrazione intramolecolare termodinamicamente favorita del 6-PAH dalla posizione secondaria alla

posizione primaria di glicerolo. Questi dati sono stati pienamente confermati mediante analisi GC/MS degli estratti che hanno rivelato un significativo rilascio di acido arachidonico solo dal composto **51**.

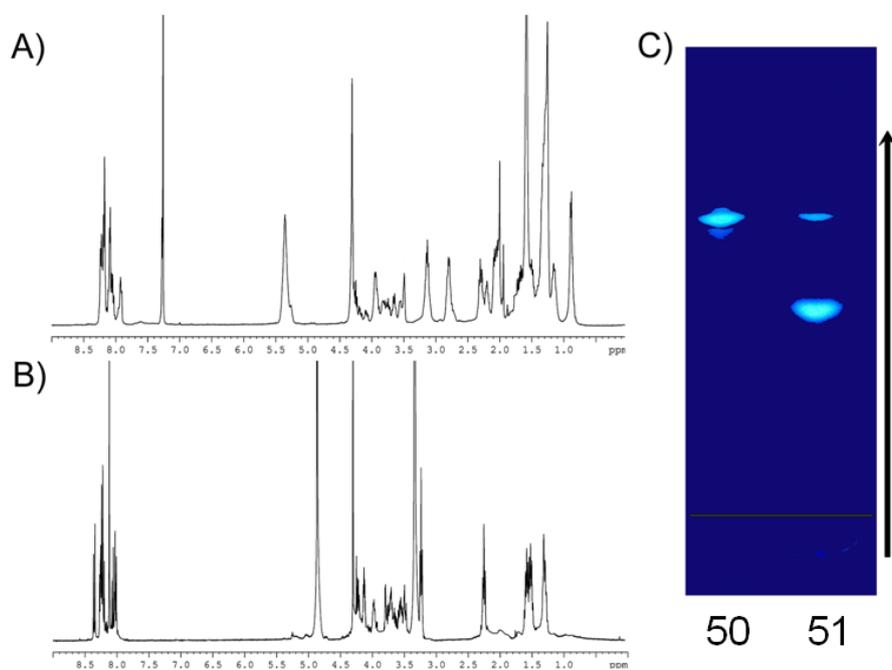


Figura 8. β -galattolipide fluorescente **51** idrolizzato dall'omogenato di tubero di patate:

A) ¹H-NMR (CDCl₃) del composto **51**;

B) ¹H-NMR (CDCl₃) del prodotto **60** scoperto dopo la reazione enzimatica;

C) SiO₂-TLC (CHCl₃/MeOH/H₂O 65:25:4); analisi della reazione dopo un'ora sotto lampada UV settata a 366 nm. Composto **51** R_f= 0.75; Composto **60** R_f= 0.60;

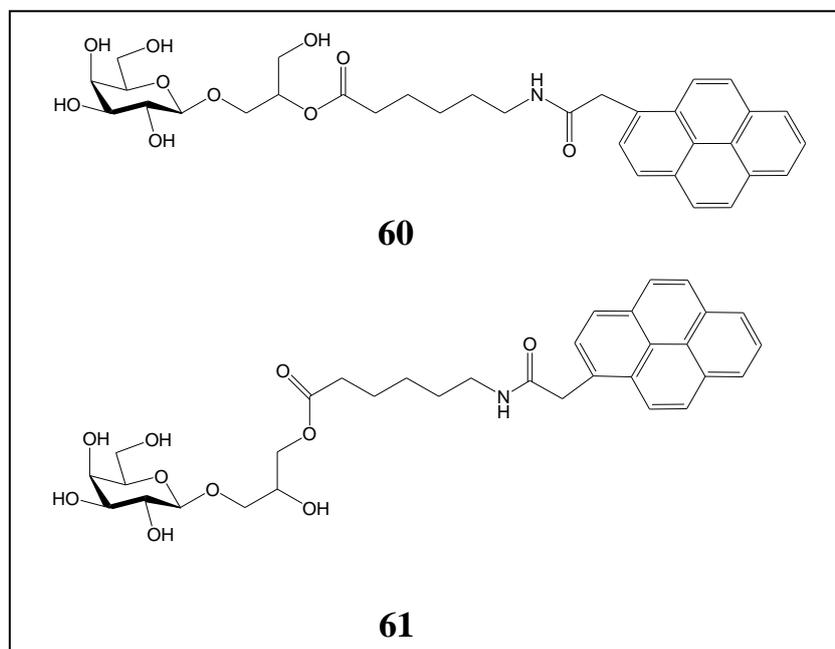


Figura 9. Prodotti derivanti dall'idrolisi del composto **51**

In questo lavoro sono state preparate e caratterizzate due molecole glicoglicerolipidiche contenenti un derivato pirenico (**50** e **51**) che, detenendo proprietà di fluorescenza, sono state utilizzate per monitorare il metabolismo dei galattolipidi. In particolare, il composto **51** ha dimostrato di essere molto efficace per valutare l'attività idrolitica degli enzimi LAH del tubero di patata, membri di una vasta classe di enzimi che svolgono un ruolo fondamentale nel rimodellamento lipidico e nella modulazione di segnali cellulari nelle piante (Baulande e Langlois, 2010; Grienberger et al., 2010). Le analisi mediante TLC sono state molto veloci da eseguire e la visualizzazione degli analoghi galattolipidi fluorescenti sotto una lampada UV è semplice e facilmente utilizzabile. Tale applicazione può essere considerata un "Proof of concept" poiché i probe fluorescenti potrebbero divenire fondamentali in una serie di applicazioni finalizzate, ad esempio, allo studio di sintesi, meccanismi di confezionamento e trasferimento di MGDG e DGDG, ma anche per studi sulla localizzazione cellulare e sull'omeostasi lipidica. D'altra parte, il derivato **50** è stato solo marginalmente idrolizzato dall'omogenato di tubero di patate suggerendo così che il gruppo pirenico in posizione sn-1 del glicerolo possa

verosimilmente ostacolare l'interazione tra l'enzima (o enzimi) idrolitico ed il suo substrato, conferendo una notevole stabilità biochimica che rende tali molecole di potenziale applicazione nella microscopia a fluorescenza o nella biosintesi di DGDG. Derivati galattoglicerolipidici come **50** e **51** sono particolarmente interessanti dal punto di vista sintetico poiché il residuo 6-PAH può essere facilmente introdotto mediante condensazione con DCC, è compatibile con l'uso di acidi grassi polinsaturi ed è stabile in condizioni idrolisi blande come ad esempio quelle utilizzate per la rimozione dei gruppi acetati (idrazina monoidrata). Anche in questo caso la semplicità e la riproducibilità della metodica possono garantire un'ampia varietà di composti che può essere facilmente preparata, ad esempio, variando la porzione zuccherina, le catene aciliche o anche i siti di attacco per i probe fluorescenti, offrendo così un approccio utile e versatile per la preparazione di sonde lipidiche affidabili e sensibili.

CAPITOLO 4

Immunità e lipidi

4.1. Immunità naturale e immunità acquisita

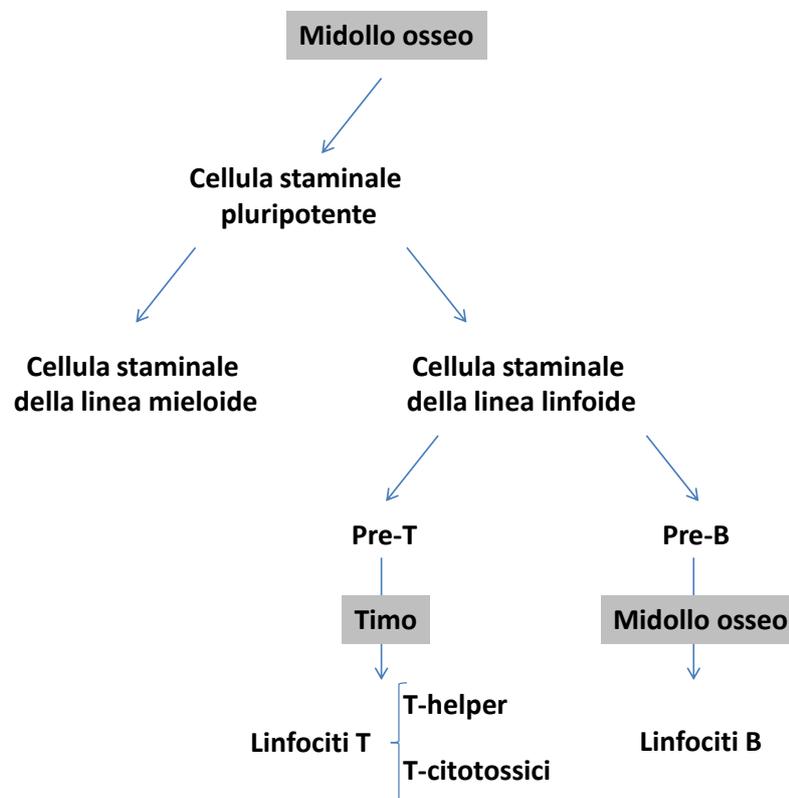
L'immunità è stata definita come la capacità di resistere alle infezioni. Questa capacità si esplica non soltanto nei confronti di batteri o virus, ma anche verso tutto ciò che viene riconosciuto dall'organismo come estraneo. Queste reazioni possono presentarsi in molte forme, alcune delle quali anomale, per cui risulta che l'immunità non dà solo protezione, ma può essere anche causa di malattia. La risposta immunitaria ha due forme differenti: una naturale e non dotata di specifici meccanismi di difesa ed un'altra conosciuta come immunità acquisita determinata da un complesso sistema di reazioni cellulari ed umorali che si sviluppa in seguito a ripetute esposizioni a sostanze estranee. L'immunità naturale o innata viene ereditata e non dipende da un precedente incontro con la sostanza estranea, ma entra in funzione nel momento in cui quest'ultima tenta di penetrare nell'organismo; siccome è un meccanismo di difesa aspecifico non fornisce la possibilità di mantenere il ricordo di tale incontro con le cellule del sistema immunitario. L'immunità innata è affidata principalmente ai macrofagi e ai granulociti neutrofili, che raggiungono la sostanza estranea, la fanno aderire alla loro superficie per poi inglobarla e distruggerla mediante sostanze dotate di attività enzimatica; questo processo prende il nome di fagocitosi. Essa si realizza anche attraverso l'intervento del sistema del complemento, costituito da varie proteine plasmatiche (numerate da C1 a C9) che interagiscono tra loro, attivandosi progressivamente a cascata: il complemento interviene nell'infiammazione, nella rimozione dei complessi antigene-anticorpo, nella lisi di cellule e microorganismi. L'immunità acquisita, invece, si basa su una risposta specifica stimolata da sostanze che agiscono come antigeni. Per antigene si intende una sostanza chimica che può indurre una risposta immunitaria specifica; generalmente si tratta di innocue proteine. Questa

risposta fu inizialmente associata ad una produzione di proteine in grado di riconoscere e legarsi all'antigene, dette anticorpi o Immunoglobuline (Ig). Questa iniziale reazione, in realtà, viene poi amplificata da una serie di eventi che coinvolgono un po' tutte le cellule del sistema immunitario come linfociti e macrofagi, ma anche basofili ed eosinofili. L'immunità acquisita si basa sulla capacità che il nostro sistema immunitario ha di distinguere il self dal non-self, ovvero riconoscere strutture appartenenti all'organismo (*self*) e strutture estranee e quindi potenzialmente pericolose (*non self*), in modo che la risposta immunitaria venga condotta unicamente nei confronti di queste ultime, quindi di generare memoria immunologica, e di montare una reazione combinata di più cellule detta immunocompetenza (Chevanne, 2004; Abbas et al.; 2010; Abbas et al., 2012).

4.2. Le cellule del sistema immunitario

Tutte le cellule del sistema immunocompetente discendono dalle primitive cellule staminali emopoietiche del midollo osseo. I linfociti sono cellule piccole, poco più grandi di un globulo rosso, con nucleo rotondo e poco citoplasma. Tutti i linfociti derivano dalla cellula staminale midollare (**Schema 6**) pre-linfoide da cui origineranno due distinte linee cellulari: i precursori di una linea migreranno al timo e matureranno in T-linfociti, i precursori dell'altra linea rimarranno nel midollo osseo e matureranno in B-linfociti. Timo e Midollo Osseo sono considerati organi linfoidei primari. In questi organi i Pre-Linfociti vanno incontro a maturazione, presentando in questa fase particolari proteine sulla superficie cellulare, le proteine CD, dette anche marcatori di membrana poichè li differenziano tra loro (CD = cluster of differentiation). Questi marcatori vengono espressi selettivamente durante i vari stadi della differenziazione cellulare; alcuni sono espressi solo dai T, altri solo dai B. Una volta raggiunta la maturazione, questi linfociti maturi, detti "vergini", migreranno verso gli organi linfoidei secondari. Tra questi i più importanti sono la milza ed i linfonodi, in cui i linfociti costituiscono la parte più cospicua della

popolazione. I linfociti si trovano anche nella mucosa gastrointestinale e bronchiale dove formano il cosiddetto tessuto linfoide mucosa-associato (MALT), che a differenza di milza e linfonodi, non ha capsula e le sue cellule sono parte integrante della mucosa. I linfociti T e B hanno funzioni distinte anche se morfologicamente non sono distinguibili né al microscopio ottico né al microscopio elettronico, ma esclusivamente attraverso tecniche di immunochimica che sono in grado di identificare dei marcatori di membrana, tramite l'uso di anticorpi "colorati" (per esempio da sostanze fluorescenti) (Chevanne, 2004; Abbas et al.; 2010; Abbas et al., 2012).



Schema 6. La maturazione dei linfociti

4.2.1. La maturazione dei linfociti

I linfociti B o "borsa-dipendenti", vengono a maturazione nel midollo osseo. Il nome deriva da un organo degli uccelli (Borsa di Fabrizio) dove

furono individuati per la prima volta. Il loro compito è di produrre anticorpi, proteine solubili deputate alla individuazione ed al legame con l'antigene. I linfociti T, o "timo-dipendenti", sono linfociti maturati nel timo. Essi costituiscono i due terzi di tutti i linfociti del sangue e si ritrovano nella zona paracorticale dei linfonodi e nell'area periarteriolare della milza. Ci sono diverse sottopopolazioni dei linfociti T: i più importanti sono i T-helper (TH) o adiutori ed i T-citotossici (TC). I T-helper hanno una funzione regolatrice, infatti partecipano attivamente alla risposta immunitaria contro l'antigene aiutando le cellule B nella produzione degli anticorpi e liberando linfocine, molecole che sono alla base dei fenomeni di collaborazione cellulare durante la risposta immunitaria. I T-citotossici hanno invece funzione effettrice poiché uccidono le cellule infettate da virus e le cellule tumorali che vengono riconosciute estranee all'organismo. Un'altra categoria, i T-soppressori modulano la produzione di anticorpi, sopprimendone la produzione eccessiva o non richiesta. I linfociti che arrivano a maturazione negli organi linfoidei primari sono linfociti vergini, ovvero la loro maturazione è avvenuta in un ambiente isolato dall'esterno perciò lontano dall'antigene, in pratica non hanno ancora incontrato l'antigene. Negli organi linfoidei secondari, se incontrano l'antigene, vanno incontro ad una attivazione che li porta a proliferare ed aumentare enormemente il loro numero. Durante la maturazione negli organi linfoidei primari, i linfociti vergini presentano sulla membrana varie strutture proteiche tra cui le CD ed il recettore specifico capace di riconoscere uno ed un solo antigene. Le proteine CD, come già accennato, sono vere e proprie molecole di riconoscimento, infatti i linfociti T-helper sono marcati dalla molecola CD4 e perciò conosciuti anche come cellule CD4⁺, analogamente i linfociti T-citotossici sono noti anche come cellule CD8⁺. Tutte le cellule T hanno in comune sulla loro superficie il TCR che è essenziale per l'attività dei linfociti T, mentre le cellule B avranno a loro volta un analogo recettore: il BCR, utilizzato per riconoscere e quindi legarsi agli antigeni. Le diverse abitudini di vita dei microrganismi richiedono diversi meccanismi sia di riconoscimento che

di distruzione, e questa è infatti una delle ragioni per cui ci sono due tipi di recettori aventi differenti composizioni: i recettori BCR non sono altro che immunoglobuline con un frammento inserito nella membrana cellulare, ed i recettori TCR, sono eterodimeri più piccoli dei BCR. Analogamente il riconoscimento e legame dei due recettori con il proprio antigene si attua attraverso due vie completamente differenti: le cellule B riconoscono gli antigeni che si trovano all'esterno della cellula, le cellule T quelli generati all'interno della cellula. In virtù della specificità del singolo recettore, una cellula è in grado di riconoscere uno ed un solo antigene. Tale recettore, come tutti i costituenti proteici cellulari, è codificato da un'informazione scritta nel genoma e come tutti gli altri geni ereditati dai nostri genitori, anche i geni che codificano per il TCR o il BCR sono in tutte le cellule del corpo, ma vengono attivati solamente in quelle cellule che hanno intrapreso la differenziazione che le ha portate a diventare linfociti ed in particolar modo linfociti T o linfociti B. La loro attivazione avviene tramite complessi riarrangiamenti genici per cui viene formato un elevato numero di recettori diversi che rappresentano metaforicamente innumerevoli serrature per chiavi specifiche, ovvero gli antigeni. Questi recettori si formano prima dell'incontro con l'antigene, quindi è possibile che non esista l'antigene specifico per quel determinato recettore o che l'incontro tra i due non avvenga; il risultato è che la cellula che porta quel recettore dopo un po' andrà incontro a morte per apoptosi. Se invece incontrerà l'antigene andrà incontro ad espansione clonale e da una cellula nasceranno migliaia di cellule uguali capaci di rispondere a quel determinato antigene. Nel caso dei linfociti B la maturazione determinerà un'ulteriore differenziazione: una parte darà origine alle plasmacellule, capaci di produrre anticorpi ed un'altra parte evolverà a cellule della memoria immunitaria; queste ultime saranno capaci di rendere l'organismo più pronto alla risposta di difesa in caso di un secondo contatto con l'antigene (Chevanne, 2004; Abbas et al.; 2010; Abbas et al., 2012).

4.2.2. *L'incontro con l'antigene*

L'incontro tra il linfocita e l'antigene deve avvenire negli organi linfoidi secondari; se avviene negli organi linfoidi primari, ovvero quando ancora è in corso la maturazione, la cellula va in apoptosi e muore, ma negli organi linfoidi primari è più probabile che i linfociti incontrino i costituenti del nostro organismo, ovvero i costituenti del SELF. Anche il legame linfociti-componenti SELF determinerà morte cellulare e questa delezione clonale darà origine alla tolleranza immunitaria (in questo caso tolleranza centrale) verso il SELF stesso, ovvero verso i componenti dell'organismo. Questo avviene sia per i linfociti B che per i T; di contro un'alterazione di questo meccanismo sfocerà nelle malattie autoimmuni. Esiste una popolazione di linfociti che ha sulla superficie gli stessi markers del linfociti T, ma non ha il riarrangiamento per il TCR; queste cellule rappresentano circa il 10-15% dei linfociti circolanti e sono conosciute come natural killer (NK). La loro funzione è di attaccare cellule infettate da virus ed uccidere cellule tumorali o cellule estranee senza una precedente sensibilizzazione. Considerando l'enorme numero di recettori espressi dall'intera gamma dei piccoli linfociti di un organismo è facile pensare che il numero dei linfociti vergini in grado di rispondere ad un determinato antigene deve essere estremamente esiguo, limitando molto la possibilità di un incontro tra quest'ultimi e i corrispondenti specifici antigeni. In realtà il tessuto linfoide periferico costituito da vari organi, tra cui linfonodi e milza, è attraversato continuamente sia dai linfociti vergini che dagli antigeni che hanno scavalcato le difese primarie dell'organismo o sono stati trasportati dalle varie sedi di infezioni dalla linfa, per cui la continua circolazione di entrambi lungo il torrente linfatico farà sì che l'incontro linfocita-antigene avvenga quasi certamente. Il legame che si instaura tra antigene e recettore antigene specifico presente sulla membrana di un linfocita innesca l'espansione clonale ed il differenziamento che danno origine ad un clone di cellule effettrici attive, capaci cioè di liberare l'organismo dai microrganismi che hanno provocato la risposta immunitaria. Tuttavia la stimolazione tramite il legame con l'antigene è

necessaria ma non sufficiente ad attivare il linfocita. Perché avvenga l'espansione clonale ed il differenziamento dei linfociti vergini è infatti indispensabile anche un secondo segnale proveniente da altre cellule. Per le cellule B questo segnale proviene dai linfociti T-helper; per le cellule T può venire dai linfociti B, dai macrofagi o dalle cellule dendritiche. Queste ultime sono dette cellule APC, dall'inglese antigen presenting cell, ovvero cellule in grado di presentare l'antigene, cioè di esporlo per permettere il successivo riconoscimento da parte del linfocita. Più precisamente, le cellule APC sono in grado di riconoscere un organismo estraneo e di inglobarne l'antigene; una volta incorporato l'antigene, si allontanano dal tessuto in cui risiedono e migrano verso i linfonodi. Durante questo tragitto sono sottoposte ad un cambiamento morfologico che le rende più adatte a svolgere il loro compito: la cellula APC ritrae le appendici tentacolari citoplasmatiche, se ne aveva, e aumenta le molecole di membrana per l'interfaccia con i linfociti T-helper. L'antigene è intanto degradato da enzimi litici nel proteosoma o nel lisosoma della cellula, e gli epitopi, ovvero particolari polipeptidi dell'antigene risultanti a cui si può legare un anticorpo, vengono inseriti negli appositi siti dell'MHC (Complesso Maggiore di Istocompatibilità). Se il complesso antigene-proteine dell'MHC viene riconosciuto da un recettore TCR di un linfocita T, con conseguente interazione, e se la stimolazione e costimolazione sono sufficienti, ha inizio l'espansione clonale e quindi la risposta immunitaria. Dunque, le cellule APC, come ad esempio le cellule dendritiche, esplicano un'azione determinante per quelli che sono i meccanismi alla base della risposta immunitaria. Basti pensare che quando un antigene è presentato da altri tipi di cellule, per esempio da degli epatociti, si tratta di un antigene autologo che non ha capacità co-stimolatoria e che determina tolleranza immunitaria (tolleranza periferica). Questi antigeni autologhi espressi, ad esempio, dagli epatociti, trovandosi in organi periferici non possono incontrare linfociti nei primi stadi di sviluppo e quindi le cellule reattive nei loro confronti non subiscono delezione clonale. Inizialmente non c'è tolleranza immunitaria; tuttavia, siccome gli

epatociti non hanno la capacità co-stimolatoria necessaria per l'attivazione del linfocita vergine, cioè non sono APC, gli antigeni autologhi non innescano alcuna risposta ed il linfocita viene inattivato e diviene anergico, incapace cioè di rispondere all'antigene anche se quest'ultimo verrà successivamente presentato da una cellula APC (Chevanne, 2004; Abbas et al.; 2010; Abbas et al., 2012).

4.2.3. *Gli anticorpi*

Il primo prodotto specifico della risposta immunitaria ad essere stato identificato è la molecola anticorpale. Gli anticorpi sono proteine ritrovate nella parte liquida del sangue, il plasma, e nei fluidi extracellulari, chiamate anche immunoglobuline (Ig) o gamma-globuline e prodotte da cellule specifiche dette plasmacellule. Come detto in precedenza, ai linfociti B spetta il compito di differenziarsi in plasmacellule e tale differenziazione avviene in più stadi. Ciascuno di questi stadi intermedi è caratterizzato da cambiamenti sia della superficie cellulare sia citoplasmatici, riconoscibili con metodi istochimici. La principale caratteristica è l'attivazione dei geni per le immunoglobuline, che si attivano solo nelle cellule B, in modo analogo a ciò che avviene al gene per il TCR, con un complesso riarrangiamento che rende capaci le cellule B di produrre una grande varietà di Ig. Le plasmacellule sono l'ultimo stadio differenziativo dei linfociti B, hanno forma ovale con nucleo rotondo posizionato in maniera eccentrica nel citoplasma. Il citoplasma risulta affine per i coloranti basici, basofilo, grazie al suo abbondante contenuto di acido ribonucleico dei ribosomi e del reticolo endoplasmatico rugoso, dove avviene la sintesi delle Ig. Vi sono cinque classi di Ig: IgM, IgG, IgA, IgE, IgD. Tutte le immunoglobuline sono proteine composte da due catene pesanti e due catene leggere (κ e λ) di aminoacidi. Le catene pesanti possono essere μ , γ , α , ϵ , δ , risultando specifiche della classe; infatti esse determinano le caratteristiche, le proprietà e le funzioni della classe di Ig che rappresentano.

Strutturalmente le immunoglobuline hanno una forma ad Y (**Figura 10**) le cui braccia costituiscono i due siti identici per il legame con l'anticorpo. La porzione che li comprende è detta frammento che lega l'antigene o Fab. Questi siti possiedono un'alta variabilità di struttura (porzione variabile) mentre lo stelo della Y o frammento cristallizzabile Fc, possiede una variabilità limitata ed è conosciuto come regione costante che conferisce all'anticorpo le sue caratteristiche funzionali.

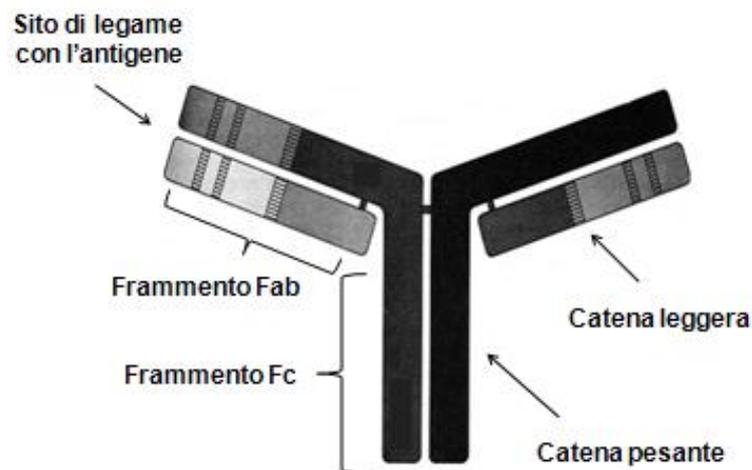


Figura 10. Struttura dell'anticorpo

Sulla base di queste caratteristiche le immunoglobuline si dividono in cinque classi diverse. All'interno della stessa classe le immunoglobuline avranno la stessa struttura morfologica, le stesse funzioni, ma avranno come bersaglio antigeni diversi, se appartengono a cloni diversi. Il frammento Fc si lega a specifici recettori che sono espressi sui macrofagi, sui granulociti polimorfonucleati e su poche altre cellule, e tramite questo legame le Ig sono in grado di attivare quelle cellule. Gli anticorpi reagiscono legandosi ai microrganismi ed ai loro prodotti extracellulari, assicurando la protezione dell'organismo attraverso tre vie principali: la neutralizzazione del patogeno o dei suoi prodotti semplicemente legandosi ad esso; opsonizzando il patogeno e rendendolo più facilmente fagocitabile oppure attivando il complemento. Le

diverse classi di anticorpi si ritrovano a livello di distretti corporei diversi ed agiscono con meccanismi effettori diversi.

Le *IgM* sono composte da cinque unità di base e perciò sono le più grandi (macroglobuline), esse non penetrano facilmente attraverso la parete vasale e non passano la barriera placentare. La loro funzione è di neutralizzare i microrganismi, sono forti attivatori del complemento, sono le prime Ig che si formano dopo l'immunizzazione e sono anticorpi naturali contro gli antigeni ABO dei gruppi sanguigni.

Le *IgG* sono le più piccole e le più numerose. Esse vengono prodotte in piccola quantità dopo l'iniziale immunizzazione ma la loro produzione si amplifica alla seconda esposizione all'antigene. I recettori per il frammento Fc delle *IgG* si trovano sui macrofagi, sui polimorfonucleati, sui linfociti, sugli eosinofili, sulle piastrine e sulla placenta. Esse agiscono come opsonine, ricoprendo il batterio e facilitandone la fagocitosi o la loro distruzione, attivando la via classica del complemento.

Le *IgA* si trovano soprattutto nelle secrezioni delle mucose e nel latte materno. Sono dimeri con una porzione secretoria che le protegge dall'azione digestiva dell'intestino.

Le *IgE* sono presenti solo in tracce nel siero; vengono secrete da plasmacellule sensibilizzate nei tessuti e si attaccano localmente alle mast-cellule. Esse mediano le reazioni allergiche tissutali. Un loro rilascio massivo può provocare lo shock anafilattico.

Le *IgD* sono legate alle membrane delle cellule B e partecipano alla loro maturazione e attivazione.

La prima risposta ad un antigene si basa sulla produzione di *IgM*, ed è transitoria, segue una temporanea produzione di *IgG*. Dopo una seconda esposizione allo stesso antigene, si ha una risposta molto più ampia e pronta con grande produzione di *IgG*. Si parla di "scambio di classe" stimolato da citochine diverse, con funzioni diverse. La produzione di anticorpi comincia con il contatto tra un antigene e le cellule del sistema immunitario e finisce con

la produzione da parte delle plasmacellule di Ig capaci di reagire con l'antigene. Un antigene in grado di evocare una risposta immunitaria è detto antigene completo a differenza degli antigeni incompleti o apteni, che diventano immunogenici se legati ad una molecola più grossa, usualmente una proteina detta carrier. Solo una piccolissima minoranza di antigeni è in grado di stimolare direttamente le cellule B ad esempio il lipopolisaccaride (LPS) di membrana di alcuni batteri, tipo lo stafilococco. Per fare questo il LPS si lega al BCR, poichè tale recettore, come detto, ha la forma e la struttura dell'immunoglobulina che poi il linfocita B produrrà, una volta diventato plasmacellula. Per la maggior parte dei casi però per essere attivato e stimolare una risposta immunitaria contro un certo antigene, il linfocita B ha bisogno dell'aiuto e dell'intervento di altre cellule: le cellule T-helper, che a loro volta devono essere state attivate. Tutte queste attivazioni a cascata hanno origine dal legame tra il recettore di membrana TCR, specifico per quell'antigene e l'antigene stesso, ma i TCR riconoscono e quindi si legano non tanto all'antigene in toto come possono fare i BCR, ma agli epitopi degli antigeni, ovvero alle, già citate, porzioni elaborate e "presentate" dalle APC. I macrofagi ed altre cellule APC come le cellule di Langerhans della cute o le cellule dendritiche follicolari dei linfonodi hanno, come abbiamo già detto, recettori per la porzione Fc delle Ig ed anche per il frammento C3 del complemento; anche il C3, così come le Ig, aiuta la fagocitosi del batterio da parte del macrofago (opsonizzazione) (Chevanne, 2004; Abbas et al.; 2010; Abbas et al., 2012).

4.2.4. Reazione antigene-anticorpo

La maggior parte degli antigeni porta più di un sito antigenico o epitopo, ed è capace quindi di legare più di un anticorpo sulla sua superficie, gli antigeni sono perciò spesso multivalenti. Gli antigeni e gli anticorpi si legano con legami chimico-fisici a formare dei complessi i quali, se l'antigene è solubile, sono circolanti nel plasma. Questi complessi tendono ad allargarsi fino ad una

dimensione tale da renderli fagocitabili dai macrofagi fissi del fegato e della milza. A seconda della dimensione, della carica e della solubilità, i complessi antigene-anticorpo possono rimanere sospesi in circolo per lungo tempo, possono attaccarsi ai globuli rossi per essere portati ad un organo catabolico come il polmone o la milza oppure possono passare attraverso la parete dei capillari, come altre proteine. In questo ultimo caso però, a seconda della loro dimensione, possono rimanere intrappolati e depositarsi nella membrana basale. Anche così intrappolati sono in grado di attivare il complemento, innescando un meccanismo pro-infiammatorio che può creare danni, anche ingenti, al tessuto. Gli anticorpi affini per antigeni insolubili e per le proteine delle superfici cellulari rimangono fissati alle membrane; se si tratta di globuli rossi, gli anticorpi esposti su cellule diverse si legano l'un l'altro provocando, in alcuni casi, l'agglutinazione degli eritrociti. Se il complesso antigene-anticorpo attiva il complemento avremo la lisi cellulare (emolisi) soprattutto per mezzo delle IgG ed IgM (Chevanne, 2004; Abbas et al.; 2010; Abbas et al., 2012).

4.3. Il complesso maggiore di istocompatibilità

Non tutti i microrganismi si sviluppano e crescono nello spazio extracellulare, dove sono accessibili agli anticorpi, anzi tutti i virus ed alcuni batteri o parassiti entrano nelle cellule dove si moltiplicano al sicuro da eventuali attacchi anticorpali. Per liberare l'organismo da questi invasori esiste una diversa modalità di riconoscimento, chiamata risposta immunitaria cellulomediata, di cui sono responsabili i linfociti T. Un virus, ad esempio, è composto da un genoma avvolto in un involucro proteico; quest'ultimo viene perduto quando entra nella cellula ed i geni virali si impossessano dei meccanismi biosintetici cellulari necessari per la formazione di nuove particelle virali. In questo modo il virus spesso determina un effetto citotossico, ovvero uccide la cellula e causa malattia. Le cellule T-citotossiche sono in grado di riconoscere le cellule infettate da un virus specifico e le uccidono prima che il virus completi il suo ciclo replicativo e produca nuove particelle virali. Alcuni

batteri, come ad esempio il *Mycobacterium tuberculosis*, crescono solo dentro le vescicole dei macrofagi, dove sopravvivono poiché inibiscono la fusione con i lisosomi e quindi il meccanismo digestivo. Se i macrofagi sono attivati dai linfociti T-infiammatori diventano capaci di fondere i lisosomi col fagosoma e di digerire i batteri. Le cellule infettate mostreranno sulla loro superficie gli antigeni derivanti dal microrganismo infettante e saranno questi antigeni estranei che verranno riconosciuti dalle cellule T che poi direttamente o indirettamente distruggeranno l'ospite. Questo è il tipico meccanismo d'azione delle cellule APC, quindi, come detto, l'antigene non viene riconosciuto dai linfociti T nella sua forma intatta, come invece avviene per le cellule B, ma piuttosto come frammento proteico derivante da proteine estranee e legato a speciali molecole di superficie. Questa "presentazione" avviene nell'ambito di una struttura proteica di membrana codificata da un gruppo di geni detto complesso maggiore di istocompatibilità o MHC (nell'uomo detto anche HLA, ovvero antigene leucocitario umano) che viene espresso sulla superficie cellulare. Esistono due tipi di MHC, di classe I e di classe II, che differiscono sia per la struttura sia per le funzioni che regolano. Nel caso di un antigene intracellulare la formazione del complesso epitopo-molecole dell'MHC di classe I avviene nel reticolo endoplasmatico dopo che l'antigene è stato processato nel proteasoma e prevede dapprima l'inserimento del frammento peptidico processato all'interno di una struttura o "tasca" situata sulla porzione o "dominio" esterno delle molecole MHC. Successivamente vi è il trasporto della molecola MHC-antigene a livello della superficie cellulare dove avviene l'esposizione del complesso ai linfociti T, i quali tramite il TCR, saranno in grado di riconoscere frammenti antigenici legati alle molecole MHC di classe I. L'esposizione dell'antigene intracellulare è un meccanismo che avviene dunque per via endogena, ed è esclusivo per MHC di classe I. Le proteine dell'MHC di classe II vengono coinvolte quando l'antigene è esogeno; il meccanismo è lo stesso ma con la differenza che intervengono vescicole trasportatrici in grado di inglobare l'antigene extracellulare e condurlo verso i fagolisosomi che lo

processano. Quindi interviene l'MHC II che migra dal reticolo endoplasmatico, raggiunge l'antigene processato per catturarlo e formare così il complesso che verrà esposto sulla porzione extracellulare della membrana plasmatica (via esogena) (**Figura 11**).

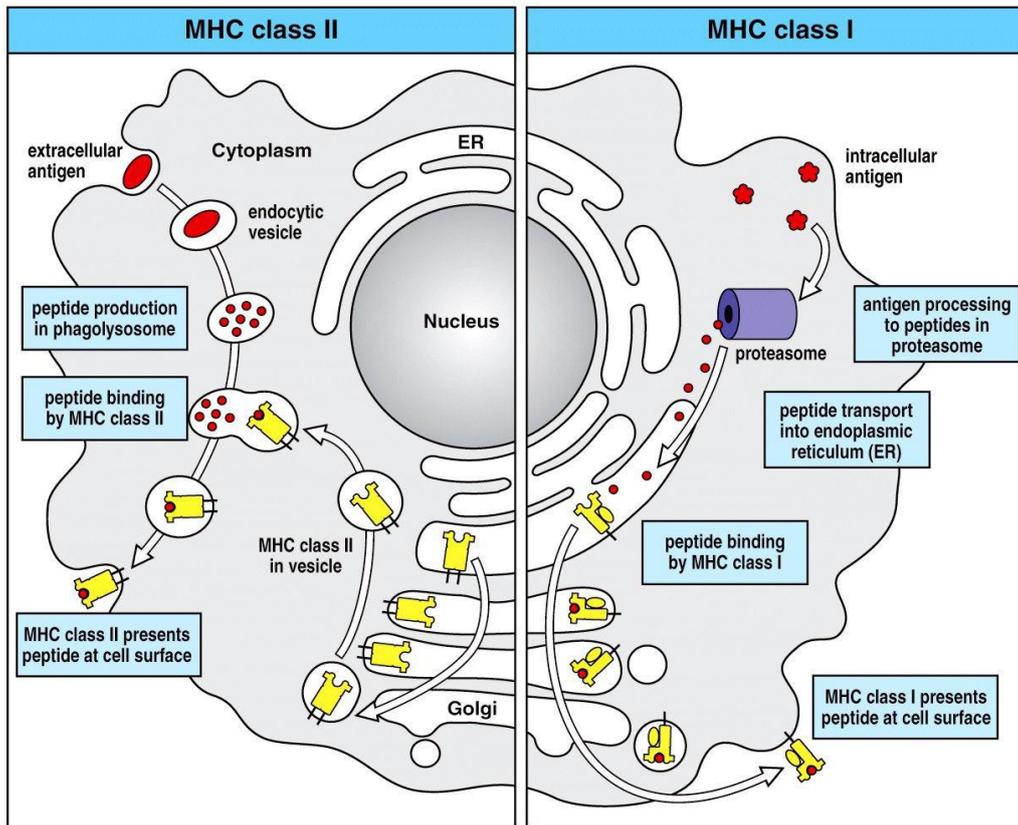


Figura 11. La via esogena e la via endogena utilizzate rispettivamente da MHC II e MHC I per l'esposizione dell'antigene processato

Se MHC presenta peptidi provenienti da proteine derivanti dal normale metabolismo cellulare non esisteranno nell'organismo linfociti in grado di legarsi perché distrutti negli organi linfoidi primari durante la loro maturazione (delezione clonale). Con questo meccanismo i linfociti sono capaci di identificare le cellule contenenti patogeni ed i loro prodotti e distinguerle da quelle non infettate. Le cellule T devono essere anche in grado di rispondere in modo appropriato dopo l'identificazione dei peptidi estranei legati alle molecole MHC. Ad esempio, le cellule infettate da virus devono essere uccise,

mentre i macrofagi, che ospitano batteri con parassitismo intracellulare, e le cellule B, che devono produrre Ig, devono essere attivati. Queste diverse funzioni devono perciò essere mediate da classi diverse di linfociti T: da un lato i T-citotossici riconoscono ed uccidono le cellule infettate attraverso il riconoscimento dell'antigene legato a molecole MHC I, dall'altro i T-helper che individuano l'antigene complessato all'MHC II, promuovendo l'attivazione dei macrofagi e delle cellule B. Tale specificità d'azione è riconducibile alla presenza dei diversi gruppi proteici di riconoscimento presenti sui linfociti T; infatti come sappiamo i T-helper hanno il CD4, mentre i T-citotossici il CD8. Quindi le molecole CD4 e CD8, presenti sulla superficie esterna della membrana dei linfociti, svolgono un ruolo essenziale nel riconoscimento ma anche nella formazione del legame tra i recettori delle cellule T e le rispettive classi di MHC. Infatti molecole CD8 legano MHC I insieme al recettore delle cellule T-citotossiche, mentre le molecole CD4 legano le molecole MHC II assieme al recettore dei linfociti T-helper. Questo legame aumenta l'intensità del segnale e per questa ragione le proteine CD sono definite co-recettori. Nel sangue normale le cellule positive al CD4 sono la maggioranza ed il rapporto CD4/CD8 è circa 2:1. Le molecole MHC I legano peptidi derivanti da patogeni che si replicano all'interno della cellula (ad esempio virus), che possono essere quindi distrutti solo attraverso l'uccisione della cellula stessa. Esse sono presenti su tutte le cellule nucleate dell'organismo e come detto, tramite il legame con il CD8, mediano l'attacco da parte dei T-citotossici. Le molecole MHC II sono presenti invece esclusivamente nelle cellule immunitarie ed APC, e legando peptidi derivanti da proteine degradate dalle vescicole intracellulari, reagiscono con i CD4 mediando l'attacco dei macrofagi, o di altre cellule APC ai T-helper. Per esempio, se un T-helper incontra un linfocita B che presenta sulle sue molecole MHC II il peptide per cui ha il TCR specifico, vi si lega e da questo legame scaturirà l'attivazione del linfocita B, che metterà in moto tutti i meccanismi necessari alla sua replicazione, alla clonazione, ovvero alla genesi di una popolazione di cellule figlie tutte uguali. Queste saranno in grado di

differenziarsi in plasmacellule e produrre anticorpi per quel determinato antigene i cui peptidi hanno innescato la suddetta risposta e in cellule della memoria. Simultaneamente sia le cellule APC che i linfociti T producono linfocine e citochine quali le interleuchine (da IL-1 a IL-12), l'interferone (alfa, beta e gamma), il TNF α (fattore di necrosi tumorale), e vari fattori di stimolazione clonale (CSF). Questi fattori solubili regolano e promuovono l'interazione delle cellule del sistema immunitario tra loro (Chevanne, 2004; Abbas et al.; 2010; Abbas et al., 2012).

4.4. Immunopatologia

Alcune risposte immunitarie acquisite sono provocate da antigeni non legati ad agenti infettivi, cioè da sostanze “innocue” all'organismo e tali risposte possono essere causa di gravi malattie. La risposta impropria verso sostanze estranee innocue si chiama allergia o ipersensibilità mentre la risposta contro antigeni tissutali propri si chiama autoimmunità (Abbas et al., 2010; Abbas et al., 2012).

4.4.1. Reazioni di ipersensibilità

Le reazioni patologiche di ipersensibilità sono classificate in quattro gruppi, ciascuno dei quali è mediato da meccanismi distinti:

- Tipo I – Anafilassi;
- Tipo II – Reazione citotossica mediata da anticorpi;
- Tipo III – Reazione mediata da immunocomplessi;
- Tipo IV – Reazione ritardata mediata da cellule.

Il *Tipo-I*, detta anche Reazione di Ipersensibilità Immediata perché insorge rapidamente, è una reazione mediata dalle IgE e dai mastociti o basofili. Le IgE sono prodotte dalle plasmacellule che derivano da un linfocita B sensibilizzato verso un certo antigene, ad esempio il polline, che viene chiamato per questo allergene. Sensibilizzato vuol dire attivato in precedenza e la

reazione allergica si esplica quando l'individuo viene nuovamente in contatto con l'allergene. Al suo primo incontro con l'antigene, che avviene a livello delle mucose, le cellule del sistema immunitario, i linfociti B, producono degli anticorpi, in questo caso specifici, ovvero le IgE. Esse diffondono localmente fino alle mast-cellule e si fissano al recettore grazie all'Fc presente sulla superficie cellulare. Ad una seconda esposizione si avrà la formazione del complesso antigene-anticorpo direttamente sulla superficie delle mast-cellule. Questo legame dà origine ad una perturbazione molecolare che genera in ultimo il rilascio di sostanze vasoattive immagazzinate nei granuli dei mastociti. La più importante tra queste sostanze è l'istamina. Il rilascio è istantaneo, accompagnato da aumento della permeabilità, edema e richiamo di cellule infiammatorie, soprattutto eosinofili. Sembra probabile che la penetrazione attraverso le mucose di piccole dosi di allergene con basso peso molecolare, elevata solubilità e stabilità (particelle essiccate), sia particolarmente efficiente nell'indurre la produzione di IgE e l'attivazione delle cellule CD4⁺, in particolar modo del sottotipo TH-2. Le cellule T-helper si dividono in due sottotipi: TH-1 e TH-2. Il sottotipo TH-1 (i linfociti che fanno parte di questo gruppo sono chiamati anche T-helper infiammatori) ha la funzione di potenziare le difese mediate da fagociti nei confronti di infezioni, in particolare contro agenti patogeni come virus e batteri; la risposta che ne scaturisce è quindi orientata in senso citotossico. Il sottotipo TH-2 ha invece la funzione di favorire le risposte mediate da IgE e di eosinofili e mastociti; mediando dunque una risposta di tipo anticorpale (tipica delle malattie allergiche) ed i linfociti che fanno parte di questo sottotipo vengono detti per questo T-helper Immunitari. I due sottotipi agiscono in modo diverso in quanto producono interleuchine diverse che conferiscono loro capacità di agire su cellule diverse del sistema immunitario e quindi di modulare processi diversi. Per esempio, il sottotipo TH-2 produce IL-4 ed IL-5 che stimolano la produzione di anticorpi, mentre il sottotipo TH-1, sintetizza e secerne IL-2 e IFN- γ che facilitano la produzione di opsonine e

l'attivazione macrofagica. È da notare che in individui non predisposti alle risposte allergiche l'incontro con l'antigene genera una risposta primaria caratterizzata dalla produzione e rilascio di IgM, e come risposta secondaria una produzione di IgG. Lo scambio di classe verso le IgE, regolato dalla produzione di particolari citochine e dalla attivazione di TH-2 può spiegare, però solo in parte, la reazione di ipersensibilità. La più frequente via di penetrazione degli allergeni è quella inalatoria attraverso la mucosa delle cavità nasali; a quel livello possono insorgere rinite e rinorrea dovute all'attivazione dei mastociti e delle cellule granulose basofile della sottomucosa. Tutti i sintomi possono essere attribuiti al rilascio di istamina e possono essere alleviati con antistaminici o con farmaci che stabilizzano le mast-cellule, prevenendone la degranolazione. Un'ulteriore rimedio è rappresentato da un trattamento di desensibilizzazione, basato su iniezioni dell'antigene che stimola la produzione di IgG; quest'ultime, legandosi all'antigene, lo rendono indisponibile per successive interazioni con le IgE, limitando la risposta allergica. Le reazioni di ipersensibilità di Tipo I possono produrre anche una risposta ritardata mediata da derivati dell'acido arachidonico, i leucotrieni. Questi ultimi, ma non solo loro, possono provocare una più grave reazione: è il caso dell'asma allergica causata da ipersensibilità ad antigeni inalati e mediata da SRS-As (slow-reacting substances of anaphylaxis), con broncocostrizione ed aumento della produzione di muco e di liquido, con conseguente difficoltà nella respirazione per permanenza dell'aria nei polmoni. Le reazioni di fase tardiva sono curate generalmente con i corticosteroidi. Se l'allergene è ingerito si possono avere due tipi di risposta allergica. L'attivazione delle cellule basofile della mucosa dell'apparato gastrointestinale può provocare perdita di liquido attraverso l'epitelio, contrazione della muscolatura liscia con conseguente vomito e diarrea. Se invece vengono attivate le cellule basofile del connettivo degli strati più profondi della cute, si ha orticaria, con edemi rosseggianti di grandi dimensioni. L'esposizione all'allergene per diretto contatto con la cute può provocare dermatite atopica; se invece l'allergene è somministrato per via

sistemica possono essere attivate le cellule del tessuto connettivo associate con tutti i vasi ematici, provocando una sindrome molto pericolosa detta anafilassi sistemica. Si ha vasodilatazione generalizzata con essudato che porta ad un drammatico calo della pressione sanguigna, costrizione delle vie aeree ed edema dell'epiglottide (shock anafilattico). Lo shock si può avere a seguito della puntura di un'ape in persone sensibilizzate, o di iniezione di anestetico o di mezzo di contrasto radiografico. Il trattamento prevede la somministrazione di adrenalina che porta alla contrazione delle arteriole precapillari e stimola l'azione del cuore, ripristinando la pressione sanguigna. Un esempio di reazione allergica provocata da farmaci è dato dalla penicillina. Essa funziona come aptene, reagisce con i gruppi amminici delle proteine alterandole in grado sufficiente da indurre reazione immunitaria. Un modo semplice per vedere se una persona è allergica alla penicillina è la sua somministrazione locale in piccole quantità; in un allergico ciò provoca un ponfo ed eritema circostante. Le reazioni allergiche sono curate con farmaci antistaminici che però influenzano solo la reazione della fase iniziale. La reazione di fase tardiva, dominata da infiltrato di cellule richiamate da mediatori chimici e citochine liberate dalle cellule granulose basofile (6-12 ore dopo), è inibita dai corticosteroidi. Le alterazioni che si verificano nelle reazioni allergiche mediate da IgE, sono transitorie e si risolvono quando l'allergene è rimosso, tuttavia se queste risposte si ripetono più volte, ne può risultare un'inflammatione cronica. Nell'asma si genera una alterazione che rende sensibili le vie aeree anche a stimoli aspecifici quali le variazioni di temperatura o contaminanti atmosferici.

Il *Tipo-II*, che può rappresentare anche un esempio di malattia autoimmune, è mediato da anticorpi che reagiscono con un antigene fissato sulle cellule o su altri componenti tissutali, tipo la membrana basale. L'antigene può essere estrinseco o intrinseco. Un antigene intrinseco include macromolecole, come proteine, DNA, RNA; gli antigeni estrinseci includono farmaci (chinidina, penicillina, cefalosporine, diazepam, sulfonamidi, ecc.), prodotti batterici o sostanze chimiche semplici come apteni. Queste sostanze si

legano a proteine plasmatiche solubili o legate a cellule, per esempio sui globuli rossi. La reazione di ipersensibilità si ha ad una successiva esposizione all'antigene. Questa risposta è mediata da IgG ed IgM che formano complessi con gli antigeni legati alle membrane cellulari o alla membrana basale. Tali complessi sono capaci di attivare il complemento con conseguente distruzione del globulo rosso o possono dare origine ad un principio di reazione infiammatoria acuta, che a sua volta può sfociare in grave danno tissutale. L'anticorpo può riconoscere e legarsi anche ad alcuni recettori cellulari, stimolando od inibendo la funzione cellulare stessa. Esempi di reazione di ipersensibilità di tipo II sono l'anemia emolitica, la sindrome di Goodpasture, la malattia di Graves e la miastenia grave. L'anemia emolitica è il prototipo della reazione citotossica mediata da anticorpi e si può avere in varie forme. Un esempio è la reazione emolitica acuta post-trasfusionale, nel caso di trasfusione di sangue non compatibile dove gli antigeni sono i marcatori del sistema AB0. Altro esempio sono le malattie autoimmuni come il lupus erythematosus systemicus (LES), dove strutture cellulari vengono riconosciute come estranee; in alcune circostanze, sostanze chimiche, come certi farmaci si legano alla superficie dei globuli rossi facendo da apteni per cui gli anticorpi agiscono contro questi apteni causando emolisi. Nella sindrome di Goodpasture si sviluppa autoimmunità verso i componenti del collagene di tipo IV: un epitopo che è normalmente nascosto, viene esposto inappropriatamente a livello dei glomeruli renali o dei vasi polmonari causando un attacco alla membrana basale da parte degli autoanticorpi. Nella malattia di Graves o tireotossicosi si formano autoanticorpi contro il recettore per l'ormone che stimola la tiroide (TSH) che è presente sulla superficie delle cellule follicolari. Si ha così una stimolazione continua del recettore con conseguente iperproduzione di ormone tiroideo; è una della cause di ipertiroidismo. Nella Miastenia grave la malattia autoimmune è mediata da anticorpi contro il recettore per l'acetilcolina, presente sulla superficie delle cellule muscolari striate. L'acetilcolina è un neurotrasmettitore rilasciato dalle terminazioni nervose a livello della placca neuromuscolare che

media la trasmissione del segnale per la contrazione muscolare; il suo blocco tramite l'anticorpo inibisce il legame con il neurotrasmettitore causando la progressiva inattività muscolare fino alla paralisi.

Il *Tipo-III* è mediato da complessi antigene-anticorpo, i quali possono formare depositi di aggregati, detti Immunocomplessi, provocando alterazioni. Gli immunocomplessi si formano in tutte le risposte anticorpali e la loro potenziale patogenicità è determinata in parte dalle loro dimensioni. Gli aggregati più grandi fissano il complemento (C3b) in soluzione e sono rimossi dai fagociti degli organi emocateretici quali la milza, il fegato ed il polmone, o vi vengono trasportati dai globuli rossi, alla cui parete rimangono "appiccicati". I complessi di piccole dimensioni rimangono in soluzione, mentre quelli di medie dimensioni tendono a depositarsi sulle pareti dei vasi nel tentativo di filtrare verso il tessuto insieme alle proteine plasmatiche. Nelle reazioni sistemiche contro antigeni solubili gli immunocomplessi rimangono circolanti, mentre nelle reazioni localizzate, gli immunocomplessi si formano nei tessuti. Se l'antigene è iniettato nella cute, gli anticorpi (generalmente IgG) diffusi localmente, si legano ad esso formando immunocomplessi che provocano danno ai tessuti. Tramite l'attivazione del complemento innescano infatti una reazione infiammatoria locale con aumento di permeabilità vascolare, edema, essudato granulocitario (Reazione di ARTHUS). Se invece vengono inoculate grandi quantità di antigene per via sistemica, per esempio con il siero antitetanico o il siero antivipera, si instaura la malattia da siero, i cui sintomi sono febbre, dolori delle articolazioni e proteinuria. La malattia da siero è il prototipo delle reazioni di ipersensibilità di terzo tipo. Dopo pochi giorni dalla inoculazione delle proteine del siero eterologo, appaiono in circolo anticorpi specifici che si complessano con la proteina eterologa; inizialmente questi complessi sono piccoli, sparsi, molto solubili e difficilmente fagocitabili. Essi rimangono quindi in circolo e vengono filtrati attraverso la membrana basale dei glomeruli o di altri tessuti dove il sangue viene ultrafiltrato per produrre i fluidi corporei come la camera anteriore dell'occhio, il plesso coroideo del

cervello, la superficie delle sierose che ricoprono la cavità pleurica, del pericardio e del peritoneo. Gli immunocomplessi intrappolati in queste membrane semipermeabili attivano il complemento, da cui si formano frammenti chemiotattici per i granulociti causando infiammazione acuta. Nella malattia da siero tale reazione è di breve durata, mentre in alcune malattie autoimmunitarie, come l'artrite reumatoide o il LES, per la persistenza dell'antigene il deposito di immunocomplessi è costante e induce un grave stato di malattia cronica.

Il *Tipo-IV* è conosciuto come ipersensibilità mediata da cellule o di tipo ritardato, poiché impiega 24-48 ore per raggiungere l'effetto massimo. Essa coinvolge i linfociti T ed in particolar modo i TH-1 ed i macrofagi che si aggregano nel luogo del danno a formare il granuloma. I macrofagi o le cellule ad essi equivalenti (APC come le cellule di Langerhans dell'epidermide), fagocitano l'antigene, lo processano e lo presentano ai linfociti T-Helper, attivandoli, anche mediante citochine. Questo innesca il meccanismo che come sappiamo, porta da un lato alla formazione di un clone di cellule tutte specifiche per quell'antigene, di cui parte si differenzierà in cellule della memoria immunitaria; e dall'altra alla produzione di cellule effettrici vere e proprie. Le cellule effettrici saranno a loro volta responsabili dell'attivazione di altre cellule quali i macrofagi ed i linfociti citotossici e soppressori, che presentano sulle molecole MHC l'epitopo riconosciuto dal linfocita TH in questione. Sotto l'influenza delle citochine, tra cui l'interleuchina 2 (IL-2) e l'interferone gamma (IFN- γ), i macrofagi prendono contatti gli uni con gli altri attraverso i prolungamenti del citoplasma trasformandosi in cellule epitelioidi (perché assomigliano alle cellule dell'epidermide) e producono molti mediatori dell'infiammazione promuovendo la formazione del granuloma. IFN- γ è considerato la più importante citochina responsabile della formazione del granuloma, agisce sulle cellule epitelioidi aumentando le loro capacità; esso

inoltre promuove la fusione dei macrofagi a dare cellule giganti (cellule di Langhans, **Figura 12**).

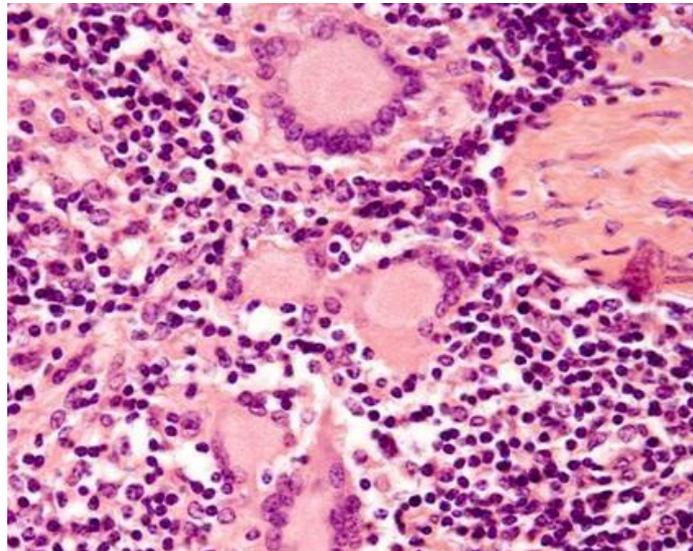


Figura 12. Cellule giganti di tipo Langhans in granuloma tubercolare
(Fonte: www.regione.vda.it)

La reazione di ipersensibilità di TIPO IV si ha in risposta ad antigeni quali il *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium leprae* e vari funghi, o in seguito a malattie ad eziologia sconosciuta come la sarcoidosi. La dermatite da contatto, una tra le forme cliniche più frequenti di ipersensibilità di tipo IV, non presenta formazione di granulomi. In questa malattia, che può essere causata da vari allergeni (guanti di gomma, anelli, veleno dell'edera), la cute presenta infiltrati linfocitari e macrofagici perivascolari, con alterata permeabilità vascolare e formazione di edema (Chevanne, 2004).

4.4.2. Malattie autoimmuni

La risposta immunitaria si basa sulla capacità delle cellule del sistema immunitario di discernere tra il self ed il non-self. L'organismo è tollerante nei confronti degli antigeni espressi sulle proprie cellule grazie ai numerosi meccanismi di controllo che si sono sviluppati per eliminare la risposta immunitaria contro gli antigeni-self. La rottura di questa tolleranza porta alle

malattie autoimmuni. Si ritiene che l'autoimmunità sia generata da una risposta in cui intervengono le cellule T citotossiche, tuttavia non si sa di preciso quali eventi diano inizio alla risposta immunitaria contro il self; quello che è certo è che è stato confermato uno stretto legame tra insorgenza di autoimmunità ed infezione oppure dieta o stato ormonale. Spesso vi è però anche la connessione con un certo tipo di MHC, generalmente di classe II ma anche di classe I, ma soprattutto una significativa componente genetica. Nel Diabete Mellito Insulino Dipendente per esempio, si ha stretta associazione con i gruppi allelici HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DQ β . Ci sono varie teorie sullo sviluppo dell'autoimmunità, tra queste ne ricordiamo tre:

1. Teoria della delezione clonale. L'autoimmunità si sviluppa se cloni di linfociti T o B non sono stati eliminati durante il periodo fetale o neonatale.

2. Teoria dell'antigene esogeno. L'autoimmunità si sviluppa in quanto un anticorpo prodotto reagisce contro una sostanza simile ad un antigene esogeno, ma costitutivo dell'organismo.

3. Teoria degli antigeni nascosti. È possibile che alcuni antigeni normalmente non antigenici perché nascosti al sistema immunitario, diventino immunogenici o perché improvvisamente esposti, o perché legati ad apteni estranei.

La diagnosi di malattia autoimmunitaria viene fatta quando è documentata la presenza di autoanticorpi in grado di provocare una lesione patologica ed è presente una diretta o indiretta evidenza che tale disturbo sia di natura immunitaria. Le malattie autoimmuni si possono presentare in due forme: una forma sistemica, come nel Lupus erythematosus systemicus o nell'artrite reumatoide, ed una forma limitata ad un singolo organo, per esempio la tiroidite di Hashimoto. Il LES è il prototipo di una malattia autoimmune multi sistemica, ha una frequenza di insorgenza di 1:2500 ed è più comune nelle donne che negli uomini. Si presenta ad ogni età con una predominanza familiare e vi è il 30% di concordanza tra gemelli, dimostrando l'importanza anche di fattori non genetici. La causa, come detto, è ignota, tuttavia si è

ipotizzato che lo stimolo alla produzione di anticorpi sia rappresentato da farmaci o sostanze chimiche sensibilizzanti o da infezioni virali e che la produzione di anticorpi sia solo una risposta secondaria che a lungo andare diventa dannosa. Il LES è una malattia cronica infiammatoria, che interessa quasi tutti gli organi, ma in maniera caratteristica colpisce i reni, le articolazioni, le membrane sierose, la cute; si formano autoanticorpi contro una serie di autoantigeni, quali proteine plasmatiche (componenti del complemento, fattori della coagulazione), antigeni presenti sulla superficie cellulare di linfociti, neutrofilo, piastrine, globuli rossi e componenti intracellulari (microfilamenti, microtubuli, lisosomi, ribosomi, RNA, DNA). Sono, dunque, interessati molti organi e le modalità di manifestarsi della malattia sono svariate: la cute è uno dei tessuti più interessati con eruzioni cutanee e reazioni di fotosensibilità, ma anche il tessuto connettivo con vasculiti linfocitarie, lesioni alle mucose con erosioni superficiali ed ulcere. Si hanno inoltre manifestazioni neurologiche e psichiatriche nonché interessamento renale che può portare anche a grave insufficienza. I sintomi muscolo-scheletrici, inoltre, possono essere i segni più precoci della malattia: dolori articolari, artriti, mialgie (Chevanne, 2004; Abbas et al.; 2010; Abbas et al., 2012).

4.5. Antigeni lipidici

Fino a pochi anni fa si è ritenuto che le proteine fossero l'unica classe di molecole in grado di fungere da antigene e quindi di stimolare la risposta immunitaria da parte del nostro organismo, ma recentemente la comunità scientifica ha rivolto l'attenzione verso i lipidi poiché è stato constatato un loro coinvolgimento nei meccanismi alla base delle reazioni immunologiche. Studi recenti hanno dimostrato che il riconoscimento di antigeni lipidici endogeni ed esogeni da parte del sistema immunitario è importante per la difesa contro le infezioni ed altri disturbi e che le risposte specifiche nei confronti dei lipidi si verificano con frequenze più elevate di quanto si potesse precedentemente sospettare. Grazie agli ultimi sviluppi e le recenti conoscenze acquisite in

questo campo è stato possibile ottenere una migliore valutazione sulla stimolazione delle cellule T determinata da antigeni lipidici e riguardo le classi molecolari e cellulari implicate. Questi risultati hanno sollevato nuove questioni circa i meccanismi di presentazione dei lipidi, l'adescamento e l'espansione clonale di linfociti T specifici per i lipidi, e il loro coinvolgimento nella successiva differenziazione in cellule di memoria. È evidente che, nonostante gli enormi passi in avanti fatti negli ultimissimi anni, non sono noti tutti gli automatismi attraverso i quali i lipidi, e soprattutto i glicolipidi, esplicano la loro proprietà immunomodulante. È chiaro che tale argomento attualmente rappresenta un target scientifico molto importante soprattutto perché ampliare le conoscenze a riguardo dovrebbe agevolare lo sviluppo di vaccini e adiuvanti a base glicolipidica che rappresenterebbero un'innovazione in campo farmacologico e medico (De Libero e Mori, 2005).

4.6. Sistema immunitario vs Antigeni glicolipidici

I sistemi di difesa del nostro organismo sinora descritti, sono deputati al riconoscimento ed alla cattura di antigeni prevalentemente di natura peptidica e non riconoscono come potenziale “minaccia” gli antigeni glicolipidici. In realtà, i glicolipidi sono comuni attivatori del sistema immunitario attraverso un meccanismo d'azione che coinvolge strutture molecolari e cellulari differenti rispetto a quanto visto in precedenza. Tuttavia, come detto, attualmente tale meccanismo non risulta completamente conosciuto, soprattutto perché è da pochissimi anni che la comunità scientifica sta approfondendo le ricerche a riguardo.

4.6.1. I linfociti T-Natural Killer (NKT)

Le cellule T natural killer (**Figura 13**) rappresentano l'unica sottopopolazione di linfociti T in grado di modulare potentemente le risposte immunitarie adattative ed ugualmente capaci di intervenire in meccanismi alla base della risposta innata; infatti sono tra le prime cellule ad attivarsi durante le

infezioni microbiche e responsabili della produzione di un'ampia varietà di citochine che hanno molteplici effetti sui altre cellule immunitarie. Le cellule NKT sono dotate, come tutti gli altri linfociti, del recettore TCR, costituito da una catena α che rappresenta la porzione invariante, mentre le catene β mostrano variabilità più limitata di quelle dei linfociti T classici. Tali recettori sono specifici per una molecola, la proteina CD1d, che presenta esclusivamente antigeni lipidici e glicolipidici attraverso un meccanismo APC non classico. Infatti una delle peculiarità delle cellule NKT è la capacità di individuare antigeni provenienti da fonti diverse; ovvero mentre i linfociti T sono attivati dal classico complesso MHC-antigene, specifico per il riconoscimento dei composti non-self, le cellule NKT sono capaci di discernere sia molecole self che molecole estranee. In questo modo, le cellule NKT sono attivate anche quando non vi è una minaccia esterna, e questa proprietà può essere alla base di molti loro effetti immunomodulanti e anche del loro rapido innesco durante le infezioni (Brigl e Brenner, 2004; Bendelac et al., 2007; Godfrey e Kronenberg, 2004; Van Kaer e Joyce, 2005; Kronenberg e Rudensky, 2005). Sinora sono stati identificati due diversi sottotipi di NKT: le cellule di tipo I sono tipicamente caratterizzate dall'espressione di un TCR semi-invariante, mentre i TCR espressi da cellule NKT di tipo II risultano maggiormente diversificati (Rossjohn et al., 2013). Sulla base della limitata variabilità strutturale del loro recettore, è stato proposto che le cellule NKT riconoscano una serie di antigeni specifici; in particolare è stato dimostrato che esse condividono il riconoscimento di una classe di lipidi microbici in cui uno zucchero galattosio è legato attraverso un legame glicosidico α ad un sfingolipide (α -Gal-Cer) o ad un diacilglicerolo (Kawano et al., 1997; Kinjo et al., 2005; Kinjo et al., 2006). La capacità di individuare questo tipo di glicolipidi sembra essere conferita da una sequenza di riconoscimento dell'antigene evolutivamente conservata nei recettori TCR delle cellule NKT (Kjer-Nielsen et al., 2006; Scott-Browne et al., 2007; Wun et al., 2008). Rimane poco chiaro se la parte del TCR che varia da

NKT a NKT conferisca ulteriori singole proprietà di riconoscimento di antigeni; tuttavia, a conferma di questa ipotesi, una serie di lavori hanno documentato risposte antigene-specifiche che sono limitate a particolari sottogruppi della popolazione di cellule NKT (Wu et al., 2003; Amprey et al., 2004; Fischer et al., 2004).

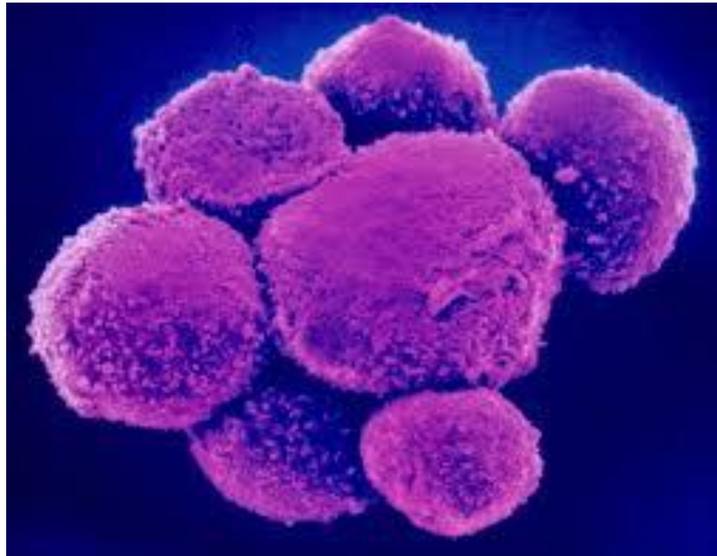


Figura 13. Cellule T Natural Killer
(Fonte: www.liquidarea.com)

4.6.2. Le cellule dendritiche (DC)

Le cellule più efficienti che presentano l'antigene sono le cellule dendritiche (DC) mature immunologicamente competenti. Le DC (**figura 14**) sono in grado di evolvere da immature (antigen capturing cells) a cellule mature (antigen presenting cells), convertendo antigeni in immunogeni ed esprimendo molecole come le citochine, chemochine, molecole co-stimolatorie e proteasi per l'inizio della risposta immunitaria. Tuttavia i tipi di cellule T che mediano la risposta possono variare a seconda della tipologia di DC coinvolta e della fase di maturazione, in aggiunta ai segnali di attivazione ricevuti dal microambiente circostante. La capacità delle DC di regolare l'immunità dipende proprio dalla loro maturazione, che a sua volta è governata da una varietà di fattori in grado di indurla in seguito al riconoscimento e al processamento

dell'antigene al suo interno. Tra questi fattori ci sono: batteri interi o antigeni derivanti dai batteri (es. LPS), citochine infiammatorie, ligandi selettivi per recettori della superficie cellulare (es. CD40) e prodotti virali (es. RNA a doppio filamento).



Figura 14. Cellula dendritica
(Fonte: animatedhealthcare.com)

Durante la loro conversione da immature a cellule mature, le DC subiscono un numero di cambiamenti fenotipici e funzionali. Il processo di maturazione delle DC, in generale, comporta una redistribuzione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità dai compartimenti intracellulari alla superficie cellulare, down-regolazione di internalizzazione dell'antigene, un aumento dell'espressione di molecole co-stimolatorie sulla superficie, secrezione di chemochine, citochine e proteasi ed anche. cambiamenti morfologici con riorganizzazione del citoscheletro (Lanzavecchia e Sallusto, 2000; Moser e Murphy, 2000; Quaratino et al., 2000; Risoan et al., 1999; Kalinsky et al., 1999; Kapsenberg et al., 1999; Vieira et al., 2000). Tali cambiamenti portano alla formazione di dendriti (da qui il nome DC), ovvero piccole estensioni ramificate che conferiscono alle cellule dendritiche un aspetto molto simile a quello dei neuroni; le cellule di Langerhans, ad esempio,

pur rappresentando solo l'1% delle cellule totali presenti nell'epitelio, grazie ai dendriti coprono circa il 25% della superficie cutanea. Le cellule di Langerhans insieme alle DC interstiziali (presenti in altri tessuti tranne l'epitelio) rappresentano la più vasta sottopopolazione di DC; ovvero le cellule dendritiche mieloidi. Quest'ultime, derivanti da cellule midollari, hanno la capacità unica di migrare negli organi linfoidi secondari dopo aver incontrato l'antigene per esporlo sulla superficie ed attivare i linfociti T. Altri sottogruppi importanti sono le DC plasmacitoidi e le DC follicolari. Le prime, poco numerose e presenti nella zona T della milza e nei linfonodi, assomigliano alle plasmacellule e secernono grandi quantità di interferone di tipo I. Le cellule dendritiche follicolari si trovano solamente nei follicoli linfoidi, non sono di origine midollare e non esprimono molecole MHC di classe II; sono dotate invece di diversi recettori per il complemento e per le Fc delle immunoglobuline (Abbas et al., 2012). Le cellule dendritiche sono le uniche cellule APC in grado di effettuare la Cross presentation (**Figura 15**), ovvero sono in grado di endocitare antigeni peptidici extracellulari, processarli e presentarli ai linfociti T CD8⁺ tramite MHC di classe I (Bevan, 2006). La Cross-presentation è di particolare importanza, in quanto consente la presentazione di antigeni esogeni, che vengono presentati generalmente da MHC II di cellule dendritiche infettate, tramite MHC I. In pratica la cellula dendritica sfrutta una via di presentazione dell'antigene, che è richiesta in caso di infezione della cellula dendritica stessa, anche quando quest'ultima non presenta alcuna compromissione funzionale provocata da una qualsiasi infezione (Health e Carbone, 2001).

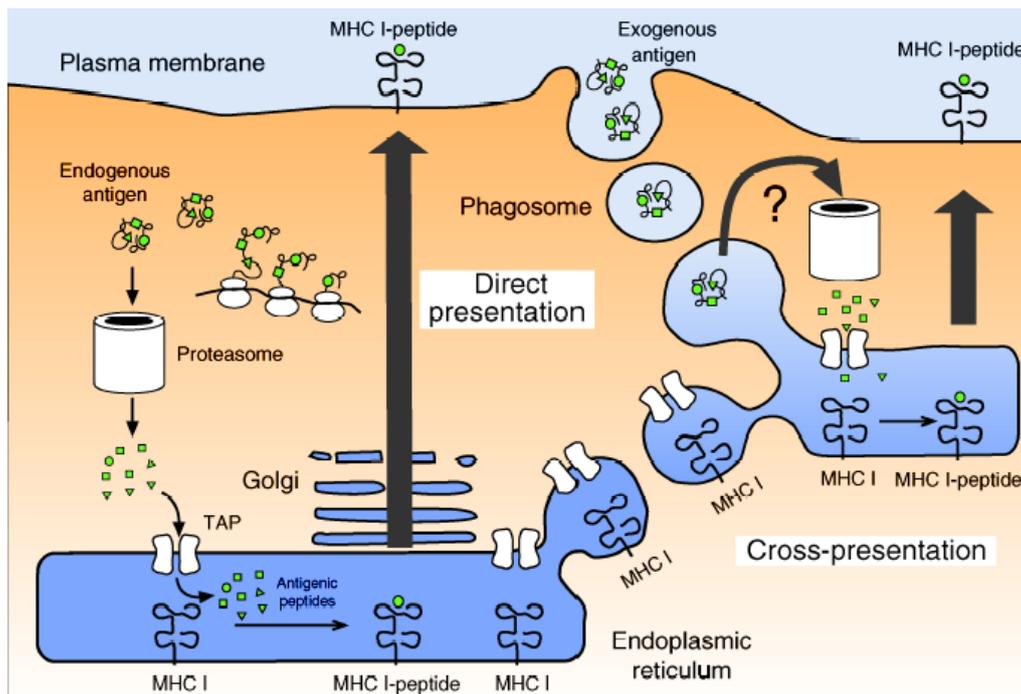


Figura 15. Cross presentation in cellula dendritica e differenze rispetto alla modalità di presentazione “classica”

4.6.3. Le proteine CD1

La famiglia delle CD1 (cluster of differentiation 1) umane è formata da 5 proteine glicosilate: CD1a, CD1b e CD1c, che fanno parte di un primo gruppo; CD1d che rappresenta da sola un secondo gruppo (**Figura 16**); ed infine CD1e, la quale può essere classificata in un ulteriore e ultimo gruppo. Tale classificazione è basata sulla similarità delle loro sequenze e le differenze tra le diverse classi di CD1 sembrano essere correlate con una specificità di legame nei confronti delle diverse strutture lipidiche. In ogni caso le CD1 hanno tutte un polimorfismo limitato; tra tutte le CD1d si distinguono dalle altre 4 in quanto espongono l'antigene lipidico a particolari linfociti T, ovvero ai Natural Killer (Porcelli, 1995; Calabi et al., 1989; Godfrey et al., 2004; Kronenberg, 2005). Possono essere paragonate alle proteine dell'MHC di classe I per le funzioni che assolvono ma anche in virtù delle similitudini strutturali però le CD1d sono solite raggrupparsi in oligomeri, generalmente tetrameri. I

tetrameri CD1d sono costrutti proteici composti da quattro molecole CD1d uniti insieme e di solito fluorescenti, utilizzati anche per identificare le cellule NKT o altre cellule CD1d-reattive; in particolare le cellule NKT di tipo I e alcune di tipo II. Anche se il tetramero è il più utilizzato tra gli oligomeri CD1d, a volte al suo posto sono adoperati dimeri e pentameri (Blumberg et al., 1991).

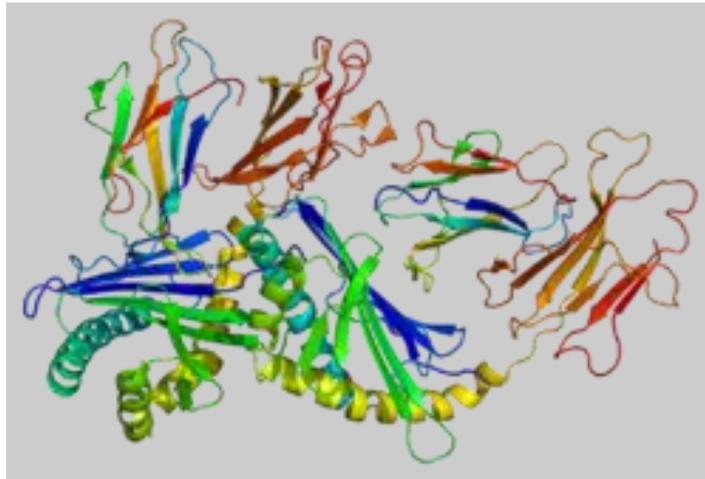


Figura 16. Struttura della proteina CD1d
(Fonte: en.wikipedia.org)

Anche per questa classe proteica non è ancora completamente chiaro il meccanismo di interazione con i ligandi lipidici e glicolipidici ma è stato possibile ottenere importanti informazioni sulle CD1d, anche dal punto di vista strutturale, proprio grazie alla loro capacità di legarsi in maniera specifica a determinati composti. Tra questi si sono rivelati di grande aiuto le α -glucuronil- e α -galatturonil-ceramidi, una famiglia di composti di origine microbica che possono essere trovati, per esempio, sulla parete cellulare di *Sphingomonas*, un onnipresente batterio Gram-negativo. Il derivato β -D-glucopiranosilceramide viene accumulato in cellule presentanti l'antigene dopo l'infezione, ed è responsabile dell'attivazione di cellule NKT invariante (iNKT), uno speciale sottotipo di NKT (Bendelac et al., 2007). Anche un glicosfingolipide come l'iGb3 (isoglobotrihexosylceramide) si è rivelato un antigene self in grado di legarsi alle CD1d dimostrandosi un potente attivatore proprio degli iNKT

(Sanderson et al., 2013). Un altro ligando specifico per le CD1d è l' α -galattosilceramide (α -GalCer), un composto isolato dalla spugna marina *Agelas mauritanius*, che seppur non possenga un ruolo fisiologico ben definito si è dimostrato determinante per approfondire le conoscenze riguardo questa classe proteica; è infatti tuttora il più utilizzato tra tutti i ligandi per molti esperimenti e studi di comparazione, come ad esempio sulla bioattività di nuovi derivati glicolipidici, ma anche per la valutazione di possibili effetti farmacologici scaturiti dall'esposizione del complesso α -GalCer-CD1d sulla superficie esterna delle cellule dendritiche. Questo glicolipide, così come tutti i suoi analoghi strutturali sia naturali che sintetici, forma il complesso con le CD1d ed attiva potentemente la risposta immunitaria mediata dalle cellule T natural killer che esprimono il TCR semi-invariante V α 14-J α 18 presente nei topi e il V α 24-J α 18, che è il recettore equivalente nell'uomo (Brossay et al., 1998). Un qualsiasi antigene lipidico può ritrovarsi nel citoplasma di una cellula APC, come ad esempio nella cellula dendritica, in seguito all'attraversamento della membrana plasmatica oppure perché trasportato nel suo interno da vescicole endocitiche o ancora perché frutto di un'azione digestiva del fagosoma nei confronti di un microrganismo inglobato. In qualunque caso l'antigene lipidico verrà catturato e trasportato nel lisosoma dove verrà complessato ad una proteina CD1 con la quale migrerà fino alla superficie esterna della cellula. Se la proteina CD1 appartiene al primo gruppo (CD1a, CD1b e CD1c) il complesso determinerà l'attivazione dei linfociti T, ma in maniera aspecifica, al contrario i complessi antigene lipidico-proteina CD1d (secondo gruppo) sono responsabili di una risposta mediata esclusivamente dalle cellule NKT, ed in particolare attiveranno le cellule dotate dei recettori TCR V α 24-J α 18 (nel caso di organismi umani), ovvero le iNKT (Barral e Brenner, 2007). Com'è facile intuire tali meccanismi sono molto complessi e gli studi effettuati fino ad oggi non sono stati in grado di spiegare completamente tutto a riguardo, per cui le interazioni tra glicolipidi e sistema immunitario hanno assunto un grande

fascino nell'ambito scientifico, anche in virtù delle possibili applicazioni in campo farmacologico e terapeutico.

4.6.4. I recettori Toll-like

Affinché inducano la genesi della risposta immunitaria da parte dei linfociti T, i lipidi possono seguire un'ulteriore strada che prevede l'attivazione dei recettori Toll-like (TLRs). Questi ultimi sono recettori espressi in molte cellule, sia appartenenti al sistema immunitario sia largamente presenti in altri tessuti, capaci di riconoscere diversi modelli molecolari e di legarsi ad essi. Le risposte sono tra le più svariate: ad esempio, quando questi recettori sono associati ad agenti patogeni inducono l'insorgenza di risposte immunitarie nei confronti di tali organismi microbici partecipando attivamente ai meccanismi difensivi tipici dell'immunità innata; oppure legati a molecole endogene giocano un importante ruolo nella genesi di malattie antinfiammatorie e autoimmuni (Akira et al., 2003; Kawai, 2010). Esistono diversi tipi di recettori Toll-like riscontrabili sia nell'uomo che nei topi di cui la maggior parte (TLRs 1-9) è diffusa in entrambe le specie, TLR10 solo nell'uomo mentre TLR11, TLR12, TLR13, al contrario, sono stati rinvenuti esclusivamente nei topi (Takeuchi et al., 1999). I TLRs deputati al riconoscimento ed al legame con i lipidi sono TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6; in particolare il TLR4 fu il primo ad essere descritto ed i successivi studi evidenziarono come tale recettore risultasse essenziale per il riconoscimento dei lipopolisaccaridi (Lemaitre et al., 1996; Medzhitov et al., 1997). In quest'ultimi, così come in tutti gli altri recettori Toll-like, sono state ritrovate sequenze ricche di leucine che sembrerebbero coinvolte nel riconoscimento e nel legame col substrato, tuttavia il meccanismo col quale i lipidi e i glicolipidi attivano il sistema immunitario attraverso TLRs non è ancora completamente conosciuto (Jin et al., 2007).

4.7. Vaccini ed adiuvanti

Per vaccinazione si intende il trattamento di un soggetto con microrganismi, uccisi o attenuati o con qualche loro costituente, in modo da stimolare i meccanismi di difesa dell'organismo, ovvero di stimolare una risposta immunitaria. Questo farà sì che in caso di infezione vera e propria, l'organismo sarà in grado di reagire in modo pronto e specifico contro l'agente patogeno (Abbas et al., 2012). Quindi l'obiettivo della vaccinazione è l'induzione di immunità protettiva e in alcuni vaccini questa può essere migliorata mediante aggiunta di altri composti, perciò detti adiuvanti o coadiuvanti. Gli adiuvanti sono stati descritti come sostanze utilizzate in combinazione con un antigene specifico capaci di generare una risposta immunitaria più robusta di quella prodotta dal solo antigene (Ramon, 1924). In realtà, gli antigeni derivati da processi di laboratorio, ad esempio attraverso tecniche ricombinanti (es. proteine, DNA, RNA) sono molto più sicuri rispetto agli antigeni tradizionali ma allo stesso tempo hanno una minor capacità immunizzante; per l'utilizzo di questi nuovi antigeni, che costituiscono la gran parte dei nuovi vaccini è dunque fondamentale utilizzare un adiuvante (Petrovsky e Aquilar, 2004). Diverse classi di composti sono state valutate come adiuvanti tra cui sali minerali, prodotti antimicrobici, emulsioni, saponine, citochine, polimeri, microparticelle e liposomi (Guy, 2007) ma nonostante l'ampio uso di coadiuvanti in miliardi di dosi di vaccini umani e animali, i meccanismi d'azione con cui si potenziano le risposte immunitarie non sono ancora stati ben definiti. Tuttavia, i recenti progressi nell'ambito della ricerca immunobiologica hanno permesso di migliorare le conoscenze ed i dati disponibili suggeriscono che i coadiuvanti impiegano uno o più dei seguenti meccanismi per suscitare risposte immunitarie:

- 1) rilascio sostenuto di antigene al sito di iniezione (effetto deposito);
- 2) up-regulation delle citochine e chemochine;
- 3) reclutamento cellulare al sito di iniezione;
- 4) aumento dell'assorbimento dell'antigene e presentazione alle cellule APC;

- 5) attivazione e maturazione delle APC (aumento dell'espressione di MHC di classe II e di molecole co-stimolatorie) e migrazione ai linfonodi drenanti;
- 6) attivazione di inflammasomi, ovvero complessi macromolecolari responsabili del rilascio di interleuchine (Cox e Coulter, 1997; Hoebe et al., 2004; Fraser et al., 2007).

La formazione di un deposito nel sito di iniezione è forse il più antico e più ampiamente conosciuto meccanismo di azione dei coadiuvanti. La cattura dell'antigene ed il suo rilascio lento al sito di iniezione garantiscono una costante stimolazione del sistema immunitario per la produzione di alte concentrazioni di anticorpi (Siskind e Benacerraf, 1969). Fino a poco tempo fa l'effetto deposito era considerato un classico meccanismo d'azione di molti adiuvanti; è da moltissimi anni infatti che l'allume (solfato di potassio alluminio idrato) viene sfruttato nelle formulazioni di vaccini per la sua capacità di fungere da adiuvante proprio attraverso la formazione di depositi (Glenny et al. 1926). Gli antigeni sono semplicemente assorbiti sull'allume ma tale associazione è causa di una forte interazione elettrostatica che promuove una maggiore diffusione e presentazione dell'antigene da parte delle cellule APC (Burrell et al., 2000; Mannhalter et al., 1985). Vari altri coadiuvanti quali emulsioni acqua in olio, come l'Adiuvante completo di Freund (CFA) o il TiterMax, e micro- e nano-particelle biodegradabili sono attualmente molto utilizzati poichè ottimi induttori di effetto deposito attraverso il quale promuovono la produzione prolungata e sostenuta di alte concentrazioni di anticorpi (Herbert, 1968; Kreuter, 1988). L'obiettivo finale della vaccinazione è quello di generare la protezione contro malattie causate dagli agenti patogeni. L'Immunità protettiva contro diversi agenti patogeni richiede diverse risposte immunitarie che possono essere generate utilizzando opportuni coadiuvanti, pertanto, una dettagliata conoscenza dei meccanismi di azione dei coadiuvanti è molto importante nella progettazione razionale di vaccini. Negli ultimi anni, come detto, sono stati fatti notevoli progressi nella comprensione dei meccanismi di azione dei vari coadiuvanti ed il futuro della ricerca vaccino-

adiuvante si sta dirigendo verso lo sviluppo di nuovi adiuvanti combinati. In tale ambito rientrano di diritto i derivati glicolipidici in quanto è oramai evidente il loro coinvolgimento ed è dimostrato il loro ruolo primario nelle dinamiche alla base della reazione immunologica. Tuttavia, se da un lato la combinazione di diversi adiuvanti può potenziare la formulazione migliorando la qualità e la quantità della risposta immunitaria nei confronti degli antigeni vaccinali, combinazioni di adiuvanti hanno di certo meccanismi più complessi di azione e la sicurezza è la preoccupazione maggiore quando si tratta di approvare l'uso di nuovi adiuvanti per l'uomo. Solo attraverso la comprensione dettagliata dei meccanismi di azione di coadiuvanti glicoglicerolipidici si potranno fornire ulteriori informazioni sulla sicurezza e garanzie maggiori su un loro impiego. Inoltre, poiché tutti gli adiuvanti approvati e attualmente sottoposti a studi clinici sono combinati in vaccini somministrati per iniezione, c'è necessità di identificare e sviluppare nuove molecole di possibile applicazione come adiuvanti mucosali. In conclusione, l'obiettivo dei prossimi anni è quello di saperne di più e più dettagliatamente per quanto concerne i diversi meccanismi d'azione degli adiuvanti, che potranno così essere usati nella progettazione razionale di vaccini, e la speranza è quella di ottenere approvazione definitiva per l'uso di nuovi adiuvanti in vaccini per gli esseri umani (Awate, 2013).

CAPITOLO 5

Saggi farmacologici

5.1. Test preliminari in vitro

Nel laboratorio in cui ho svolto la tesi di dottorato sono in corso studi per la valutazione delle proprietà antigeniche di lipidi naturali. In questo contesto, un aspetto particolarmente interessante è che i lipidi complessi di diatomee marine possano attivare la risposta immunitaria attraverso meccanismi non ancora conosciuti. In particolare, sulfochinovosidi e galattosilipidi della diatomea *Thalassiosira weissflogii* sono in grado di stimolare le cellule dendritiche favorendone la maturazione e la produzione di interleuchine (IL-12) (Comunicazione personale dr. A. Fontana). Per valutare l'attività immunomodulante, in collaborazione col Prof. R. De Palma della II Università di Napoli, le cellule dendritiche dopo stimolazione sono state caratterizzate fenotipicamente per la presenza del HLA-DR (recettore D per l'antigene leucocitario umano) e per la produzione di interleuchine. L'attivazione dei linfociti T citotossici richiede che le cellule dendritiche presentino l'antigene attraverso un meccanismo di cross-presentation ed i vaccini devono essere in grado di generare una potente attivazione di tali cellule APC, istruendole su come attivare i linfociti T. La capacità di attivare le cellule dendritiche è quindi uno dei parametri con i quali viene valutata la validità di un nuovo vaccino terapeutico che, come detto precedentemente, per essere davvero efficace necessita dell'aggiunta di un adiuvante all'interno della sua composizione (paragrafo 4.7.). Il pool di SQDG di *T. weissflogii* (Twes-SQDG) è composto da una miscela di isomeri in cui acidi grassi saturi erano in gran parte predominanti, mentre gli MGDG contenevano alti livelli di acidi grassi polinsaturi. Nello stesso saggio, i derivati prodotti nel corso della tesi davano risposte simili. Infatti, i vari derivati degli α -6'-sulfochinovosil diacilgliceroli (derivati **32a** e **32b**) testati hanno mostrato lo stesso profilo stimolante dei

prodotti naturali con differenze non significative tra i diversi isomeri. Sorprendentemente, e il β -galattosil diacilglicerolo sintetico (composto **45**) contenenti due catene di acidi grassi saturi (composti non naturali) ha evidenziato un incremento della capacità di produzione di IL-12 rispetto agli stessi derivati contenenti catene aciliche insature e rispetto agli analoghi naturali testati precedentemente in miscela. Sebbene tali sostanze non siano in grado di innescare la produzione di altre interleuchine né favorire la maturazione di Mo-DC, l'induzione della produzione di IL-12 ha suggerito che gli acidi grassi saturi o la β -configurazione del carbonio anomero dello zucchero potrebbero essere importanti per modulare l'attività di tali molecole. In linea con questi dati il β -glucosil e il β -6'-sulfochinovosil-distearoilglicerolo determinano un incremento della risposta con un aumento della produzione di IL-12 e della maturazione di Mo-DC. In particolare, il β -sulfochinovosil-distearoilglicerolo (β SQDG-2C18), a differenza di SQDG delle diatomee e degli α -SQDG sintetici, ha mostrato un effetto dose-dipendente sulle cellule. Questo è un risultato molto importante poiché è la dimostrazione che attraverso modifiche chimiche si può migliorare l'efficacia della risposta, indirizzando probabilmente il meccanismo immunostimolante dei prodotti naturali ed aumentando così la sicurezza delle molecole (**Figura 17**).

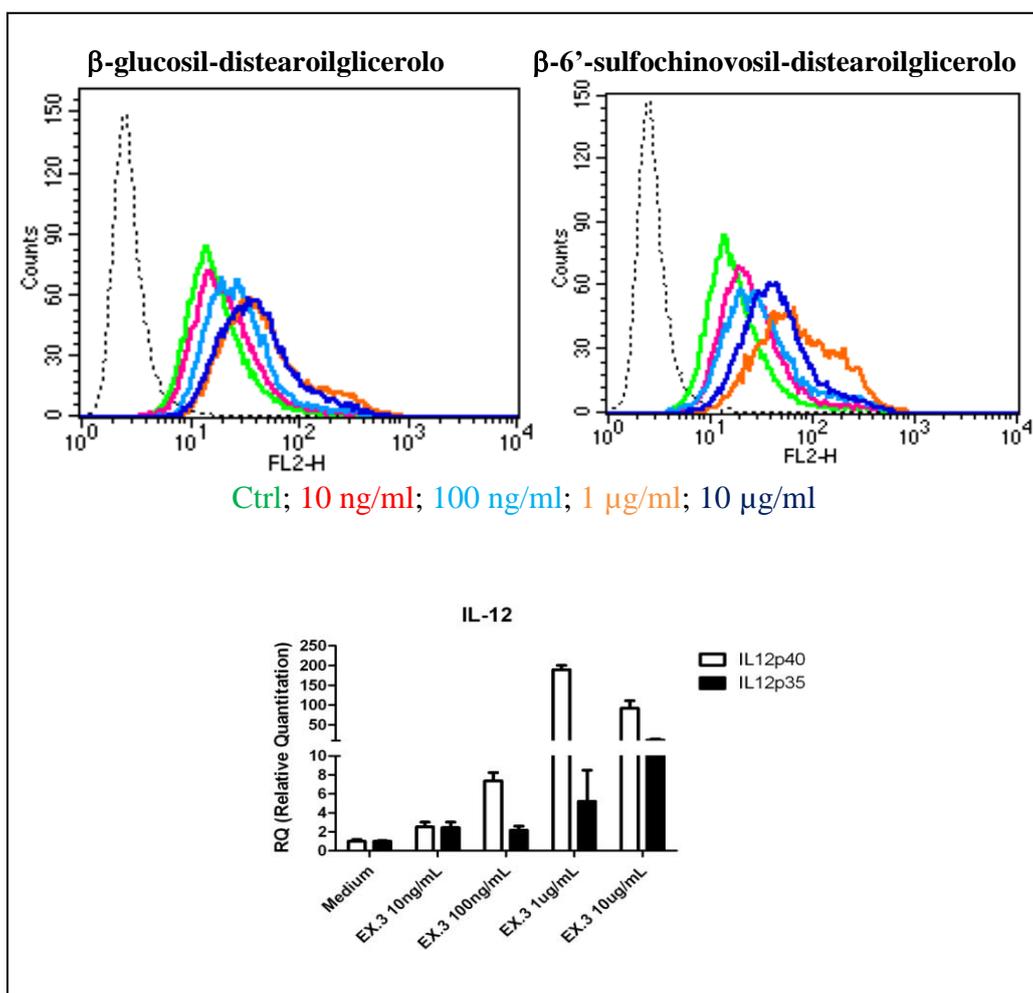


Figura17. Effetti sulla maturazione di Mo-DC (in alto) e sulla produzione di interleuchina-12 (In basso) determinati da β -glucosil diacilgliceroli e β -6'-sulfochinovosil diacilgliceroli sintetici.

5.2. Test in vivo su β -sulfochinovosil- distearoilgliceroli per la valutazione dell'attività adiuvante

Per valutare l'attività adiuvante di β -SQDG-2C18 sono stati effettuati test andando a stimolare la risposta immunitaria umorale antigene-specifica dopo l'immunizzazione di topi con ovalbumina (OVA) caricata con β -SQDG-2C18. Sono stati utilizzati due coadiuvanti commerciali, cioè l'adiuvante di Freund e il Titer max come controllo positivo. La risposta nei topi trattati si è manifestata attraverso un forte aumento di titoli anticorpali, cosa che, al

contrario non è stata riscontrata nei topi di controllo (gruppi DMSO) . In tutti i casi, l'immunizzazione ha evocato una potente risposta IgG1 anti-OVA, mentre in nessun topo che ha ricevuto OVA-priva di adiuvanti è stata riscontrata produzione di anticorpi specifici rilevabili. La somministrazione di β SQDG-2C18 ha anche determinato un aumento dei livelli di IgM anti-OVA con un titolo che è risultato intermedio tra la risposta stimolata da TiterMax e Freund. Di contro, è stata rilevata una reattività IgA anti-OVA molto bassa. È interessante notare che, nonostante l'incremento in vitro di IL-12, l'adiuvante sintetico è riuscito a scatenare anticorpi IgG2a che sono tipicamente associati a risposta murine di tipo Th1, ovvero citotossiche.

CAPITOLO 6

Sezione sperimentale

6.1. β -Galattosil e β -Glucosil- 1,2-O-diacilgliceroli.

6.1.1. *Procedure generali.* Spettri 1D e 2D-NMR sono stati registrati su un Bruker Avance-400 (400,13 MHz) e su un Bruker DRX-600, dotato di un TXI CryoProbe, in CDCl_3 (valori δ sono riferiti a $\text{CHCl}_3 = 7,26$ ppm) e gli spettri ^{13}C NMR sono stati registrati su un Bruker DPX-300 (75,47 MHz) (δ valori sono riferiti a $\text{CDCl}_3 = 77,0$ ppm). HRESIMS sono state condotte su un Micromass Q-TOF Micro. Piastre TLC (Kieselgel 60 F_{254}) e gel di silice in polvere (Kieselgel 60, 0,063-0,200 mm) sono stati acquistati da Merck. Tutti i reagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich e utilizzati senza ulteriore purificazione. Tutti gli intermedi sintetici sono stati caratterizzati mediante analisi NMR.

6.1.2. *Procedure sintetiche e dati spettrali.*

1,2-O-Isopropiliden glicerolo. Il glicerolo (2,0 g, 0,022 moli) è stato disciolto in N, N-dimetilformammide (4 mL) e sono stati aggiunti 2,2-dimetossi propano (4 mL) e acido p-toluensolfonico (300 mg). Dopo agitazione per una notte a temperatura ambiente, la miscela è stata ripartita tra acqua e diclorometano; la fase organica è stata purificata mediante cromatografia su gel di silice usando come gradiente etere di petrolio/etere etilico per ottenere il glicerolo 1,2-O-isopropilidene (2,0 g, 0,015 moli, 68%) sottoforma di olio incolore; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4.24 (1H, m, H-2), 4.09 (1H, dd, $J = 6.7, 8.5$ Hz, H-3a), 3.82 (1H, dd, $J = 6.4, 8.5$ Hz, H-3b), 3.65 (2H, m, H_2 -1), 1.46 (3H, s, CH_3), 1.40 (3H, s, CH_3); HRESIMS m/z calcolato per $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3\text{Na}$: 155.0684; trovato: 155.0689.

Composto 1. Al D-galattosio (1.00 g, 0.0056 moli), sciolto in piridina (13 mL) è stata aggiunta anidride acetica (5 mL); La miscela di reazione è stata posta in agitazione per 3 h a temperatura ambiente e, dopo ripartizione tra acqua e cloroformio, la fase organica è stata evaporata a pressione ridotta e purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **1**, (2.03 g, 0.0052 moli, 92%). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.36 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-1'), 5.54 (1H, app d, $J =$

2.8 Hz, H-4'), 5.39 (1H, dd, $J= 3.2, 10.8$ Hz, H-3'), 5.28 (1H, dd, $J= 3.5, 10.8$ Hz, H-2'), 4.48 (1H, m, H-5'), 4.17 (1H, dd, $J= 6.37, 11.1$ Hz, H-6'a), 4.11 (1H, dd, $J= 6.7, 11.1$ Hz, H-6'b), 2.20-2.00 (15H, m, 5OAc); HRESIMS m/z calcolato per $C_{16}H_{22}O_{11}Na$: 413.1060; trovato: 413.1074.

Composto 2: Al composto 1 (1.00 g, 0.0026 moli), sciolto in tetraidrofurano (10 mL) sono stati aggiunti 1.5 equivalenti di benzilammina; la miscela di reazione posta in agitazione una notte intera a temperatura ambiente è stata successivamente ripartita tra acqua e cloroformio, la fase organica è stata evaporata a pressione ridotta e purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto 2 (0.66 g, 0.0019 moli, 74%). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 5.40 (1H, d, $J=3.4$ Hz, H-4'), 5.37 (1H, m), 5.30 (1H, m), 5.20 (1H, app d, $J= 2.8$, H-1', α -anomero), 5.02 (1H, d, $J= 10.2$, H-1', β -anomero), 4.39 (1H, m, H-5'), 4.00 (2H, m, H₂-6'), 2.06 (3H, s, OAc), 2.00 (3H, s, OAc), 1.95 (3H, s, OAc), 1.90 (3H, s, OAc); HRESIMS m/z calcolato per $C_{14}H_{20}O_{10}Na$: 371.0954; trovato: 371.0968.

Composto 3: Al composto 2 (0.66 g, 0.0019 moli), sciolto in diclorometano anidro (6 mL); sono stati aggiunti 10 equivalenti di tricloroacetone nitrile, 0.2 equivalenti di 1,5-Diazabicciclo[5.4.0]undec-5-ene (DBU) e setacci molecolari attivati 3 Å; la miscela di reazione è stata posta in agitazione per 2 h a 0° C e, dopo evaporazione a pressione ridotta, purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di n-esano/acetato di etile per ottenere il composto 3 (0.74 g, 0.0015 moli, 79%). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6.60 (1H, d, $J=3.2$ Hz, H-1'), 5.54 (1H, app d, $J= 2.8$ Hz, H-4'), 5.40 (1H, dd, $J= 3.2, 10.8$ Hz, H-3'), 5.33 (1H, dd, $J= 3.1, 10.8$ Hz, H-2'), 4.47 (1H, m, H-5'), 4.11 (2H, m, H₂-6'), 2.14-1.95 (12H, 4OAc); HRESIMS m/z calcolato per $C_{16}H_{20}Cl_3NO_{10}Na$: 514.0050; trovato: 514.0037.

Composto 4: Il composto 3 (0,74 g, 0,0015 moli) è stato disciolto in diclorometano anidro (6 mL) e sono stati aggiunti 1,5 equivalenti di 1,2-O-isopropilidenglicerolo glicerolo; la miscela di reazione è stata mantenuta sotto flusso di argon a -20 °C con setacci molecolari attivati 3 Å, quindi è stato aggiunto trifluoruro di boro eterato (81 μ L, 0,66 mmol). Dopo 2 h in agitazione c'è stata un'altra aggiunta di boro trifluoruro eterato (81 μ L, 0,66 mmol), e la temperatura è stata portata a -10 °C; la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per una notte a questa temperatura. Dopo neutralizzazione con

triethylamina (130 μ L), la miscela è stata filtrata su celite, evaporata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su gel di silice usando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **4** (0.55 g, 0.0012 moli, 81%). I dati spettroscopici misurati sono stati identici a quelli presenti in letteratura (Janwitayanuchit et al., 2003). HRESIMS m/z calcolato per $C_{20}H_{30}O_{12}Na$: 485.1635; trovato: 485.1619.

Composto 5: Al composto **4** (0.55 g, 0.0012 moli), sciolto in acetonitrile (8 mL), sono stati aggiunti 5 equivalenti di nitrato di zinco esaidrato; la miscela di reazione è stata riscaldata fino a 50°C e lasciata in agitazione per 6 h. Dopo evaporazione a pressione ridotta del solvente organico, la miscela è stata ripartita tra acqua e cloroformio e la fase organica è stata evaporata e purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **5** (0.38 g, 0.0009 moli, 77%). I dati spettroscopici misurati sono stati identici a quelli presenti in letteratura (Janwitayanuchit et al., 2003). HRESIMS m/z calcolato per $C_{17}H_{26}O_{12}Na$: 445.1322; trovato: 445.1309.

Composto 6: Al composto **5** (0.19 g, 0.0005 moli), sciolto in diclorometano anidro (5 mL), sono stati aggiunti sotto argon acido linolenico (0.29 g, 0.0010 moli), dicioesilcarbodiimide (0.204 g, 0.0010 moli) e DMAP (0.012 g, 0.00010 moli); la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione una notte intera a temperatura ambiente, dopodiché è stata evaporata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **6** (0.406 g, 0.00043 moli, 94%). I dati spettroscopici misurati sono stati identici a quelli presenti in letteratura (Janwitayanuchit et al., 2003). HRESIMS m/z calcolato per $C_{53}H_{82}O_{14}Na$: 965.5602; trovato: 965.5591.

Composto 7: Al composto **6** (0.406 g, 0.00043 moli), sciolto in una soluzione acquosa di etanolo all'85% (8 mL) è stata aggiunta idrazina monoidrata (0.204 g, 0.00408 moli); la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per 6 h a 44 °C e, dopo evaporazione sotto flusso d'azoto, purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di cloroformio/metanolo per ottenere il composto **7** (0.252 g, 0.00032 moli, 75%). I dati spettroscopici misurati sono stati identici a quelli presenti in letteratura (Janwitayanuchit et al., 2003). HRESIMS m/z calcolato per $C_{45}H_{74}O_{10}Na$: 797.5180; trovato: 797.5167.

Composto 8: Al composto 5 (0.19 g, 0.0005 moli), sciolto in diclorometano anidro (5 mL), sono stati aggiunti sotto argon a -5°C acido linolenico (0.14 g, 0.0005 moli), dicitcloesilcarbodiimide (0.102 g, 0.0005 moli) e DMAP (0.006 g, 0.00005 moli). A questa temperatura la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per una notte intera e, successivamente, evaporata a pressione ridotta e purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **8** (0.296 g, 0.0004 moli, 86%). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.35 (1H, m, H-4'), 5.15 (1H, m, H-2'), 4.99 (1H, m, H-3'), 4.49 e 4.47 (ciascuno 1H, d, *J*= 7.8 Hz, H-1'), 4.12 (2H, m, H₂-6'), 4.10 (2H, m, H₂-1), 3.91 (1H, m, H-3a), 3.87 (1H, m, H-5'), 3.86 (1H, m, H-2), 3.65 (1H, m, H-3b), 2.77 (4H, m, protoni bis-allilici), 2.31 (2H, m, α-metilene dell'acile), 2.12 (3H, s, OAc), 2.06 (4H, m, protoni vinilici), 2.03 (3H, s, OAc), 2.01 (3H, s, OAc), 1.96 (3H, s, OAc), 1.59 (2H, m, β-metilene dell'acile), 1.35-1.25 (m, protoni alifatici), 0.92 (3H, t, *J*= 7.1 Hz, CH₃); HRESIMS *m/z* calcolato per C₃₅H₅₄O₁₃Na: 705.3462; trovato: 705.3481

Composto 9: Al composto 8 (0.148 g, 0.0002 moli), sciolto in una soluzione acquosa di etanolo all'85% (5 mL), è stata aggiunta idrazina monoidrata (0.096 g, 0.00192 moli); la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per 6 h a 44 °C e, dopo evaporazione sotto flusso d'azoto, purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di cloroformio/metanolo per ottenere il composto **9** (0.081 g, 0.00016 moli, 82%). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.40-5.30 (6H, m, protoni olefinici), 4.31 (1H, d, *J*= 7.6 Hz, H-1'), 4.11-4.09 (2H, m, H₂-1), 4.03 (1H, m, H-2), 4.02 (1H, app s, H-4'), 3.87 (1H, m, H-3a), 3.81 (2H, m, H₂-6'), 3.72 (1H, m, H-3b), 3.65 (1H, m, H-2'), 3.60 (1H, m, H-3'), 3.58 (1H, m, H-5'), 2.80 (4H, m, protoni bis-allilici), 2.33 (2H, m, α-metilene dell'acile), 2.08 (4H, protoni vinilici) 1.59 (2H, m, β-metilene dell'acile), 1.33-1.24 (protoni alifatici), 0.96 (3H, t, *J*= 7.1 Hz, CH₃); HRESIMS *m/z* calcolato per C₂₇H₄₈O₁₀Na: 555.3145; trovato: 555.3159.

Composto 10: Al composto 8 (0.148 g, 0.0002 moli), sciolto in diclorometano anidro (5 mL), sono stati aggiunti sotto argon acido stearico (0.0682 g, 0.00024 moli), dicitcloesilcarbodiimide (0.0466 g, 0.00024 moli) e DMAP (0.0024 g, 0.00002 moli); la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione una notte intera a temperatura ambiente; e dopo evaporazione a pressione ridotta, purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **10** (0.176 g, 0.000184 moli,

92%). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.36 (1H, m, H-4'), 5.16 (2H, m, H-2, H-2'), 4.98 (1H, m, H-3'), 4.48 e 4.46 (ciascuno 1H, d, $J= 7.8$ Hz, H-1'), 4.28 (1H, m, H-1a), 4.12 (2H, m, H₂-6'), 4.06 (1H, m, H-1b), 3.93 (1H, m, H-3a), 3.88 (1H, m, H-5'), 3.65 (1H, m, H-3b), 2.79 (4H, m, protoni bis-allilici), 2.30 (4H, m, α -metileni degli acili), 2.13 (3H, s, OAc), 2.06 (4H, m, protoni vinilici), 2.03 (3H, s, OAc), 2.02 (3H, s, OAc), 1.95 (3H, s, OAc), 1.59 (4H, m, β -metileni degli acili), 1.32-1.25 (m, protoni alifatici), 0.95 (6H, t, $J= 7.1$ Hz, 2CH₃); HRESIMS m/z calcolato per C₅₃H₈₈O₁₄Na: 971.6072; trovato: 971.6088.

Composto 11: Al composto 10 (0.176 g, 0.000184 moli), sciolto in una soluzione acquosa di etanolo all'85% (3 mL), è stata aggiunta idrazina monoidrata (0.0885 g, 0.00177 moli); la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per 6 h a 44 °C e, dopo evaporazione sotto flusso d'azoto, purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di cloroformio/metanolo per ottenere il composto **11** (0.116 g, 0.00015 moli, 80%). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.29 (1H, m, H-2), 5.41-5.30 (6H, m, protoni olefinici), 4.39 (1H, app d, $J= 12.1$ Hz, H-1a), 4.19 (1H, dd, $J= 4.3, 12.1$ Hz, H-1b), 4.26 (1H, d, $J= 7.6$ Hz, H-1'), 4.01 (1H, app s, H-4'), 3.91 (1H, m, H-3a), 3.86 (2H, m, H₂-6'), 3.71 (1H, m, H-3b), 3.64 (1H, m, H-2'), 3.59 (1H, m, H-3'), 3.53 (1H, m, H-5'), 2.81 (4H, m, protoni bis-allilici), 2.31 (4H, m, α -metileni degli acili), 2.07 (4H, m, protoni vinilici), 1.59 (4H, m, β -metileni degli acili), 1.33-1.25 (m, protoni alifatici), 0.93-0.90 (6H, t, $J= 7.2$ Hz, 2CH₃); HRESIMS m/z calcolato per C₄₅H₈₀O₁₀Na: 803.5649; trovato: 803.5665.

Composto 12: Resa 95%, partendo dal D-glucosio e seguendo la stessa procedura usata per preparare il composto **1**.

Composto 13: Resa 71%, partendo dal **12** e seguendo la stessa procedura usata per preparare il composto **2**.

Composto 14: Resa 81%, partendo dal **13** e seguendo la stessa procedura usata per preparare il composto **3**.

Composto 15: Resa 82%, partendo dal **14** e seguendo la stessa procedura usata per preparare il composto **4**. I dati spettroscopici misurati sono stati identici a quelli presenti in letteratura (Janwitayanuchit et al., 2003). HRESIMS m/z calcolato per C₂₀H₃₀O₁₂Na: 485.1635; trovato: 485.1649.

Composto 16: Resa 79%, partendo dal **15** e seguendo la stessa procedura usata per preparare il composto **5**. I dati spettroscopici misurati sono stati identici a quelli presenti in letteratura (Janwitayanuchit et al., 2003). HRESIMS m/z calcolato per $C_{17}H_{26}O_{12}Na$: 445.1322; trovato: 445.1300

Composto 17: Resa 91%, partendo dal **16** e seguendo la stessa procedura usata per preparare il composto **6**. I dati spettroscopici misurati sono stati identici a quelli presenti in letteratura (Janwitayanuchit et al., 2003). HRESIMS m/z calcolato per $C_{53}H_{94}O_{14}Na$: 977.6541; trovato: 977.6560.

Composto 18: Resa 88%, partendo dal **17** e seguendo la stessa procedura usata per preparare il composto **7**. HRESIMS m/z calcolato per $C_{45}H_{74}O_{10}Na$: 797.5180; trovato : 797.5195.

Composto 19: Resa 84%, partendo dal **16** e seguendo la stessa procedura usata per preparare il composto **8**.

Composto 20: Resa 81%, partendo dal **19** e seguendo la stessa procedura usata per preparare il composto **9**.

Composto 21: Resa 94%, partendo dal **19** e seguendo la stessa procedura usata per preparare il composto **10**.

Composto 22: Resa 82%, partendo dal **21** e seguendo la stessa procedura usata per preparare il composto **11**.

Composti 6'-22' sono stati sintetizzati allo stesso modo dei composti **6-22** usando acido stearico anziché acido linolenico.

6.2. α -6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli

6.2.1. *Procedure generali.* Tutti i prodotti finali e le strutture degli intermedi sintetici sono stati assegnati attraverso ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY (tempo di miscelazione $\frac{1}{4}$ 68 ms), HSQC, HMBC e NOESY (tempo di miscelazione $\frac{1}{4}$ 250 ms). Spettri NMR ^1H , ^{13}C e 2D NMR sono stati acquisiti dal Servizio NMR dell'Istituto di Chimica Biomolecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche (ICB-CNR) e registrati su uno spettrometro Bruker DRX-600, dotato di TCI CryoProbe, dotato di un gradiente lungo l'asse Z e sugli strumenti Bruker a 400 e/o 300 MHz. I campioni per l'analisi spettroscopica NMR sono stati disciolti in solvente appropriato; spettri in D_2O sono stati riferiti al sodio 3-(trimetil-silil)-(2,2,3,3- $^2\text{H}_4$) propionato (Aldrich, Milwaukee, WI); per altri solventi lo spostamento lungo il campo del segnale del solvente è stato utilizzato come standard interno: CDCl_3 (^1H , ^{13}C): 7.26, 77.0 ppm; CD_3OD (^1H , ^{13}C): 3.34, 49.0 ppm. Analisi ESIMS ad alta qualità sono state effettuate su un Micromass Q-TOF Micro accoppiato con un HPLC Waters Alliance 2695. TLC piastre (Kieselgel 60 F₂₅₄) e gel di silice in polvere (Kieselgel 60 ,0.063-0.200 mm) sono stati acquistati dalla Merck. Tutti i reagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich e utilizzati senza ulteriore purificazione.

6.2.2. Fonte dell'enzima

Un omogeneizzato enzimatico della massa viscerale dell'*Aplysia fasciata* è stato preparato mediante omogeneizzazione della stessa in tampone K-acetato (50 mM, pH 5,5), alla quale sono succedute operazioni di centrifugazione e di dialisi, e infine concentrazione mediante ultrafiltrazione, come descritto già in precedenza (Andreotti et al., 2006). Siccome il più abbondante enzima idrolitico nell'estratto della massa viscerale del mollusco era una α -D-glucosidasi, questa soluzione enzimatica, con un contenuto proteico totale di 8,1 mg/mL e un'attività specifica corrispondente a 1.2 U/mg (utilizzando p-nitrofenil α -D-glucopiranoside come substrato), è stata ritenuta utile per questo lavoro tal quale, ovvero senza ulteriori purificazioni. Un'unità di attività α -D-glucosidasi è stata definita come la quantità di enzima necessaria per catalizzare l'uscita di 1,0 mmol di p-nitrofenolo per minuto. La reazione enzimatica impiegando *A. niger* è stata eseguita in un tampone K-acetato (50 mM, pH 5,5) (Ota et al., 2009) ed in un tampone K-fosfato (0,1 M, pH 6,5) (Sarka et al., 1999); quest'ultima condizione sperimentale è stata adoperata per testare anche l'attività di *B. stearothermophilus*.

6.2.3. Procedure sintetiche e dati spettrali.

1,2-O-Isopropiliden glicerolo. Il glicerolo (2,0 g, 0,022 mol) è stato disciolto in N, N-dimetilformammide (4 mL) e sono stati aggiunti 2,2-dimetossi propano (4 mL) e acido p-toluensolfonico (300 mg). Dopo agitazione per una notte a temperatura ambiente, la miscela è stata ripartita tra acqua e diclorometano; la fase organica è stata purificata mediante cromatografia su gel di silice usando come gradiente etere di petrolio/etere etilico a dare glicerolo 1,2-O-isopropilidene (2,0 g, 0,015 mol, 68%) sottoforma di olio incolore; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4.24 (1H, m, H-2), 4.09 (1H, dd, $J= 6.7, 8.5$ Hz, H-3a), 3.82 (1H, dd, $J= 6.4, 8.5$ Hz, H-3b), 3.65 (2H, m, H_2 -1), 1.46 (3H, s, CH_3), 1.40 (3H, s, CH_3); HRESIMS m/z calcolato per $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3\text{Na}$: 155.0684; trovato: 155.0689.

Composto 23. 1,2-O-isopropilidenglicerolo (1,9 mmoli), precedentemente preparato e disciolto in DMSO (1 mL), è stato aggiunto ad una soluzione di maltosio 0,5 M (19 mmoli, 38 mL) in tampone K-acetato (50 mM, pH 5,5) contenente 600 mL di omogenato enzimatico della massa viscerale di *Aplysia fasciata* (5,83 U). Il tutto è stato posto sotto agitazione magnetica a 34 °C per 29 h fino al consumo quasi totale del maltosio, regolarmente monitorato mediante TLC (sistema solvente: EtOAc/MeOH/ H_2O 70:20:10 vol). Dopo 5 h l'1,2-O-isopropilidenglicerolo (accettore) è stato completamente consumato, ma essendo ancora presente maltosio, è stato aggiunta nel mezzo di reazione una seconda aliquota di accettore (1,9 mmoli), quindi dopo 8 h dall'inizio della reazione ne è stata aggiunta una terza (1,9 mmoli). La reazione è stata fermata dopo 29 h raffreddandola a 20 °C e la miscela è stata frazionata mediante cromatografia a fase inversa su colonna RP-18 (eluendo dapprima con due volumi di colonna di acqua e poi con metanolo). La miscela di prodotto, consistente nel derivato α -glucosil dell'1,2-O-isopropilidenglicerolo (**1**) e nei corrispondenti analoghi di- e tri- saccaridici sono stati recuperati nella frazione metanolica e isolati mediante cromatografia su colonna di gel di silice (eluendo con metanolo in acetato di etile). Sono stati così isolati 1,71 mmoli (502 mg) di composto **23** puro (olio giallo pallido); IR (film liquido) ν_{max} 3400, 2941, 2851, 1252, 1240 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 4.82 (1H, d, $J=3.29$ Hz, H-1'), 4.40-4.37 (1H, m, H-2), 4.07-3.73 (2H, m, H_2 -1), 3.75-3.74 (1H, m, H-6'a), 3.65-3.52 (2H, m, H_2 -3), 3.63-3.61 (1H, m, H-6'b), 3.62-3.60 (1H, m, H-3'), 3.57-3.55 (1H, m, H-4'), 3.43 (1H, dd, H-2'), 3.28 (1H, dd, H-5'), 1.38 (3H, s,

CH₃), 1.29 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 99.3 (CH, C1'), 75.3 (CH, C2), 74.0 (CH, C3'), 72.7 (CH, C4'), 72.3 (CH, C2'), 70.4 (CH, C5'), 69.1 (CH₂, C3), 66.4 (CH₂, C1), 61.4 (CH₂, C6'), 26.5, 25.1 (metili dell'acetone); HRESIMS *m/z* calcolato per C₁₂H₂₂NaO₈: 317.1212; trovato: 317.1218.

Composto 24. Composto 23 (0,500 g, 0,0017 moli) è stato sciolto in piridina (4 mL); e vi sono stati aggiunti 1,6 equivalenti di cloruro tritile (0,756 g, 2,7 mmoli) e 0,3 equivalenti di DMAP (57 mg, 0,51 mmoli); la miscela di reazione è stata agitata per 3 ore a 60 °C e, successivamente, è stata aggiunta anidride acetica (1 ml). Dopo agitazione per una notte, la miscela è stata evaporata sotto flusso di azoto e purificata mediante cromatografia su gel di silice usando un gradiente di cloroformio/metanolo per ottenere il composto **24** (0,732 g, 1.1 mmoli, 65%) come olio giallo chiaro; R_f (etere di petrolio/etere etilico 3:7) = 0.65; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.41-7.25 (15H, m, protoni tritilici), 5.41 (1H, dd, *J* = 9.4, 9.4 Hz, H-3'), 5.18 e 5.16 (ciascuno 1H, d, *J* = 3.5 Hz, H-1'), 5.07 (1H, dd, *J* = 9.8, 9.8 Hz, H-4'), 4.90 (1H, m, H-2'), 4.30-4.28 (1H, m, H-2), 4.05-4.03 (2H, m, H₂-1), 3.97-3.95 (1H, m, H-5'), 3.79-3.77 (1H, m, H-3a), 3.56-3.54 (1H, m, H-3b), 3.17 (1H, app d, *J* = 10.5 Hz, H-6'a), 3.07 (1H, dd, *J* = 5.1, 10.5 Hz, H-6'b), 2.04 (6H, s, OAc), 1.96 (3H, s, OAc), 1.40 (3H, s, CH₃), 1.32 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 128.5, 127.6, 126.9 (CH, metini aromatici), 109.4 (C, carbonio dell'acetone), 95.7 (CH, C1'), 70.7 (CH, C2'), 74.1 (CH, C2), 70.2 (CH, C3'), 68.8 (CH, C4'), 68.6 (CH₂, C1), 68.4 (CH, C5'), 66.4 (CH₂, C3), 61.9 (CH₂, C6'), 26.5, 25.5 (CH₃, metili dell'acetone), 20.6, 20.5, 20.4 (CH₃, metili degli acetati); HRESIMS *m/z* calcolato per C₃₇H₄₂NaO₁₁: 685.2625; trovato: 685.2630.

Composto 25. Composto 24 (0.732 g, 1.1 mmoli) è stato sciolto in una soluzione metanolo/acqua (25 mL, 9:1) a cui è stata aggiunta resina Dowex 50WX8-H⁺ (18 g); dopo 40 min sotto agitazione, la miscela di reazione è stata filtrata, evaporata e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **25** (0.465 g, 0.748 mmoli, 68%) come olio giallo chiaro; R_f (etere di petrolio/etere etilico 3:7) = 0.10; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.41-7.21 (15H, m, protoni tritilici), 5.41 (1H, dd, *J* = 9.4, 9.4 Hz, H-3'), 5.16 e 5.13 (ciascuno 1H, d, *J* = 3.5 Hz, H-1'), 5.06 (1H, dd, *J* = 9.8, 9.8 Hz, H-4'), 4.94 e 4.92 (ciascuno 1H, dd, *J* = 9.39, 3.5 Hz, H-2'), 4.01-3.99 (1H, m, H-5'), 3.94-

3.92 (1H, m, H-2), 3.79-3.77 (1H, m, H-3a), 3.72-3.70 (1H, m, H-1a), 3.65-3.63 (1H, m, H-3b), 3.61 (1H, m, H-1b), 3.19 (1H, app d, $J= 10.5$ Hz, H-6'a), 3.10 (1H, app d, $J= 10.5$ Hz, H-6'b), 2.06 (3H, s, OAc), 1.97 (3H, s, OAc), 1.82 (3H, s, OAc); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 128.5, 127.5, 126.7 (CH, metini aromatici), 96.3 (CH, C1'), 71.0 (CH, C2'), 70.4 (CH, C3'), 70.3 (CH, C2), 70.2 (CH_2 , C3), 69.0 (CH, C4'), 68.8 (CH, C5'), 63.2 (CH_2 , C1), 62.0 (CH_2 , C6'), 20.7, 20.6, 20.5 (CH_3 , metili degli acetati); HRESIMS m/z calcolato per $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{NaO}_{11}$: 645.2312; trovato: 645.2306.

Composto 26. Al composto 25 (0.20 g, 0.32 mmoli) sciolto in diclorometano anidro (6 mL) sono stati aggiunti acido stearico (0.90 g, 0.32 mmoli), dicitcloesilcabodiimmide (0.0326 g, 0.32 mmoli) e DMAP (0.0038 g, 0.032 mmol) sotto flusso di argon a 0 °C. La miscela è stata lasciata sotto agitazione per una notte intera a 0 °C e dopo evaporazione è stata purificata tramite cromatografia su gel di silice usando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **26** (0.220 g, 0.250 mmoli, 78%) sottoforma di olio incolore; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.40-7.22 (15H, m, protoni tritilici), 5.39-5.37 (1H, m, H-3'), 5.15 e 5.11 (ciascuno 1H, app d, $J= 2.7$ Hz, H-1'), 5.08 (1H, dd, $J= 10.1, 10.1$ Hz, H-4'), 4.87 (1H, dd, $J= 10.5, 2.7$ Hz, H-2'), 4.31-4.29 (1H, m, H-1a), 4.15-4.13 (1H, m, H-1b), 4.00-3.98 (1H, m, H-5'), 3.94-3.92 (1H, m, H-3a), 3.88-3.86 (1H, m, H-2), 3.65-3.63 (1H, m, H-3b), 3.17 (1H, app d, $J= 9.8$ Hz, H-6'a), 3.07 (1H, dd, $J= 9.8, 4.7$ Hz, H-6'b), 2.31-2.28 (2H, m, α -metilene dell'acile), 2.04 (3H, s, OAc), 2.02 (3H, s, OAc), 1.98 (3H, s, OAc), 1.64-1.60 (2H, m, β -metilene dell'acile), 1.38-1.23 (28H, m, protoni alifatici), 0.90 (3H, t, $J=6.9$ Hz, CH_3); HRESIMS m/z calcolato per $\text{C}_{52}\text{H}_{72}\text{NaO}_{12}$: 912.4921; trovato: 912.4925.

Composto 27a. Al composto 26 (0.115 g, 0.130 mmoli) sciolto in diclorometano anidro (5 mL) sono stati aggiunti acido stearico (0.044 g, 0.156 mmoli), dicitcloesilcabodiimmide (0.0303 g, 0.156 mmoli) e DMAP (0.00190 g, 0.0156 mmoli) sotto flusso di argon a 0 °C. La miscela è stata lasciata sotto agitazione per una notte intera a 0 °C e dopo evaporazione è stata purificata tramite cromatografia su gel di silice usando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **27a** (0.122 g, 0.106 mmoli, 82%); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.41-7.22 (15H, m, protoni tritilici), 5.39-5.37 (1H, m, H-3'), 5.26-5.24 (1H, m, H-2), 5.15 e 5.14 (ciascuno 1H, app d, $J= 2.7$ Hz, H-1'), 5.08 (1H, dd, $J= 10.1, 10.1$ Hz, H-4'), 4.89 (1H, dd, $J= 10.5, 2.7$ Hz,

H-2'), 4.33-4.31 (1H, m, H-1a), 4.16-4.14 (1H, m, H-1b), 3.97-3.95 (1H, m, H-5'), 3.91-3.89 (1H, m, H-3a), 3.66-3.64 (1H, m, H-3b), 3.18 (1H, app d, $J= 9.8$ Hz, H-6'a), 3.09 (1H, dd, $J= 9.8, 4.7$ Hz, H-6'b), 2.31-2.27 (4H, m, α -metileni degli acili), 2.05 (3H, s, OAc), 2.02 (3H, s, OAc), 1.98 (3H, s, OAc), 1.64-1.60 (4H, m, β -metileni degli acili), 1.38-1.23 (56H, m, protoni alifatici), 0.92-0.90 (6H, sovrapposti, 2CH₃); ¹³C NMR(100 MHz, CDCl₃): δ 172.8, 172.6 (C, carboni degli esteri acilici), 128.6, 127.7, 127.1 (CH, metini aromatici), 96.1 (CH, C1'), 71.1 (CH, C2'), 70.4 (CH, C3'), 70.0 (CH, C2), 69.3 (CH, C5'), 68.8 (CH, C4'), 66.0 (CH₂, C3), 62.4 (CH₂, C1), 62.2 (CH₂, C6'), 34.2, 34.1 (CH₂, α -metileni degli acili), 29.8-29.0 (CH₂, metileni alifatici), 25.2, 24.9 (CH₂, β -metileni degli acili), 20.7, 20.5, 20.4 (CH₃, metili degli acetati), 14.2, 14.0 (CH₃, metili terminali degli acili); HRESIMS m/z calcolato per C₇₀H₁₀₆NaO₁₃: 1177.7531; trovato: 1177.7535

Composto 27b. Al composto 26 (0.115 g, 0.130 mmoli) sciolto in diclorometano anidro (5 mL) sono stati aggiunti acido oleico (0.044 g, 0.156 mmoli), dicicloesilcarbodiimmide (0.0303 g, 0.156 mmoli) e DMAP (0.00190 g, 0.0156 mmoli) sotto flusso di argon a 0 °C. La miscela è stata lasciata sotto agitazione per una notte intera a 0 °C e dopo evaporazione è stata purificata tramite cromatografia su gel di silice usando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **27b** (0.120 g, 0.105 mmoli, 81%) sottoforma di olio giallo; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.41-7.22 (15H, m, protoni tritilici), 5.40-5.38 (1H, m, H-3'), 5.38-5.36 (2H, m, protoni olefinici) 5.26-5.24 (1H, m, H-2), 5.16 e 5.13 (ciascuno 1H, app d, $J= 2.7$ Hz, H-1'), 5.08 (1H, dd, $J= 10.1, 10.1$ Hz, H-4'), 4.89 (1H, dd, $J= 10.5, 2.7$ Hz, H-2'), 4.33-4.31 (1H, m, H-1a), 4.16-4.14 (1H, m, H-1b), 3.97-3.95 (1H, m, H-5'), 3.91-3.89 (1H, m, H-3a), 3.66-3.64 (1H, m, H-3b), 3.18 (1H, app d, $J= 9.8$ Hz, H-6'a), 3.09 (1H, dd, $J= 9.8, 4.7$ Hz, H-6'b), 2.31-2.27 (4H, m, α -metileni degli acili), 2.05 (3H, s, OAc), 2.04-2.02 (4H, m, protoni allilici), 2.02 (3H, s, OAc), 1.98 (3H, s, OAc), 1.63-1.61 (4H, m, β -metileni degli acili), 1.38-1.23 (48H, m, protoni alifatici), 0.92-0.89 (6H, sovrapposti, 2CH₃); ¹³C NMR(100 MHz, CDCl₃): δ 172.8, 172.7 (C, carboni degli esteri acilici), 131.0, 128.6, 127.7, 127.1 (CH, metini aromatici e olefinici), 96.1 (CH, C1'), 71.1 (CH, C2'), 70.4 (CH, C3'), 70.0 (CH, C2), 69.3 (CH, C5'), 68.8 (CH, C4'), 66.0 (CH₂, C3), 62.5 (CH₂, C1), 62.2 (CH₂, C6'), 34.2, 34.1 (CH₂, α -metileni degli acili), 29.8-29.0 (CH₂, metileni alifatici), 27.8 (CH₂, metileni allilici), 25.2, 24.9 (CH₂,

β -metileni degli acili), 20.7, 20.5, 20.4 (CH₃, metili degli acetati), 14.2, 14.0 (CH₃, metili terminali degli acili); HRESIMS m/z calcolato per C₇₀H₁₀₄NaO₁₃: 1175.7375; trovato: 1175.7381.

Composto 28a. Il Composto 27a (0.124 g, 0.107 mmoli) è stato sciolto in una soluzione di iodio e metanolo (5 mL, 1%); dopo 30 min a 60 °C in agitazione, la miscela di reazione è stata concentrata e purificata mediante cromatografia su gel di silice usando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **28a** (0.077 g, 0.084 mmoli, 79%) sottoforma di olio giallo chiaro; Rf (etere di petrolio/etere etilico 3:7) = 0.22; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.52-5.50 (1H, m, H-3'), 5.22-5.20 (1H, m, H-2), 5.11 (1H, app d, J = 2.9 Hz, H-1'), 5.02-5.00 (1H, m, H-4'), 4.84 (1H, dd, J = 9.9, 2.9 Hz, H-2'), 4.33-4.31 (1H, m, H-1a), 4.18-4.16 (1H, m, H-1b), 3.83-3.81 (1H, m, H-3a), 3.82-3.80 (1H, m, H-5'), 3.69 (1H, app d, J = 9.6 Hz, H-6'a), 3.64-3.62 (1H, m, H-3b), 3.59 (1H, dd, J = 9.6, 4.4 Hz, H-6'b), 2.31-2.27 (4H, m, α -metileni degli acili), 2.05 (3H, s, OAc), 2.01 (6H, s, 2OAc), 1.63-1.60 (4H, m, β -metileni degli acili), 1.38-1.23 (56H, m, protoni alifatici), 0.91-0.89 (6H, sovrapposti, 2CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.0, 172.8 (C, carboni degli esteri acilici), 96.4 (CH, C1'), 70.9 (CH, C2'), 70.0 (CH, C2), 69.8 (CH, C3'), 69.8 (CH, C5'), 68.9 (CH, C4'), 66.4 (CH₂, C3), 62.3 (CH₂, C1), 61.1 (CH₂, C6'), 34.0, 33.9 (CH₂, α -metileni degli acili), 29.9-29.0 (CH₂, metileni alifatici), 25.2, 25.1 (CH₂, β -metileni degli acili), 20.8, 20.7, 20.4 (CH₃, metili degli acetati), 14.6, 14.1 (CH₃, metili terminali degli acili); HRESIMS m/z calcolato per C₅₁H₉₂NaO₁₃: 935.6436; trovato: 935.6441.

Composto 28b. Il Composto 27b (0.124 g, 0.107 mmoli) è stato sciolto in una soluzione di iodio e metanolo (5 mL, 1%); dopo 30 min a 60 °C in agitazione, la miscela di reazione è stata concentrata e purificata mediante cromatografia su gel di silice usando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **28b** (0.074 g, 0.081 mmoli, 76%) sottoforma di olio giallo chiaro; Rf (etere di petrolio/etere etilico 3:7) = 0.22; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.52-5.50 (1H, m, H-3'), 5.38-5.36 (2H, m, protoni olefinici), 5.22-5.20 (1H, m, H-2), 5.11 (1H, app d, J = 2.9 Hz, H-1'), 5.02-5.00 (1H, m, H-4'), 4.84 (1H, dd, J = 9.9, 2.9 Hz, H-2'), 4.33-4.31 (1H, m, H-1a), 4.18-4.16 (1H, m, H-1b), 3.83-3.81 (1H, m, H-3a), 3.82-3.80 (1H, m, H-5'), 3.69 (1H, app d, J = 9.6 Hz, H-6'a), 3.64-3.62 (1H, m, H-3b), 3.59 (1H, dd, J = 9.6, 4.4 Hz, H-6'b), 2.31-2.27 (4H, m, α -metileni degli acili), 2.05 (3H, s, OAc), 2.04-2.01 (4H, m, protoni allilici),

2.01 (6H, s, 2OAc), 1.64-1.60 (4H, m, β -metilene degli acili), 1.38-1.23 (48H, m, protoni alifatici), 0.91-0.89 (6H, sovrapposti, 2CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.0, 172.8 (C, carboni degli esteri acilici), 131.0 (2CH, metini olefinici) 96.3 (CH, C1'), 70.9 (CH, C2'), 70.0 (CH, C2), 69.8 (CH, C3'), 69.8 (CH, C5'), 68.9 (CH, C4'), 66.4 (CH₂, C3), 62.3 (CH₂, C1), 61.1 (CH₂, C6'), 34.0, 33.9 (CH₂, α -metilene degli acili), 29.8-29.0 (CH₂, metilene alifatici), 27.9 (2CH₂, metilene allilici) 25.2, 25.1 (CH₂, β -metilene degli acili), 20.8, 20.7, 20.4 (CH₃, metili degli acetati), 14.7, 14.1 (CH₃, metili terminali degli acili); HRESIMS m/z calcolato per C₅₁H₉₂NaO₁₃: 933.6279; trovato: 933.6275.

Composto 29a. Al composto 28a (0.081 g, 0.089 mmoli), sciolto in piridina anidra (3 mL), sono stati aggiunti cloruro di p-toluensolfonile (0.169 g, 0.888 mmoli) e DMAP (0.010 g, 0.089 mmoli) a 0 °C. La miscela è stata lasciata in agitazione sotto argon una notte intera a temperatura ambiente. Dopo evaporazione sotto flusso di azoto, la miscela di reazione è stata purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **29a** (0.076 g, 0.073 mmoli, 82%) sottoforma di olio giallo chiaro; R_f (etere di petrolio/etere etilico 1:1) = 0.28; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.76 (2H, d, J = 8.3 Hz, protoni aromatici), 7.34 (2H, d, J = 8.3 Hz, protoni aromatici), 5.40-5.38 (1H, m, H3'), 5.18-5.16 (1H, m, H-2), 5.02-5.00 (1H, m, H-4'), 4.92-4.90 (1H, m, H-2'), 4.75 e 4.73 (ciascuno 1H, d, J = 3.4 Hz, H-1'), 4.31-4.29 (1H, m, H-1a), 4.26 (1H, app d, J = 9.8 Hz, H-6'a), 4.17-4.15 (1H, m, H-1b), 4.16-4.14 (1H, m, H-5'), 4.09 (1H, dd, J = 9.8, 4.1 Hz, H-6'b), 3.75-3.73 (1H, m, H-3a), 3.56-3.54 (1H, m, H-3b), 2.44 (3H, s, metile aromatico), 2.31-2.29 (4H, m, α -metilene degli acili), 2.04 (6H, s, OAc), 1.98 (3H, s, OAc), 1.60-1.58 (4H, m, β -metilene degli acili), 1.38-1.23 (56H, m, protoni alifatici), 0.91-0.88 (6H, sovrapposti, 2CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 172.7, 172.5 (C, carboni degli esteri acilici), 129.6, 127.9 (CH, metini aromatici), 95.8 (CH, C1'), 70.4 (CH, C2'), 69.8 (CH, C3'), 69.5 (CH, C2), 68.4 (CH, C4'), 66.5 (CH₂, C3), 62.0 (CH₂, C1), 62.0 (CH₂, C6'), 34.0, 33.9 (CH₂, α -metilene degli acili), 29.9-29.4 (CH₂, metilene alifatici), 24.8, 24.6 (CH₂, β -metilene degli acili), 20.6, 20.5, 20.4 (CH₃, metili degli acetati), 14.0, 13.9 (CH₃, metili terminali degli acili); HRESIMS m/z calcolato per C₅₈H₉₈NaO₁₅S: 1089.6524; trovato: 1089.6521.

Composto 29b. Al composto 28b (0.081 g, 0.089 mmoli), sciolto in piridina anidra (3 mL), sono stati aggiunti cloruro di p-toluensolfonile (0.169 g, 0.888

mmoli) e DMAP (0.010 g, 0.089 mmoli) a 0 °C. La miscela è stata lasciata in agitazione sotto argon una notte intera a temperatura ambiente. Dopo evaporazione sotto flusso di azoto, la miscela di reazione è stata purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **29b** (0.076 g, 0.073 mmoli, 82%) sottoforma di olio giallo chiaro; Rf (etere di petrolio/etere etilico 1:1) = 0.28; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.77 (2H, d, *J*= 8.3 Hz, protoni aromatici), 7.34 (2H, d, *J*= 8.3 Hz, protoni aromatici), 5.40-5.38 (1H, m, H^{3'}), 5.38-5.36 (2H, m, protoni olefinici), 5.18-5.16 (1H, m, H-2), 5.01-4.99 (1H, m, H-4'), 4.92-4.90 (1H, m, H-2'), 4.75 e 4.73 (ciascuno 1H, d, *J*= 3.4 Hz, H-1'), 4.31-4.29 (1H, m, H-1a), 4.26 (1H, app d, *J*= 9.8 Hz, H-6'a), 4.17-4.15 (1H, m, H-1b), 4.16-4.14 (1H, m, H-5'), 4.09 (1H, dd, *J*= 9.8, 4.1 Hz, H-6'b), 3.75-3.73 (1H, m, H-3a), 3.56-3.54 (1H, m, H-3b), 2.44 (3H, s, metile aromatico), 2.31-2.29 (4H, m, α-metileni degli acili), 2.06-2.03 (4H, m, protoni allilici), 2.04 (6H, s, OAc), 1.98 (3H, s, OAc), 1.60-1.57 (4H, m, β-metileni degli acili), 1.38-1.23 (48H, m, protoni alifatici), 0.90-0.88 (6H, sovrapposti, 2CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 172.6, 172.5 (C, carboni degli esteri acilici), 130.2, 129.6, 127.9 (CH, metini aromatici), 95.9 (CH, C1'), 70.4 (CH, C2'), 69.8 (CH, C3'), 69.5 (CH, C2), 68.4 (CH, C4'), 66.5 (CH₂, C3), 62.0 (CH₂, C1), 62.0 (CH₂, C6'), 34.0, 33.9 (CH₂, α-metileni degli acili), 29.9-29.4 (CH₂, metileni alifatici), 27.9 (2CH₂, metileni allilici), 24.8, 24.6 (CH₂, β-metileni degli acili), 20.6, 20.5, 20.4 (CH₃, metili degli acetati), 14.1, 13.9 (CH₃, metili terminali degli acili); HRESIMS *m/z* calcolato per C₅₈H₉₈NaO₁₅S: 1087.6368; trovato: 1087.6371.

Composto 30a. Al composto 29a (0.076 g, 0.073 mmoli), sciolto in 2-butanone (7 mL) è stato aggiunto tioacetato di potassio (0.021 g, 0.183 mmoli). La miscela è stata posta sotto agitazione per 2.5 h a 80 °C; evaporata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **30a** (0.064 g, 0.065 mmoli, 90%) sottoforma di olio incolore; Rf (etere di petrolio/etere etilico 1:1) = 0.60; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.41-5.39 (1H, m, H-3'), 5.20-5.18 (1H, m, H-2), 5.04-5.02 (1H, m, H-4'), 4.94-4.92 (1H, m, H-2'), 4.82 e 4.79 (ciascuno 1H, app d, *J*=3.9 Hz, H1'), 4.33-4.31 (1H, m, H-1a), 4.19 (1H, app d, m, H-1b), 3.83-3.81 (1H, m, H-5'), 3.80-3.78 (1H, m, H-3a), 3.60-3.58 (1H, m, H-3b), 3.19-3.18 (1H, m, H-6'a), 3.12-3.10 (1H, m, H-6'b), 2.34 (3H, s, SCH₃), 2.32-2.30 (4H, m, α-metileni degli acili), 2.07 (3H, s, OAc), 2.05 (3H,

s, OAc), 1.99 (3H, s, OAc), 1.60-1.58 (4H, m, β -metilene degli acili), 1.37-1.23 (56H, m, protoni alifatici), 0.90-0.87 (6H, sovrapposti, 2CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 172.8, 172.6 (C, carboni degli esteri acilici), 95.8 (CH, C1'), 70.6 (CH, C4'), 70.7 (CH, C2'), 69.7 (CH, C3'), 69.4 (CH, C2), 66.1 (CH₂, C3), 62.0 (CH₂, C1), 34.1, 34.0 (CH₂, α -metilene degli acili), 30.5 (CH₃, metile del tioacetato), 29.7-29.1 (CH₂, metilene alifatici), 29.7 (CH₂, C6'), 24.9, 24.7 (CH₂, β -metilene degli acili), 20.6, 20.5, 20.5 (CH₃, metili degli acetati), 14.0, 13.9 (CH₃, metili terminali degli acili); HRESIMS *m/z* calcolato per C₅₃H₉₄NaO₁₃S: 993.6313 trovato: 993.6316.

Composto 30b. Al composto 29b (0.076 g, 0.073 mmoli), sciolto in 2-butanone (7 mL) è stato aggiunto tioacetato di potassio (0.021 g, 0.183 mmoli). La miscela è stata posta sotto agitazione per 2.5 h a 80 °C; evaporata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **30b** (0.065 g, 0.066 mmoli, 91%) sottoforma di olio giallo chiaro; R_f (etere di petrolio/etere etilico 1:1) = 0.60; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.41-5.39 (1H, m, H-3'), 5.38-5.36 (2H, m, protoni olefinici), 5.20-5.18 (1H, m, H-2), 5.04-5.02 (1H, m, H-4'), 4.94-4.92 (1H, m, H-2'), 4.82 e 4.80 (ciascuno 1H, app d, J= 3.9 Hz, H1'), 4.33-4.31 (1H, m, H-1a), 4.19 (1H, app d, m, H-1b), 3.83-3.80 (1H, m, H-5'), 3.80-3.78 (1H, m, H-3a), 3.60-3.58 (1H, m, H-3b), 3.19-3.17 (1H, m, H-6'a), 3.12-3.11 (1H, m, H-6'b), 2.34 (3H, s, SOCH₃), 2.32-2.30 (4H, m, α -metilene degli acili), 2.07 (3H, s, OAc), 2.05 (3H, s, OAc), 2.02-2.00 (4H, m, protoni allilici), 1.99 (3H, s, OAc), 1.61-1.59 (4H, m, β -metilene degli acili), 1.37-1.23 (48H, m, protoni alifatici), 0.91-0.88 (6H, sovrapposti, 2CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 172.7, 172.6 (C, carboni degli esteri acilici), 130.1 (2CH, metini olefinici), 95.8 (CH, C1'), 70.6 (CH, C4'), 70.7 (CH, C2'), 69.7 (CH, C3'), 69.4 (CH, C2), 66.1 (CH₂, C3), 62.0 (CH₂, C1), 34.1, 34.0 (CH₂, α -metilene degli acili), 30.5 (CH₃, metile del tioacetato), 29.7-29.1 (CH₂, metilene alifatici), 29.7 (CH₂, C6'), 27.8 (2CH₂, metilene allilici), 24.9, 24.7 (CH₂, β -metilene degli acili), 20.6, 20.5, 20.5 (CH₃, metili degli acetati), 14.1, 13.9 (CH₃, metili terminali degli acili); HRESIMS *m/z* calcolato per C₅₃H₉₂NaO₁₃S: 991.6156 trovato: 991.6159.

Composto 31a. Il Composto 30a (0.065 g, 0.066 mmoli) è stato sciolto in una miscela di acetato di potassio (0.032 g, 0.323 mmoli), H₂O₂ (0.161 mL) (34% p/v) e acido acetico (1.9 mL); tale miscela è stata posta sotto agitazione a 40 °C

per una notte intera e, dopo evaporazione sotto flusso d'azoto, è stata purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di cloroformio/metanolo per ottenere il composto **31a** (0.038 g, 0.038 mmoli, 58%) sottoforma di olio incolore; Rf (chloroform/methanol 9:1) = 0.32; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.41-5.39 (1H, m, H-3'), 5.23-5.21 (1H, m, H-2), 5.15 e 5.13 (ciascuno 1H, app d, H-1'), 5.01-4.99 (1H, m, H-4'), 4.93-4.91 (1H, m, H-2'), 4.33-4.31 (1H, m, H-1a), 4.27-4.25 (1H, m, H-1b), 4.26-4.24 (1H, m, H-5'), 3.72-3.70 (1H, m, H-3a), 3.64-3.62 (1H, m, H-3b), 3.23-3.21 (1H, m, H-6'a), 3.12-3.10 (1H, m, H-6'b), 2.31-2.29 (4H, m, α -metileni degli acili), 2.04 (6H, s, 2OAc), 1.99 (3H, s, OAc), 1.60-1.57 (4H, m, β -metileni degli acili portions), 1.37-1.23 (56H, m, protoni alifatici), 0.90-0.87 (6H, sovrapposti, 2 CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 172.7, 172.5 (C, carboni degli esteri acilici), 95.5 (CH, C1'), 70.9 (CH, C4'), 70.4 (CH, C3'), 70.3 (CH, C2), 70.2 (CH, C2'), 66.4 (CH_2 , C3), 62.9 (CH_2 , C1), 51.0 (CH_2 , C6'), 34.1, 34.0 (CH_2 , α -metileni degli acili), 29.9-29.4 (CH_2 , metileni alifatici), 24.9, 24.7 (CH_2 , β -metileni degli acili), 20.6, 20.5 (CH_3 , metili degli acetati), 14.0, 13.8 (CH_3 , metili terminali degli acili); HRESIMS m/z calcolato per $\text{C}_{51}\text{H}_{91}\text{NaO}_{15}\text{KS}$: 1037.5613; trovato: 1037.5616.

Composto 31b. Il Composto 30b (0.065 g, 0.066 mmoli) è stato sciolto in una miscela di acetato di potassio (0.032 g, 0.323 mmoli), H_2O_2 (0.161 mL) (34% p/v) e acido acetico (1.9 mL); tale miscela è stata posta sotto agitazione a 40 °C per una notte intera e, dopo evaporazione sotto flusso d'azoto, è stata purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di cloroformio/metanolo per ottenere il composto **31b** (0.031 g, 0.031 mmoli, 47%) sottoforma di olio incolore; Rf (chloroform/methanol 9:1) = 0.32; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.41-5.39 (1H, m, H-3'), 5.38-5.36 (2H, m, protoni olefinici) 5.23-5.21 (1H, m, H-2), 5.15 e 5.13 (ciascuno 1H, app d, H-1'), 5.01-5.00 (1H, m, H-4'), 4.93-4.91 (1H, m, H-2'), 4.33-4.31 (1H, m, H-1a), 4.27-4.25 (1H, m, H-1b), 4.26-4.24 (1H, m, H-5'), 3.72-3.70 (1H, m, H-3a), 3.63-3.62 (1H, m, H-3b), 3.23-3.21 (1H, m, H-6'a), 3.11-3.10 (1H, m, H-6'b), 2.31-2.29 (4H, m, α -metileni degli acili), 2.04 (6H, s, 2OAc), 2.03-2.00 (4H, m, protoni allilici), 1.99 (3H, s, OAc), 1.59-1.57 (4H, m, β -metileni degli acili portions), 1.37-1.23 (48H, m, protoni alifatici), 0.89-0.87 (6H, sovrapposti, 2 CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 172.7, 172.6 (C, carboni degli esteri acilici), 130.2 (2CH, metini olefinici), 95.5 (CH, C1'), 70.9 (CH, C4'), 70.4 (CH, C3'), 70.3 (CH, C2), 70.2 (CH, C2'), 66.4 (CH_2 , C3), 62.9 (CH_2 , C1),

51.0 (CH₂, C6'), 34.1, 34.0 (CH₂, α-metileni degli acili), 29.9-29.4 (CH₂, metileni alifatici), 27.7 (2CH₂, metileni allilici), 24.9, 24.7 (CH₂, β-metileni degli acili), 20.6, 20.5 (CH₃, metili degli acetati), 14.1, 13.8 (CH₃, metili terminali degli acili); HRESIMS *m/z* calcolato per C₅₁H₈₉NaO₁₅KS: 1035.5457; trovato: 1035.5461.

Composto 32 (Figura 18). Al composto 31a (0.042 g, 0.042 mmoli), disciolto in una soluzione di etanolo all'85% (4.7 mL), è stata aggiunta idrazina monoidrata (0.064 g, 1.28 mmoli); dopo 3 h in agitazione a 44 °C la miscela di reazione è stata evaporata sotto flusso di idrogeno e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di cloroformio/metanolo per ottenere il composto **32a** (0.027 g, 0.031 mmoli, 76%) sottoforma di un solido bianco, *mp* 87-92 °C; *R_f* (cloroformio/metanolo 7:3) = 0.15; IR (film liquido) ν_{\max} 3400, 2940, 2862, 1750, 1351, 1343 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5.35-5.33 (1H, m, H-2), 4.81 e 4.79 (ciascuno 1H, app d, *J* = 3.3 Hz, H-1'), 4.55 e 4.48 (ciascuno 1H, dd, *J* = 12.2, 7.3 Hz, H-1a), 4.35 e 4.22 (ciascuno 1H, dd, *J* = 12.2, 6.6 Hz, H-1b), 4.15-4.13 (1H, m, H-4'), 4.11-4.08 (1H, m, H-5'), 4.08-4.06 (1H, m, H-3a), 3.69-3.67 (1H, m, H-3'), 3.67-3.65 (1H, m, H-3b), 3.46-3.44 (1H, m, H-2'), 3.12 (1H, dd, *J* = 9.3, 9.3 Hz, H-6'a), 2.95 (1H, dd, *J* = 14.4, 9.3 Hz, H-6'b), 2.38-2.34 (4H, m, α-metileni degli acili), 1.64-1.62 (4H, m, β-metileni degli acili), 1.39-1.27 (56H, m, protoni alifatici), 0.91-0.89 (6H, sovrapposti, 2CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 175.2, 174.9 (C, carboni degli esteri acilici), 99.1 (CH, C1'), 74.8 (CH, C4'), 74.1 (CH, C3'), 72.9 (CH, C2'), 70.8 (CH, C2), 66.4 (CH₂, C3), 63.1 (CH₂, C1), 53.8 (CH₂, C6'), 34.1, 34.0 (CH₂, α-metileni degli acili), 29.9-29.4 (CH₂, metileni alifatici), 24.9, 24.7 (CH₂, β-metileni degli acili), 14.0, 13.8 (CH₃, metili terminali degli acili); HRESIMS *m/z* calcolato per C₄₅H₈₅NaO₁₂KS: 911.5297; trovato: 911.5300.

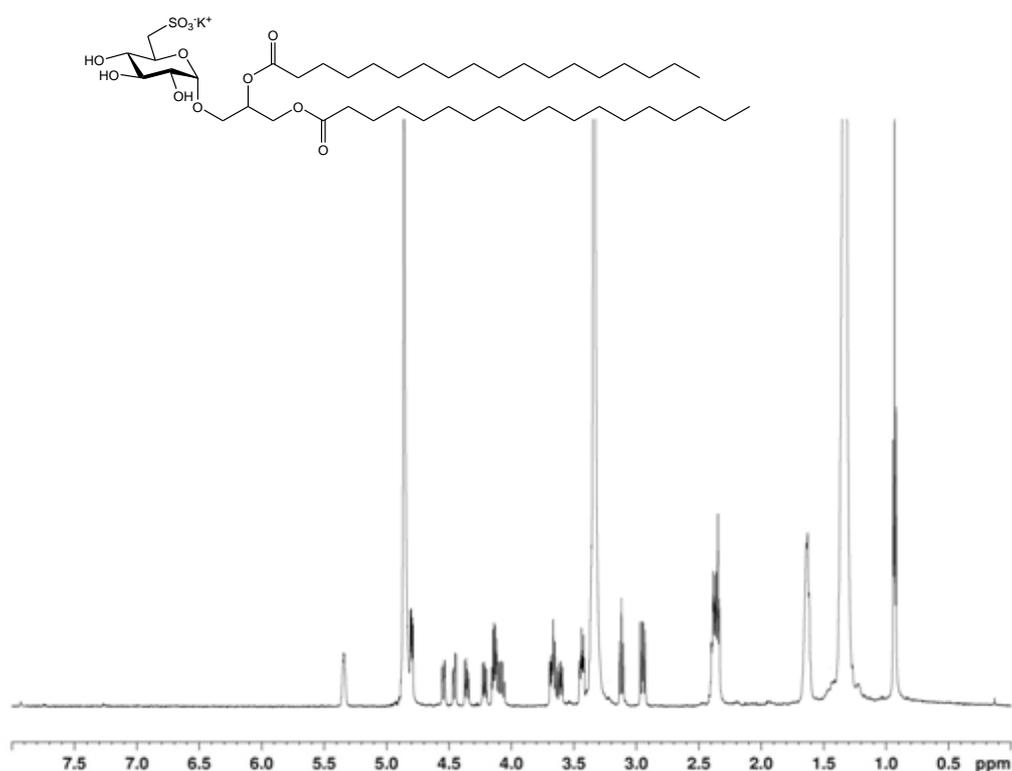


Figura 18. Spettro ^1H NMR del derivato **32a**.

Composto 32b. Al composto **31b** (0.042 g, 0.042 mmoli), disciolto in una soluzione di etanolo all'85% (4.7 mL), è stata aggiunta idrazina monoidrata (0.064 g, 1.28 mmoli); dopo 3 h in agitazione a 44 °C la miscela di reazione è stata evaporata sotto flusso di idrogeno e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di cloroformio/metanolo per ottenere il composto **32b** (0.026 g, 0.030 mmoli, 73%) sottoforma di un solido bianco, pf 92-98 °C; Rf (cloroformio/metanolo 7:3) = 0.15; IR (film liquido) ν_{max} 3400, 2940, 2829, 1750, 1352, 1340 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 5.39-5.36 (2H, m, protoni olefinici), 5.34-5.32 (1H, m, H-2), 4.81 e 4.79 (ciascuno 1H, app d, $J= 3.3$ Hz, H-1'), 4.36 (1H, dd, $J= 12.2, 7.3$ Hz, H-1a), 4.22 (1H, dd, $J= 12.2, 6.6$ Hz, H-1b), 4.15-4.13 (1H, m, H-4'), 4.11-4.09 (1H, m, H-5'), 4.08-4.06 (1H, m, H-3a), 3.69-3.67 (1H, m, H-3'), 3.67-3.65 (1H, m, H-3b), 3.46-3.44 (1H, m, H-2'), 3.12 (1H, dd, $J= 9.3, 9.3$ Hz, H-6'a), 2.95 (1H, dd, $J= 14.4, 9.3$ Hz, H-6'b), 2.36-2.32 (4H, m, α -metileni degli acili), 2.03-2.01 (4H, m, protoni allilici), 1.65-1.62 (4H, m, β -metileni degli acili), 1.39-1.27 (48H, m, protoni alifatici), 0.90-0.88 (6H, sovrapposti, 2 CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz,

CD₃OD): δ 175.1, 174.9 (C, carboni degli esteri acilici), 130.5 (2CH, metini olefinici), 99.1 (CH, C1'), 74.8 (CH, C4'), 74.1 (CH, C3'), 72.9 (CH, C2'), 70.8 (CH, C2), 66.4 (CH₂, C3), 63.1 (CH₂, C1), 53.7 (CH₂, C6'), 34.1, 34.0 (CH₂, α -metileni degli acili), 29.9-29.4 (CH₂, metileni alifatici), 27.6 (2CH₂, metileni allilici), 24.9, 24.7 (CH₂, β -metileni degli acili), 14.1, 13.8 (CH₃, metili terminali degli acili); HRESIMS m/z calcolato per C₄₅H₈₃NaO₁₂KS: 909.5140; trovato: 909.5144.

6.3. β -6'-Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli

6.3.1. *Procedure generali.* Spettri 1D e 2D-NMR sono stati registrati su un Bruker Avance-400 (400,13 MHz) e su un Bruker DRX-600, dotato di un TXI CryoProbe, in CDCl_3 (valori δ sono riferiti a $\text{CHCl}_3 = 7,26$ ppm) e gli spettri ^{13}C NMR sono stati registrati su un Bruker DPX-300 (75,47 MHz) (δ valori sono riferiti a $\text{CDCl}_3 = 77,0$ ppm). HRESIMS sono state condotte su un Micromass Q-TOF Micro. Piastre TLC (Kieselgel 60 F_{254}) e gel di silice in polvere (Kieselgel 60, 0,063-0,200 mm) sono stati acquistati da Merck. Tutti i reagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich e utilizzati senza ulteriore purificazione. Tutti gli intermedi sintetici sono stati caratterizzati mediante analisi NMR.

6.3.2. *Procedure sintetiche e dati spettrali.*

1,2-O-Isopropiliden glicerolo. Il glicerolo (2,0 g, 0,022 moli) è stato disciolto in N, N-dimetilformammide (4 mL) e sono stati aggiunti 2,2-dimetossi propano (4 mL) e acido p-toluensolfonico (300 mg). Dopo agitazione per una notte a temperatura ambiente, la miscela è stata ripartita tra acqua e diclorometano; la fase organica è stata purificata mediante cromatografia su gel di silice usando come gradiente etere di petrolio/etere etilico per ottenere il glicerolo 1,2-O-isopropilidene (2,0 g, 0,015 moli, 68%) sottoforma di olio incolore; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4.24 (1H, m, H-2), 4.09 (1H, dd, $J = 6.7, 8.5$ Hz, H-3a), 3.82 (1H, dd, $J = 6.4, 8.5$ Hz, H-3b), 3.65 (2H, m, H₂-1), 1.46 (3H, s, CH_3), 1.40 (3H, s, CH_3); HRESIMS m/z calcolato per $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3\text{Na}$: 155.0684; trovato: 155.0689.

Composto 33. Al D-glucosio (1.00 g, 0.0056 moli), sciolto in piridina (13 mL) è stata aggiunta anidride acetica (5 mL); La miscela di reazione è stata posta in agitazione per 3 h a temperatura ambiente e, dopo ripartizione tra acqua e cloroformio, la fase organica è stata evaporata a pressione ridotta e purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **33**, (2.10 g, 0.0054 moli, 96%) sottoforma di olio giallo. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.32 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-1', α -anomero), 5.71 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-1', β -anomero), 5.46 (1H, dd, $J = 9.7, 9.7$ Hz, H-4'), 5.12 (1H, m, H-2'), 5.11 (1H, m, H-3'), 4.29 (1H, m, H-5'), 4.26 (1H, dd, $J = 6.37, 11.1$ Hz, H-6'a), 4.11 (1H, dd, $J = 6.7, 11.1$ Hz, H-6'b), 2.17-2.00 (15H, m, 5OAc); HRESIMS m/z calcolato per $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\text{Na}$: 413.1060; trovato: 413.1064.

Composto 34: Al composto 33 (1.00 g, 0.0026 moli), sciolto in tetraidrofurano (10 mL) sono stati aggiunti 1.5 equivalenti di benzilammina; la miscela di reazione posta in agitazione una notte intera a temperatura ambiente è stata successivamente ripartita tra acqua e cloroformio, la fase organica è stata evaporata a pressione ridotta e purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **34** (0.66 g, 0.0019 moli, 73%). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.36 (1H, app t, *J*= 9.8 Hz, H-3'), 5.26 (1H, m, H-4'), 4.90 (1H, app t, *J*= 9.4 Hz, H-2'), 4.70 (1H, d, *J*= 3.1 Hz, H-1', α-anomero), 4.62 (1H, d, *J*= 8.1 Hz, H-1', β-anomero), 4.13-4.06 (2H, sovrapposti, H-5', H-6'a) 3.93 (1H, app d, *J*= 10.9, H-6'b), 1.91 (1H, s, OAc), 1.86 (1H, s, OAc), 1.84 (1H, s, OAc); HRESIMS *m/z* calcolato per C₁₄H₂₀O₁₀Na: 371.0954; trovato: 371.0958.

Composto 35: Al composto 34 (0.66 g, 0.0019 moli), sciolto in diclorometano anidro (6 mL); sono stati aggiunti 10 equivalenti di tricloroacetone nitrile, 0.2 equivalenti di 1,5-Diazabicyclo[5.4.0]undec-5-ene (DBU) e setacci molecolari attivati 3 Å; la miscela di reazione è stata posta in agitazione per 2 h a 0 °C e, dopo evaporazione a pressione ridotta, purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di n-esano/acetato di etile per ottenere il composto **35** (0.78 g, 0.0016 moli, 82%) sottoforma di olio giallo. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.56 (1H, d, *J*= 3.8 Hz, H-1'), 5.57 (1H, dd, *J*= 9.2, 9.2 Hz, H-3'), 5.18 (1H, dd, *J*= 9.2, 9.2 Hz, H-4'), 5.14 (1H, dd, *J*= 3.5, 9.2 Hz, H-2'), 4.28 (1H, m, H-6'a), 4.26 (1H, m, H-5'), 4.13 (1H, m, H₂-6'b), 2.09-2.01 (12H, sovrapposti, 4OAc); HRESIMS *m/z* calcolato per C₁₆H₂₀Cl₃NO₁₀Na: 514.0050; trovato: 514.0047.

Composto 36: Il composto 35 (0,74 g, 0,0015 moli) è stato disciolto in diclorometano anidro (6 mL) e sono stati aggiunti 1,5 equivalenti di 1,2-O-isopropilidenglicerolo glicerolo; la miscela di reazione è stata mantenuta sotto flusso di argon a -20 °C con setacci molecolari attivati 3 Å, quindi è stato aggiunto trifluoruro di boro eterato (81 µL, 0,66 mmol). Dopo 2 h in agitazione c'è stata un'altra aggiunta di boro trifluoruro eterato (81 µL, 0,66 mmol), e la temperatura è stata portata a -10 °C; la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per una notte a questa temperatura. Dopo neutralizzazione con trietilammina (130 µL), la miscela è stata filtrata su celite, evaporata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su gel di silice usando un gradiente di etere di petrolio etere/etere etilico per ottenere il composto **36** (0.55 g, 0.0012

moli, 80%). I dati spettroscopici misurati sono stati identici a quelli presenti in letteratura (Janwitayanuchit et al., 2003). HRESIMS m/z calcolato per $C_{20}H_{30}O_{12}Na$: 485.1635; trovato: 485.1639.

Composto 37: Al composto 36 (0.55 g, 0.0012 moli), sciolto in acetonitrile (8 mL), sono stati aggiunti 5 equivalenti di nitrato di zinco esaidrato; la miscela di reazione è stata riscaldata fino a 50°C e lasciata in agitazione per 6 h. Dopo evaporazione a pressione ridotta del solvente organico, la miscela è stata ripartita tra acqua e cloroformio e la fase organica è stata evaporata e purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **37** (0.38 g, 0.0009 moli, 75%). I dati spettroscopici misurati sono stati identici a quelli presenti in letteratura (Janwitayanuchit et al., 2003). HRESIMS m/z calcolato per $C_{17}H_{26}O_{12}Na$: 445.1322; trovato: 445.1319.

Composto 38: Al composto 37 (0.21 g, 0.0005 moli), sciolto in diclorometano anidro (5 mL), sono stati aggiunti sotto argon acido stearico (0.29 g, 0.0010 moli), diciolesilcarbodiimide (0.204 g, 0.0010 moli) e DMAP (0.012 g, 0.00010 moli); la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione una notte intera a temperatura ambiente, dopodiché è stata evaporata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **38** (0.438 g, 0.00046 moli, 92%). I dati spettroscopici misurati sono stati identici a quelli presenti in letteratura (Janwitayanuchit et al., 2003). HRESIMS m/z calcolato per $C_{53}H_{94}O_{14}Na$: 977.6541; trovato: 965.6545.

Composto 39: Al composto 38 (0.438 g, 0.00046 moli), sciolto in una soluzione acquosa di etanolo all'85% (8 mL) è stata aggiunta idrazina monoidrata (0.276 g, 0.0055 moli); la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per 6 h a 44 °C e, dopo evaporazione sotto flusso d'azoto, purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di cloroformio/metanolo per ottenere il composto **39** (0.318 g, 0.00040 moli, 88%). I dati spettroscopici misurati sono stati identici a quelli presenti in letteratura (Janwitayanuchit et al., 2003). HRESIMS m/z calcolato per $C_{45}H_{86}O_{10}Na$: 809.6119; trovato: 809.6116.

Composto 40. Composto 39 (0.318 g, 0.00040 moli) è stato sciolto in piridina (4 mL); e vi sono stati aggiunti 1,6 equivalenti di cloruro tritile (0.178 g, 0.64 mmoli) e 0,4 equivalenti di DMAP (19 mg, 0.16 mmoli); la miscela di reazione

è stata agitata per 3 ore a 60 °C e, successivamente, è stata aggiunta anidride acetica (3 ml). Dopo agitazione per una notte, la miscela è stata evaporata sotto flusso di azoto e purificata mediante cromatografia su gel di silice usando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **40** (0.288 g, 0.25 mmoli, 63%); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.47-7.18 (15H, m, protoni tritilici), 5.23 (1H, m, H-2), 5.15 (1H, m, H-4'), 5.14 (1H, m, H-3'), 5.05 (1H, m, H-2'), 4.54 (1H, d, *J*= 7.7 Hz, H-1'), 4.34 (1H, dd, *J*= 4.1, 12.0 Hz, H-1a), 4.13 (1H, dd, *J*= 5.9, 12.0 Hz, H-1b), 4.03 (1H, dd, *J*= 4.9, 11.1 Hz, H-3a), 3.74 (1H, dd, *J*= 5.1, 11.1 Hz, H-3b), 3.55 (1H, m, H-5'), 3.27 (1H, app d, *J*= 10.2 Hz, H-6'a), 3.09 (1H, dd, *J*= 2.3, 10.2, H-6'b), 2.31 (2H, t, *J*= 7.5 Hz, α-metilene dell'acile) 2.16 (2H, t, *J*= 7.8 Hz, α-metilene dell'acile), 1.54 (4H, m, β-metilene degli acili), 1.28-1.15 (metilene alifatici), 0.86 (6H, t, *J*= 7.0 Hz, 2CH₃); HRESIMS *m/z* calcolato per C₇₀H₁₀₆NaO₁₃: 1177.7531; trovato: 1177.7535.

Composto 41. Il Composto 40 (0.124 g, 0.108 mmoli) è stato sciolto in una soluzione di iodio e metanolo (5 mL, 2%); dopo 30 min a 60 °C in agitazione, la miscela di reazione è stata concentrata e purificata mediante cromatografia su gel di silice usando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **41** (0.081g, 0.089 mmoli, 82%) sottoforma di olio giallo; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.31-5.28 (2H, sovrapposti, H-2, H-3'), 5.08-5.00 (2H, m, H-2', H-4'), 4.61 (1H, d, *J*= 7.8 Hz, H-1'), 4.36 (1H, m, H-1a), 4.16 (1H, m, H-1b), 3.92 (1H, m, H-3a), 3.78 (1H, m, H-3b), 3.74 (1H, m, H-6'a), 3.60 (1H, m, H-6'b), 3.54 (1H, m, H-5'), 2.41-2.29 (4H, m, α-metilene degli acili), 2.10-2.01 (9H, m, 3 OAc), 1.62-1.52 (4H, m, β-metilene degli acili), 1.33-1.15 (metilene alifatici) 0.90 (6H, t, *J*= 7.0 Hz, 2CH₃); HRESIMS *m/z* calcolato per C₅₁H₉₂NaO₁₃: 935.6436; trovato: 935.6441.

Composto 42. Al composto 41 (0.081g, 0.089 mmoli), sciolto in piridina anidra (3 mL), sono stati aggiunti cloruro di p-toluensolfonile (0.169 g, 0.888 mmoli) e DMAP (0.010 g, 0.089 mmoli) a 0 °C. La miscela è stata lasciata in agitazione sotto argon una notte intera a temperatura ambiente. Dopo evaporazione sotto flusso di azoto, la miscela di reazione è stata purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **42** (0.076 g, 0.071 mmoli, 80%) sottoforma di olio giallo chiaro; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.77 (2H, d, *J*= 8.3 Hz, metini aromatici), 7.34 (2H, d, *J*= 8.3 Hz, metini aromatici), 5.18-5.13 (2H, sovrapposti, H-2, H-3'),

4.96-4.89 (2H, m, H-2', H-4'), 4.48 (1H, d, $J= 7.9$ Hz, H-1'), 4.26 (1H, m, H-1a), 4.08-4.01 (3H, sovrapposti, H-1b, H₂-6'), 3.87 (1H, dd, $J= 5.1, 10.8$ Hz, H-3a), 3.61 (1H, dd, $J= 5.4, 10.8$ Hz, H-3b), 2.44 (3H, s, metile aromatico), 2.31-2.28 (4H, m, α -metileni dell'acile), 2.04-1.97 (9H, m, 3OAc), 1.60-1.54 (4H, m, β -metileni degli acili), 1.39-1.23 (protoni alifatici), 0.91-0.87 (6H, sovrapposti, 2CH₃); HRESIMS m/z calcolato per C₅₈H₉₈NaO₁₅S: 1089.6524; trovato: 1089.6527.

Composto 43. Al composto 42 (0.076 g, 0.071 mmoli), sciolto in 2-butanone (7 mL) è stato aggiunto tioacetato di potassio (0.021 g, 0.183 mmoli). La miscela è stata posta sotto agitazione per 2.5 h a 80 °C; evaporata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **43** (0.064 g, 0.066 mmoli, 93%) sottoforma di olio incolore; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.18-5.14 (2H, sovrapposti, H-2, H-3'), 4.96-4.89 (2H, m, H-2', H-4'), 4.50 (1H, d, $J= 8.0$ Hz, H-1'), 4.28 (1H, dd, $J= 4.1, 11.8$ Hz, H-1a), 4.08 (1H, dd, $J= 5.7, 11.8$ Hz, H-1b), 3.91 (1H, dd, $J= 4.5, 11.1$ Hz, H-3a), 3.65 (1H, dd, $J= 5.4, 11.1$ Hz, H-3b), 3.62 (1H, m, H-5'), 3.24 (1H, app d, $J= 11.4$ Hz, H-6'a), 3.05 (1H, dd, $J= 2.4$ Hz, 11.4 Hz), 2.33-2.29 (4H, m, α -metileni degli acili), 2.13-1.98 (9H, m, 3 OAc), 1.64-1.57 (4H, m, β -metileni degli acili), 1.32-1.23 (protoni alifatici), 0.91-0.87 (6H, sovrapposti, 2CH₃); HRESIMS m/z calcolato per C₅₃H₉₄NaO₁₃S: 993.6313; trovato: 993.6308.

Composto 44. Il Composto 43 (0.064 g, 0.066 mmoli) è stato sciolto in una miscela di acetato di potassio (0.032 g, 0.323 mmoli), H₂O₂ (0.161 mL) (34% p/v) e acido acetico (1.9 mL); tale miscela è stata posta sotto agitazione a 40 °C per una notte intera e, dopo evaporazione sotto flusso d'azoto, è stata purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di cloroformio/metanolo per ottenere il composto **44** (0.044 g, 0.043 mmoli, 65%) sottoforma di olio incolore; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.27 (1H, m, H-2), 5.18 (1H, dd, $J= 8.9, 8.9$ Hz, H-3), 5.08-4.99 (2H, sovrapposti, H-2', H-4'), 4.68 (1H, d, $J= 7.3$ Hz, H-1'), 4.31 (1H, dd, $J= 5.1, 11.1$ Hz, H-1a), 4.15-4.06 (3H, sovrapposti, H-1b, H-3a, H-5'), 3.75 (1H, m, H-3b), 3.20 (2H, sovrapposti, H₂-6'), 2.33-2.28 (4H, m, α -metileni degli acili), 2.06-1.98 (9H, m, 3 OAc), 1.64-1.55 (4H, m, β -metileni degli acili), 1.34-1.22 (protoni alifatici), 0.91-0.88 (6H, sovrapposti, 2CH₃); HRESIMS m/z calcolato per C₅₁H₉₁NaO₁₅KS: 1037.5316; trovato: 1037.5321.

Composto 45 (Figura 19). Al composto 44 (0.044 g, 0.043 mmoli), disciolto in una soluzione di etanolo all'85% (4.7 mL), è stata aggiunta idrazina monoidrata (0.017 g, 0.361 mmol); dopo 3 h in agitazione a 44 °C la miscela di reazione è stata evaporata sotto flusso di idrogeno e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di cloroformio/metanolo per ottenere il composto **45** (0.030 g, 0.034 mmol, 80%) sottoforma di un solido bianco, pf 87-92 °C; Rf (cloroformio/metanolo 7:3) = 0.15; IR (film liquido) ν_{\max} 3400, 2940, 2862, 1750, 1351, 1343 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 5.29 (1H, m, H-2), 4.34 e 4.32 (ciascuno per 1H, d, 7.8 Hz, H-1'), 4.19 (1H, m, H-1a), 4.11 (1H, m, H-3a), 4.09 (1H, m, H-1b), 3.79-3.75 (3H, sovrapposti, H-3b, H-3', H-4'), 3.42 (1H, m, H-5'), 3.24 (1H, m, H-2'), 3.18 (1H, m, H-6'a), 2.98 (1H, m, H-6'b), 2.43-2.35 (4H, m, α -metileni degli acili), 1.69-1.58 (4H, m, β -metileni degli acili), 1.43-1.29 (protoni alifatici), 0.94 (6H, sovrapposti, 2 CH_3); HRESIMS m/z calcolato per $\text{C}_{45}\text{H}_{85}\text{NaO}_{12}\text{KS}$: 911.5297; trovato: 911.5300.

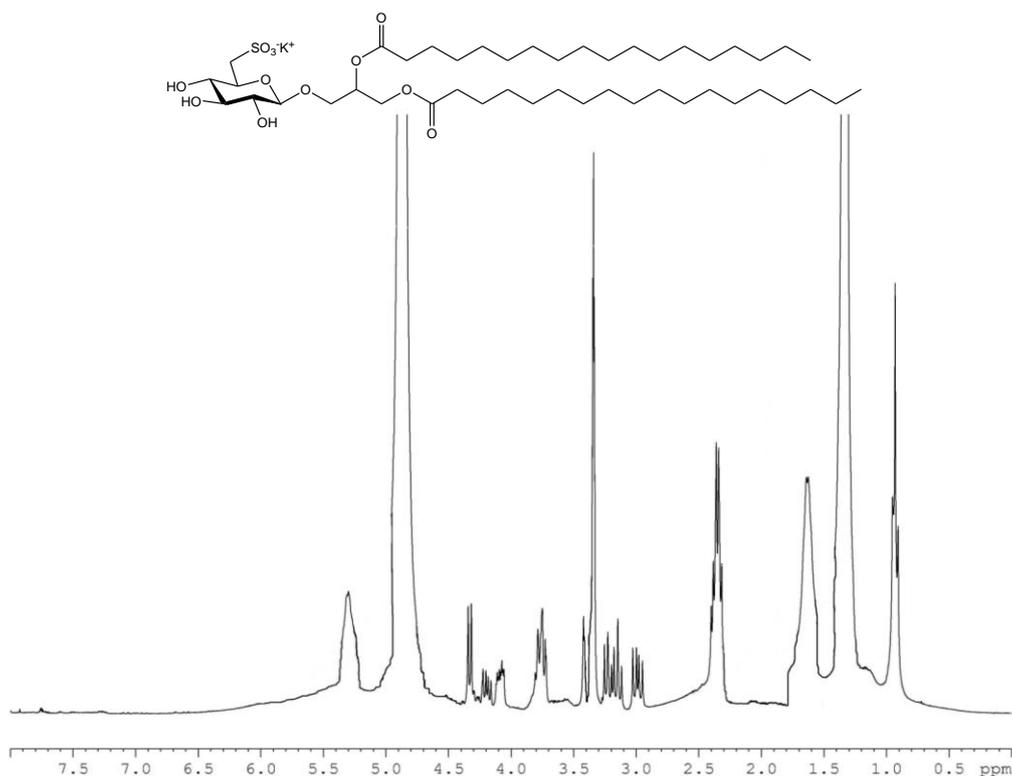


Figura 19. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del derivato **45**.

6.4. β -Glucosil- e β -Sulfochinovosil-1,2-O-diacilgliceroli diastereopuri

6.4.1. Procedure generali. Spettri 1D e 2D-NMR sono stati registrati su un Bruker Avance-400 (400,13 MHz) e su un Bruker DRX-600, dotato di un TXI CryoProbe, in CDCl_3 (valori δ sono riferiti a $\text{CHCl}_3 = 7,26$ ppm) e gli spettri ^{13}C NMR sono stati registrati su un Bruker DPX-300 (75,47 MHz) (δ valori sono riferiti a $\text{CDCl}_3 = 77,0$ ppm). HRESIMS sono state condotte su un Micromass Q-TOF Micro. Piastre TLC (Kieselgel 60 F₂₅₄) e gel di silice in polvere (Kieselgel 60, 0,063-0,200 mm) sono stati acquistati da Merck. Tutti i reagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich e utilizzati senza ulteriore purificazione. Tutti gli intermedi sintetici sono stati caratterizzati mediante analisi NMR.

6.4.2. Dati spettrali dei prodotti finali.

Composto 46 (Figura 20). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.24 (1H, m, H-2), 4.38 (1H, dd, $J= 2.5, 12.0$ Hz, H-1a), 4.29 (1H, d, $J= 7.5$ Hz, H-1'), 4.16 (1H, dd, $J= 6.7, 12.0$ Hz, H-1b), 3.88 (1H, dd, $J= 5.1, 10.6$ Hz, H-3a), 3.81 (2H, m, H₂-6'), 3.68 (1H, dd, $J= 6.9, 10.6$ Hz, H-3b), 3.55 (1H, app t, $J= 9.1$ Hz, H-3'), 3.49 (1H, app t, $J= 9.1$ Hz, H-4'), 3.34 (1H, bt, $J= 8.0$ Hz, H-2'), 3.29 (1H, m, H-5'), 2.28 (4H, sovrapposti, α -metileni degli acili), 1.65-1.52 (4H, sovrapposti, β -metileni degli acili), 1.33-1.19 (metileni alifatici), 0.86 (6H, app t, $J= 6.3$ Hz, 2CH₃); HRESIMS m/z calcolato per $\text{C}_{45}\text{H}_{86}\text{O}_{10}\text{Na}$: 809.6119; trovato: 809.6123.

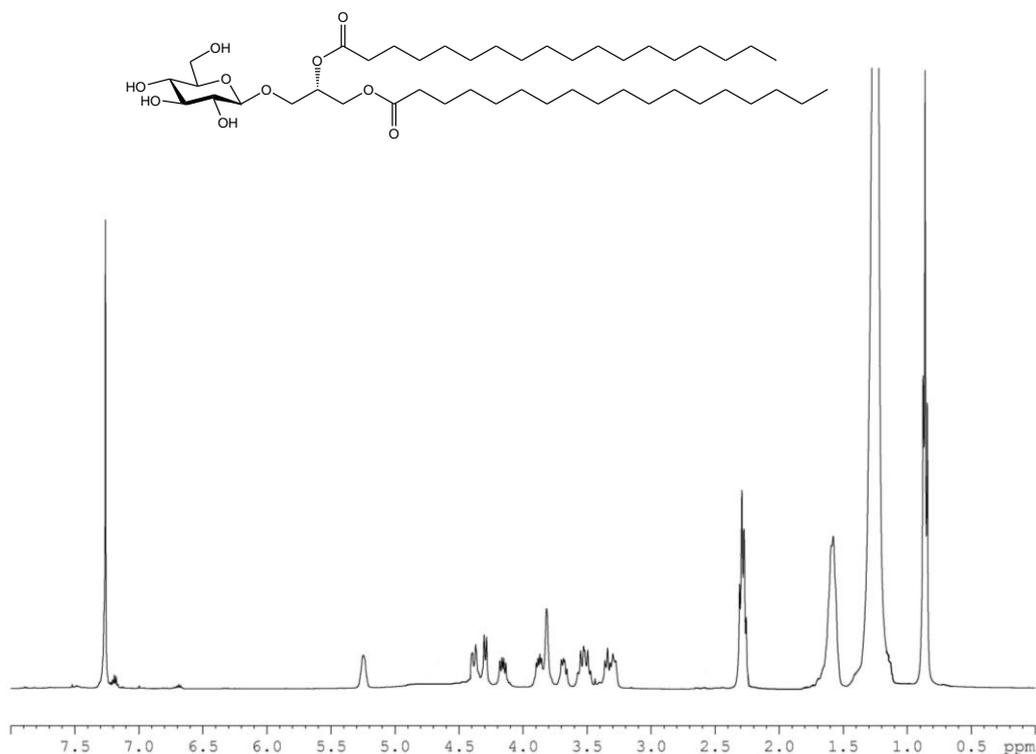


Figura 20. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del derivato **46**.

Composto 47 (Figura 21). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.13 (1H, m, H-2), 4.26 (1H, dd, $J= 2.7, 12.0$ Hz, H-1a), 4.18 (1H, d, $J= 7.5$ Hz, H-1'), 4.02 (1H, dd, $J= 6.7, 12.0$ Hz, H-1b), 3.79 (1H, dd, $J= 5.9, 11.0$ Hz, H-3a), 3.69 (2H, sovrapposti, H₂-6'), 3.59 (1H, dd, $J= 5.9, 11.0$ Hz, H-3b), 3.39 (1H, app t, $J= 8.9$ Hz, H-3'), 3.34 (1H, app t, $J= 8.9$ Hz, H-4'), 3.17-3.12 (2H, sovrapposti, H-2',H-5'), 2.18 (4H, sovrapposti, α -metilene degli acili), 1.50-1.43 (4H, sovrapposti, β -metilene degli acili), 1.19-1.10 (metilene alifatici), 0.75 (6H, app t, $J= 6.4$ Hz, 2CH₃); HRESIMS m/z calcolato per C₄₅H₈₆O₁₀Na: 809.6119; trovato: 809.6116

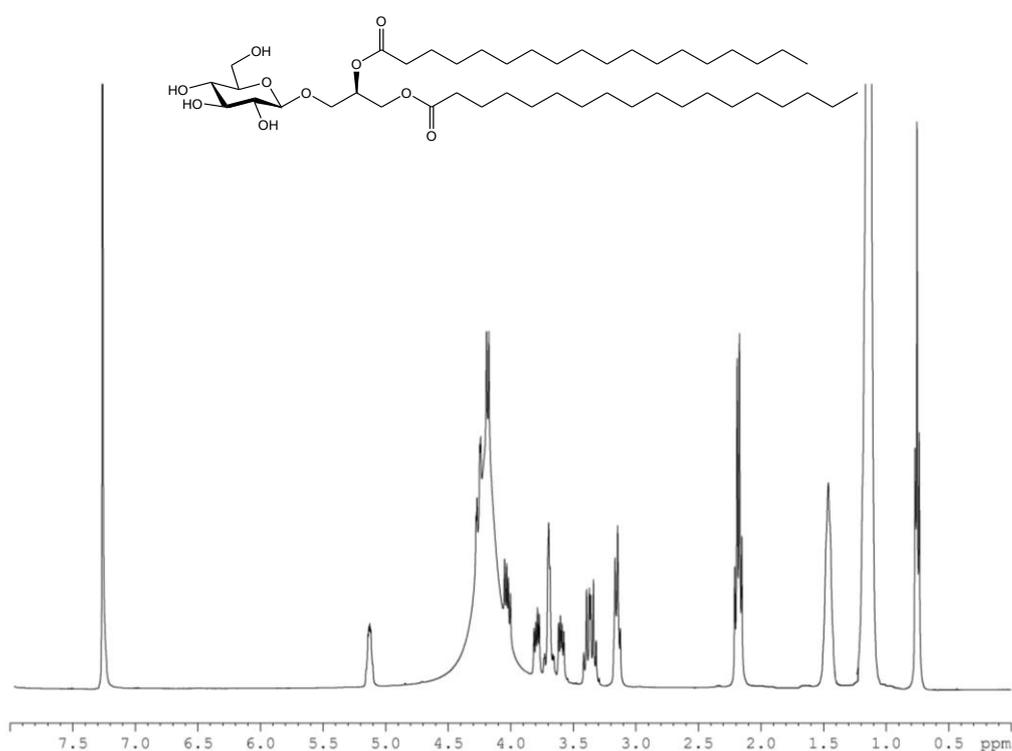


Figura 21. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del derivato **47**.

Composto 48 (Figura 22). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 5.28 (1H, m, H-2), 4.41 (1H, dd, $J= 2.7, 12.0$ Hz, H-1a), 4.31 (1H, d, $J= 7.6$ Hz, H-1'), 4.23 (1H, dd, $J= 6.9, 12.0$ Hz, H-1b), 4.02 (1H, dd, $J= 5.4, 11.0$ Hz, H-3a), 3.80-3.68 (3H, sovrapposti, H-3b, H-3', H-4'), 3.41 (1H, app t, $J= 8.9$ Hz, H-2'), 3.34 (1H, m, H-5'), 3.24 (1H, dd, $J= 7.6, 15.7$ Hz, H-6'a), 3.07 (1H, dd, $J= 7.2, 15.7$ Hz, H-6'b), 2.37-2.25 (4H, sovrapposti, α -metileni degli acili), 1.66-1.54 (4H, sovrapposti, β -metileni degli acili), 1.36-1.16 (metileni alifatici), 0.88 (6H, app t, $J= 6.0$ Hz, 2CH_3); HRESIMS m/z calcolato per $\text{C}_{45}\text{H}_{85}\text{NaO}_{12}\text{KS}$: 911.5297; trovato: 911.5300.

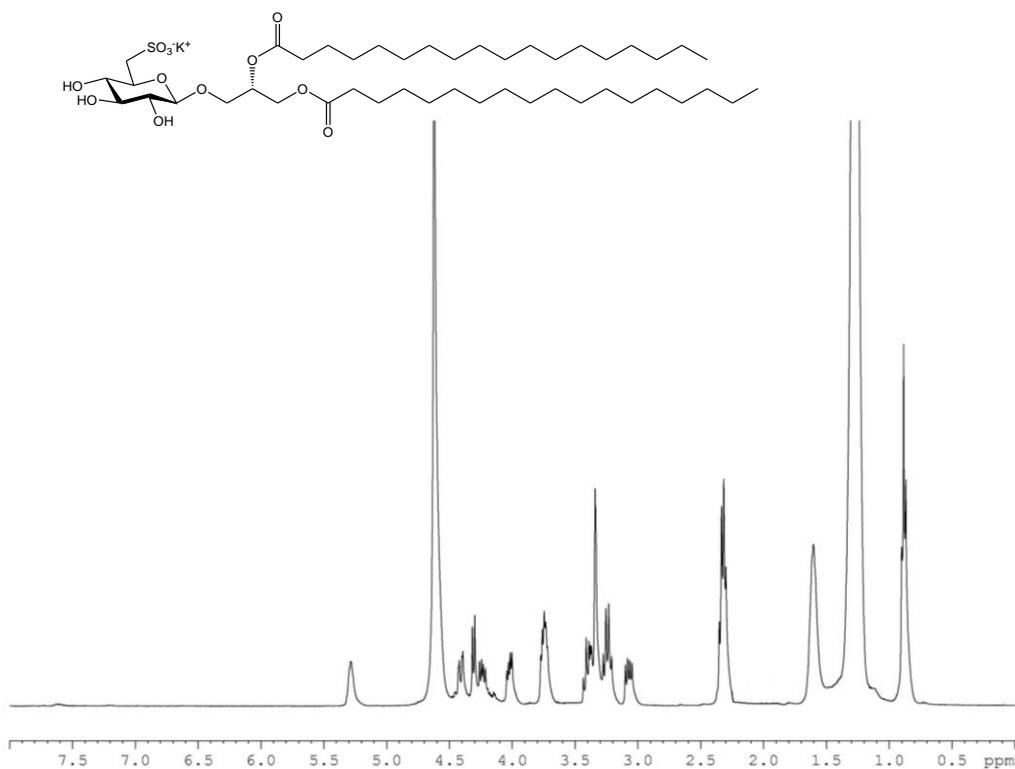


Figura 22. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del derivato **48**.

Composto 49 (Figura 23). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 5.24 (1H, m, H-2), 4.40 (1H, dd, $J= 2.6, 12.1$ Hz, H-1a), 4.27 (1H, d, $J= 7.7$ Hz, H-1'), 4.13 (1H, dd, $J= 6.7, 12.1$ Hz, H-1b), 3.98 (1H, dd, $J= 5.2, 11.1$ Hz, H-3a), 3.75-3.57 (3H, sovrapposti, H-3b, H-3', H-4'), 3.37 (1H, bt, $J= 8.7$ Hz, H-2'), 3.30 (1H, m, H-5'), 3.21 (1H, dd, $J= 7.7, 15.7$ Hz, H-6'a), 3.04 (1H, dd, $J= 7.2, 15.7$ Hz, H-6'b), 2.33-2.25 (4H, sovrapposti, α -metileni degli acili), 1.61-1.53 (4H, overlapped, β - metileni degli acili), 1.30-1.20 (metileni alifatici), 0.85 (6H, app t, $J= 6.9$ Hz, 2CH_3); HRESIMS m/z calcolato per $\text{C}_{45}\text{H}_{85}\text{NaO}_{12}\text{KS}$: 911.5297; trovato: 911.5303.

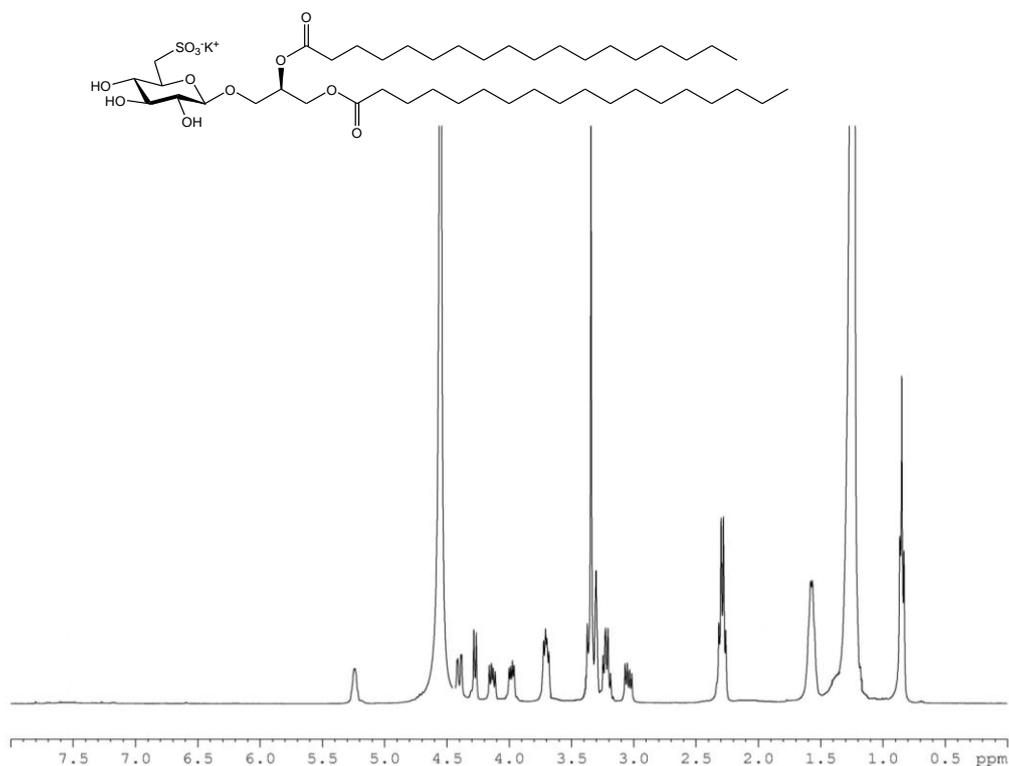


Figura 23. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del derivato **49**.

6.5. β -Galattosil- 1,2-O-diacilgliceroli fluorescenti

6.5.1. *Procedure generali.* Spettri 1D e 2D-NMR sono stati registrati su un Bruker Avance-400 (400,13 MHz) e su un Bruker DRX-600, dotato di un TXI CryoProbe, in CDCl_3 (valori δ sono riferiti a $\text{CHCl}_3= 7,26$ ppm) e gli spettri ^{13}C NMR sono stati registrati su un Bruker DPX-300 (75,47 MHz) (δ valori sono riferiti a $\text{CDCl}_3= 77,0$ ppm). HRESIMS sono state condotte su un micro Micromass Q-TOF. Piastre TLC (Kieselgel 60 F₂₅₄) e gel di silice in polvere (Kieselgel 60, 0,063-0,200 mm) sono stati acquistati da Merck. Tutti i reagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich e utilizzati senza ulteriore purificazione. Tutti gli intermedi sintetici sono stati caratterizzati mediante analisi NMR.

6.5.2. *Procedure sintetiche e dati spettrali.*

Metilestere dell'acido-6-amino-esanoico (53). L'acido 6-amino-esanoico (1.0 g, 0.0076 moli) è stato sciolto in una soluzione di acido cloridrico 2M in metanolo anidro (15 mL); la miscela di reazione è stata posta in agitazione per 2h a temperatura ambiente e evaporata a pressione ridotta per ottenere il metilestere dell'acido-6-amino-esanoico (**53**) (1.08 g, 0.0074 moli, 98%). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 3.61 (3H, s, OMe), 3.03-2.95 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.34-2.28 (2H, t, 6.9 Hz), 1.80-1.72 (2H, m), 1.68-1.57 (2H, m), 1.45-1.36 (2H, m); HRESIMS m/z calcolato per $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{Na}$, 168.1000; trovato:168.0995.

Metilestere dell'acido-6-pireneacetamido-esanoico. All'acido-1-pireneacetico acid (0.962 g, 0.0037 moli), sciolto in diclorometano anidro (6 mL), sono stati aggiunti il metilestere dell'acido-6-amino-esanoico (**53**) (0.504 g, 0.0037 moli), DCC (1.132 g, 0.0055 moli) and DMAP (0.44 g, 0.0037 moli); la miscela di reazione è stata posta in agitazione per una notte intera a 45 °C, evaporata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su gel di silice usando un gradiente di etere di petrolio/acetato di etile per ottenere il metilestere dell'acido 6-pireneacetamido-esanoico (0.988 g, 0.0025 mol, 69%). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 8.25-7.91 (9H, protoni aromatici), 4.31 (2H, s), 3.60 (3H, s, OMe), 3.12 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.10 (2H, t, $J= 6.8$ Hz), 1.49-1.40 (2H, m), 1.38-1.30 (2H, m), 1.18-1.09 (2H, m) HRESIMS m/z calcolato per $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{NO}_3\text{Na}$: 410.1732; trovato: 410.1736.

Acido-6-pireneacetamido-esanoico (54). Al metilestere dell'acido-6-pireneacetamido-esanoico (0.500 g, 0.0013 moli) sciolto in una soluzione

metanolo/acqua (3/1, 20 mL), è stato aggiunto carbonato di sodio fino alla saturazione; la miscela di reazione è stata lasciata a 65°C per 4h, evaporata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su gel di silice usando un gradiente di cloroformio/metanolo per ottenere il composto **54** (0.339 g, 0.00091 moli, 70%). ¹H-NMR (CD₃OD): δ 8.25-7.89 (9H, protoni aromatici), 4.24 (2H, s), 3.16 (2H, t, *J*= 6.9 Hz, CH₂-N), 2.18 (2H, t, 6.8 Hz), 1.54-1.47 (2H, m), 1.38-1.28 (2H, m), 1.24-1.17 (2H, m); HRESIMS *m/z* calcolato per C₂₄H₂₃NO₃Na: 396.1576; trovato: 396.1580.

Composto 55. All'1-β-D-[(2,2-dimetil-1,3-diossolano-4-il) metossi-2',3',4',6'-tetracetil]- galattosio (0.55 g, 0.0012 moli) sciolto in acetonitrile (8 mL) sono stati aggiunti 5 equivalenti di nitrato di zinco esaidrato; la miscela di reazione è stata posta in agitazione a 50 °C per 6 h; dopo evaporazione a pressione ridotta del solvente organico, the miscela è stata ripartita tra acqua e cloroformio e la fase organica è stata evaporata e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/acetato di etile per ottenere using il composto **55** (0.38 g, 0.0009 moli, 76%). I dati spettroscopici misurati sono stati identici a quelli presenti in letteratura (Janwitayanuchit et al., 2003). HRESIMS *m/z* calcolato per C₁₇H₂₆O₁₂Na: 445.1322; trovato: 445.1309.

Composto 56. Al composto **55** (0.325 g, 0.00077 moli), sciolto in diclorometano anidro (5 mL); sono stati aggiunti sotto argon il composto **54** (0.289 g, 0.00077 moli), dicicloesilcarbodiimide (0.188 g, 0.00092 moli) and DMAP (0.006 g, 0.00005 moli); la miscela di reazione è stata posta sotto agitazione una notte intera a temperatura ambiente; evaporata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **56** (0.559 g, 0.00072 moli, 93%). ¹H-NMR (CDCl₃): δ 8.25-7.92 (9H, protoni aromatici), 5.40 (1H, app s, H-4'), 5.21 (1H, m, H-2'), 5.03 (1H, m, H-3'), 4.50 e 4.48 (ciascuno 1H, d, *J*= 7.8 Hz, H-1'), 4.30 (2H, s, porzione fluorescente), 4.12 (2H, m, H₂-1), 4.09 (2H, m, H₂-6'), 3.94 (1H, m, H-2), 3.90 (1H, m, H-5'), 3.73 (1H, m, H-3a), 3.64 (1H, dd, *J*= 5.8, 10.8 Hz, H-3b), 3.15-3.09 (2H, m, CH₂-NH, porzione fluorescente), 2.18 (2H, sovrapposti, α-metilene dell'acile della porzione fluorescente), 2.18 (3H, s, OAc), 2.10-2.08 (6H, m, 2 OAc), 2.01 (3H, s, OAc), 1.48 (2H, β-metilene dell'acile della porzione fluorescente), 1.28 (2H, metilene dell'acile della porzione fluorescente), 1.10 (2H, metilene dell'acile della porzione fluorescente); ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ 173 (C, estere

acilico della porzione fluorescente), 170.9 (C, CONH della porzione fluorescente), 170.4, 170.0, 169.9, 169.4 (C, carboni degli acetati), 129.0–123.2 (CH, metini aromatici), 101.6 (CH, C1'), 71.8 (CH, C3), 70.6 (CH, C5'), 70.5 (CH, C3'), 68.4 (CH, C2), 68.5 (CH, C2'), 66.8 (CH, C4'), 64.6 (CH₂, C1), 61.2 (CH₂, C6'), 42.2 (CH₂, porzione fluorescente), 39.2 (CH₂NH, porzione fluorescente), 33.7 (CH₂, α-metilene dell'acile della porzione fluorescente), 24.2 (CH₂, β-metilene dell'acile della porzione fluorescente), 20.7–20.4 (CH₃, metili degli acetati), 28.9, 25.8, 24.2 (CH₂, metileni dell'acile della porzione fluorescente); HRESIMS *m/z* calcolato per C₄₁H₄₇NO₁₄Na: 800.2900; trovato:800.2906.

Composto 57. Al composto 56 (0.325 g, 0.00042 moli), sciolto in diclorometano anidro (5 mL), sono stati aggiunti sotto argon acido arachidonico (0.182 g, 0.0006 moli), dicitcloesilcarbodiimide (0.122 g, 0.0006 moli) and DMAP (0.007 g, 0.00006 moli); la miscela di reazione è stata posta in agitazione una notte intera a temperatura ambiente, evaporata a pressione ridotta e purificata tramite cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **57** (0.415 g, 0.00039 moli, 93%). ¹H-NMR (CDCl₃): δ 8.25–7.92 (9H, protoni aromatici), 5.40–5.32 (8H, m, protoni olefinici), 5.37 (1H, m, H-4'), 5.19–5.12 (2H, sovrapposti, H-2, H-2'), 5.01 (1H, m, H-3'), 4.48 e 4.46 (ciascuno 1H, d, *J*= 7.8 Hz, H-1'), 4.31 (2H, s, porzione fluorescente), 4.25 (1H, m, H-1a), 4.18 (2H, m, H₂-6'), 4.08 (1H, m, H-1b), 3.93 (1H, m, H-3a), 3.90 (1H, m, H-5'), 3.62 (1H, dd, *J*= 5.7, 10.8 Hz, H-3b), 3.17–3.10 (2H, q, *J*= 6.4 Hz, CH₂-NH, porzione fluorescente), 2.83–2.78 (6H, m, protoni bis-allilici), 2.31–2.28 (2H, t, *J*= 6.7 Hz, α-metilene dell'acile arachidonico), 2.16 (2H, sovrapposti, α-metilene dell'acile della porzione fluorescente), 2.14 (3H, s, OAc), 2.06 (4H, m, protoni allilici), 2.04–1.97 (9H, m, 3 OAc), 1.74–1.59 (sovrapposti, β-metileni degli acili e protoni alifatici), 1.39–1.04 (sovrapposti, metileni della porzione fluorescente e della catena arachidonica), 0.89 (6H, t, *J*= 7.1 Hz, 2CH₃); ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ 172.8 (C, estere acilico della porzione fluorescente), 172.3 (C, estere acilico della porzione arachidonica), 170.5 (C, CONH della porzione fluorescente), 171.7, 170.4, 170.0, 169.3 (C, carboni degli acetati), 129.0–127.0 (CH, metini vinilici), 101.1 (CH, C1'), 70.7 (CH, C5'), 70.5 (CH, C3'), 69.3 (CH, C2), 68.6 (CH, C2'), 67.4 (CH, C3), 66.7 (CH, C4'), 62.0 (CH₂, C1), 61.1 (CH₂, C6'), 41.9 (CH₂, porzione fluorescente), 39.2

(CH₂NH, porzione fluorescente), 33.5 (CH₂, α-metilene dell'acile della porzione fluorescente), 33.4 (CH₂, α-metilene dell'acile della porzione arachidonolica), 26.8 (CH₂, metileni allilici), 25.5 (CH₂, metileni bis-allilici), 25.3 (CH₂, β-metileni degli acili) 20.6-20.3 (CH₃, metili degli acetati), 29.6, 25.3, 24.7 (CH₂, metileni della porzione fluorescente); HRESIMS *m/z* calcolato per C₆₁H₇₇NO₁₅Na: 1086.5191; trovato: 1086.5186.

Composto 58. Al composto 55 (0.19 g, 0.00045 moli), sciolto in diclorometano anidro (5 mL); sono stati aggiunti sotto argon acido arachidonico (0.164 g, 0.00054 moli), dicioesilcarbodiimide (0.89 g, 0.00045 moli) and DMAP (0.012 g, 0.00010 moli); la miscela di reazione è stata posta sotto agitazione una notte intera a temperatura ambiente; evaporata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **58** (0.290 g, 0.00041 moli, 92%). ¹H-NMR (CDCl₃): δ 5.43-5.35 (8H, protoni olefinici), 5.40 (1H, m, H-4'), 5.22 (1H, m, H-2'), 5.03 (1H, m, H-3'), 4.52 e 4.50 (ciascuno 1H, d, *J*= 7.8 Hz, H-1'), 4.15 (2H, m, H₂-6'), 4.13 (2H, m, H₂-1), 3.94 (1H, m, H-2), 3.90 (1H, m, H-5'), 3.79 (1H, dd, *J*= 5.9, 10.6 Hz, H-3a), 3.68 (1H, m, H-3b), 2.87-2.81 (6H, m, protoni bis-allilici), 2.36 (2H, m, α-metilene dell'acile), 2.18 (3H, s, OAc), 2.08-2.05 (6H, s, 2 OAc), 2.11-2.06 (4H, m, protoni allilici), 1.99 (3H, s, OAc), 1.71-1.67 (m, protoni alifatici), 1.61 (2H, m, β-metilene dell'acile), 1.37-1.30 (m, protoni alifatici), 0.90 (3H, t, *J*= 7.1 Hz, CH₃); ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ 173.5 (C, estere acilico) 170.6, 170.1, 170.0, 169.4 (C, carboni degli acetati), 128.5–126.9 (CH, metini vinilici), 101.6 (CH, C1'), 71.7 (CH, C3), 70.8 (CH, C5'), 70.6 (CH, C3'), 70.1 (CH, C2), 68.6 (CH, C2'), 66.7 (CH, C4'), 64.9 (CH₂, C1), 61.1 (CH₂, C6'), 33.4 (CH₂, α-metilene dell'acile), 26.7 (CH₂, metileni allilici), 25.5 (CH₂, metileni bis-allilici), 25.4 (CH₂, β-metilene dell'acile), 20.7-20.4 (CH₃, metili degli acetati), 14.0 (CH₃); HRESIMS *m/z* calcolato per C₃₇H₅₆O₁₃Na: 731.3619; trovato:731.3622.

Composto 59. Al composto 58 (0.290 g, 0.00041 mol), sciolto in diclorometano anidro (5 mL); sono stati aggiunti sotto argon il composto 54 (0.223 g, 0.0006 moli), dicioesilcarbodiimide (0.122 g, 0.0006 moli) e DMAP (0.006 g, 0.00005 moli); la miscela di reazione è stata posta in agitazione per tutta la notte a temperatura ambiente, evaporata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di etere di petrolio/etere etilico per ottenere il composto **59** (0.389 g, 0.00038 moli, 93%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 8.25-7.92 (9H, protoni aromatici), 5.39-5.32 (8H, m, protoni olefinici), 5.36 (1H, m, H-4'), 5.15 (2H, sovrapposti, H-2, H-2'), 4.99 (1H, m, H-3'), 4.47 e 4.45 (ciascuno 1H, d, $J= 7.8$ Hz, H-1'), 4.26 (1H, m, H-1a), 4.15 (2H, m, H₂-6'), 4.09 (1H, m, H-1b), 3.93 (1H, m, H-3a), 3.90 (1H, m, H-5'), 3.63 (1H, m, H-3b), 3.15-3.10 (2H, q, $J= 6.5$ Hz, CH₂-NH, porzione fluorescente), 2.80 (6H, m, protoni bis-allilici), 2.29 (2H, m, α -metilene dell'acile della porzione arachidonoilica), 2.13 (3H, s, OAc), 2.09 (2H, sovrapposti, α -metilene dell'acile della porzione fluorescente), 2.06 (4H, sovrapposti, protoni allilici), 2.03 (3H, s, OAc), 2.02 (3H, s, OAc), 1.97 (3H, s, OAc), 1.72-1.59 (sovrapposti, β -metilene degli acili e protoni alifatici), 1.39-1.04 (sovrapposti, metilene delle porzioni fluorescente e arachidonoilica), 0.89 (6H, t, $J= 7.1$ Hz, 2CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 172.7 (C, estere acilico della porzione fluorescente), 172.3 (C, estere acilico della porzione arachidonoilica), 170.4 (C, CONH della porzione fluorescente), 171.6, 170.9, 170.1, 169.3 C, carboni degli acetati), 129.1-123.0 (CH, metilene aromatici e vinilici), 101.3 (CH, C1'), 70.7 (CH, C3'), 69.7 (CH, C2), 68.6 (CH, C2'), 66.9 (CH, C4'), 62.2 (CH₂, C1), 61.1 (CH₂, C6'), 42.1 (CH₂, porzione fluorescente), 39.3 (CH₂NH, porzione fluorescente), 33.4 (CH₂, α -metilene dell'acile della porzione fluorescente), 33.4 (CH₂, α -metilene dell'acile della porzione arachidonoilica), 25.6 (CH₂, metilene allilici), 24.9 (CH₂, metilene bisallilici), 24.9 (CH₂, β -metilene degli acili), 20.7-20.3 (CH₃, metilene degli acetati), 14.0 (CH₃), 29.6, 25.3, 24.7 (CH₂, metilene della porzione fluorescente); HRESIMS m/z calcolato per C₆₁H₇₇NO₁₅Na: 1086.5191; trovato: 1086.5186.

Composto 50 (Figura 24). Al composto 57 (0.415 g, 0.00039 moli), sciolto in una soluzione acquosa di etanolo all'85% (20 mL), è stata aggiunta idrazina monoidrata (123 μL , 0.00255 mol); la miscela di reazione è stata posta in agitazione per 2h e 30' a 45 °C, evaporata sotto flusso di azoto e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di cloroformio/metanolo per ottenere il composto **50** (0.081 g, 0.00009 moli, 23%). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 8.22-7.82 (9H, protoni aromatici), 5.42-5.30 (8H, m, protoni olefinici), 5.26 (1H, m, H-2), 4.31 (2H, s, porzione fluorescente), 4.30 (1H, m, H-1'), 4.16 (1H, dd, $J= 6.8, 11.4$ Hz, H-1a), 4.08 (1H, dd, $J= 6.8, 11.4$ Hz, H-1b), 3.96 (1H, m, H-4'), 3.89 (1H, m, H-3a), 3.81 (2H, m, H₂-6'), 3.74 (1H, m, H-3b), 3.65 (1H, m, H-2'), 3.56 (1H, m, H-5'), 3.50 (1H, m, H-

3'), 3.16-3.09 (2H, m, CH₂-NH della porzione fluorescente), 2.83-2.74 (6H, m, protoni bis-allilici), 2.32 (2H, t, *J*= 7.0 Hz, α-metilene dell'acile della porzione arachidonoilica), 2.17 (2H, m, α-metilene dell'acile della porzione fluorescente), 2.12-1.99 (4H, sovrapposti protoni allilici), 1.60 (4H, m, β-metilene degli acili), 1.48 (2H, metilene dell'acile della porzione fluorescente), 1.38-1.24 (protoni alifatici), 1.28 (2H, sovrapposti, metilene dell'acile della porzione fluorescente), 1.12 (2H, metilene dell'acile della porzione fluorescente), 0.89 (3H, t, *J*= 7.1 Hz, CH₃); ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ 173.3 (C, estere acilico della porzione arachidonoilica), 173.2 (C, estere acilico della porzione fluorescente), 171.1 (C, CONH della porzione fluorescente), 129.0–123.4 (CH, metini aromatici e vinilici), 103.6 (CH, C1'), 73.3 (CH, C3'), 71.6 (CH, C5'), 71.3 (CH, C2'), 69.9 (CH, C2), 69.0 (CH, C4'), 67.8 (CH, C3), 62.6 (CH₂, C1), 62.2 (CH₂, C6'), 42.0 (CH₂, porzione fluorescente), 39.4 (CH₂NH, porzione fluorescente), 34.1 (CH₂, α-metilene dell'acile della porzione arachidonoilica), 33.7 (CH₂, α-metilene dell'acile della porzione fluorescente), 26.9 (CH₂, metilene allilici), 25.6 (CH₂, metilene bis-allilici), 24.8 (CH₂, β-metilene degli acili), 28.9, 25.8, 24.3 (CH₂, metilene della porzione fluorescente), 14.0 (CH₃); HRESIMS *m/z* calcolato per C₅₃H₆₉NO₁₁Na: 918.4768; trovato: 918.4772.

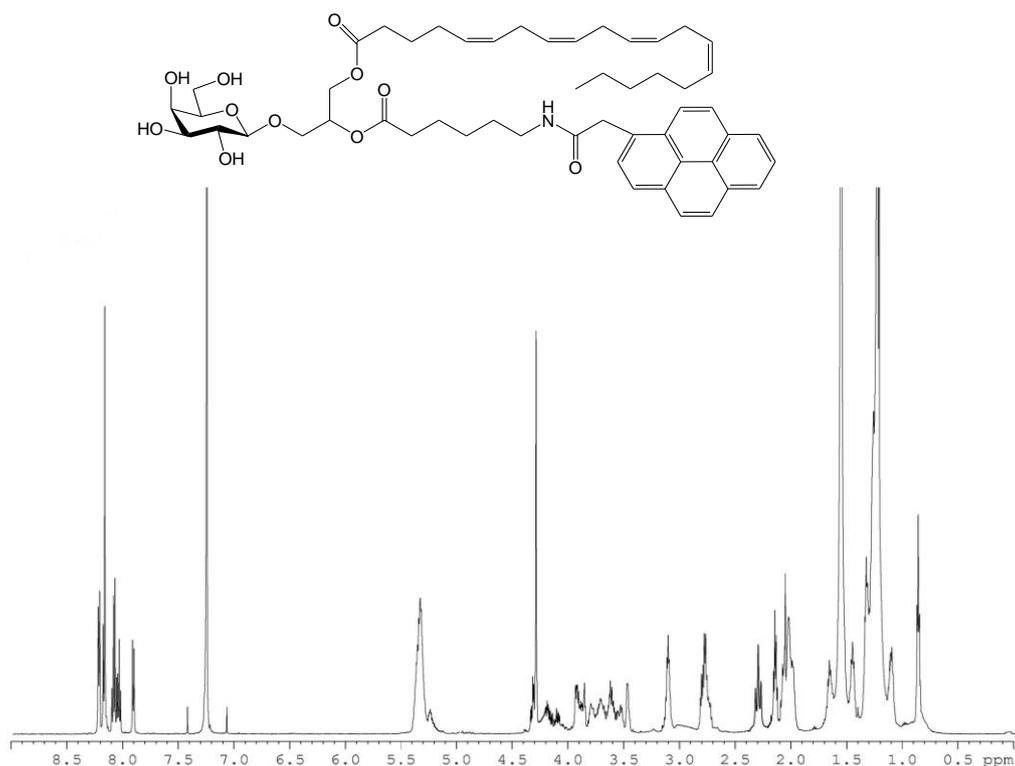


Figura 24. Spettro ^1H NMR del derivato **50**.

Composto 51 (Figura 25). Al composto **59** (0.389 g, 0.00037 moli), sciolto in una soluzione acquosa di etanolo all'85% (20 mL), è stata aggiunta idrazina monoidrata (117 μL , 0.00242 moli); la miscela di reazione è stata posta in agitazione per 2h e 30' a 45 °C, evaporata sotto flusso di azoto e purificata mediante cromatografia su gel di silice utilizzando un gradiente di cloroformio/metanolo per ottenere il composto **51** (0.082 g, 0.000092 mol, 25%). ^1H -NMR (CDCl_3): δ 8.28-7.87 (9H, protoni aromatici), 5.43-5.30 (8H, m, protoni olefinici), 5.29 (1H, m, H-2), 4.31 (2H, s, porzione fluorescente), 4.29 (1H, m, H-1'), 4.17 (1H, dd, $J= 6.8, 11.4$ Hz, H-1a), 4.08 (1H, dd, $J= 6.8, 11.4$ Hz, H-1b), 3.94 (1H, m, H-4'), 3.89 (1H, m, H-3a), 3.81 (2H, m, H₂-6'), 3.74 (1H, m, H-3b), 3.64 (1H, m, H-2'), 3.56 (1H, m, H-5'), 3.50 (1H, m, H-3'), 3.16-3.11 (2H, m, CH₂-NH, porzione fluorescente), 2.83-2.74 (6H, m, protoni bis-allilici), 2.31 (2H, t, $J= 6.9$ Hz, α -metilene dell'acile della porzione arachidonoilica), 2.20 (2H, m, α -metilene dell'acile della porzione fluorescente), 2.12-1.99 (4H, sovrapposti, protoni allilici), 1.60 (4H, m, β -metilene degli acili), 1.48 (2H, metilene dell'acile della porzione fluorescente),

1.38-1.24 (protoni alifatici), 1.28 (2H, sovrapposti, metilene dell'acile della porzione fluorescente), 1.21 (2H, metilene dell'acile della porzione fluorescente), 0.90 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH_3); ^{13}C -NMR (100MHz, CDCl_3): δ 173.2 (C, estere acilico della porzione arachidonoilica), 173.0 (C, estere acilico della porzione fluorescente), 171.4 (C, CONH della porzione fluorescente) 129.0-123.0 (CH, metini aromatici e vinilici), 103.4 (CH, $\text{C}1'$), 73.8 (CH, $\text{C}3'$), 71.9 (CH, $\text{C}5'$), 71.4 (CH, $\text{C}2'$), 70.0 (CH, $\text{C}2$), 69.1 (CH, $\text{C}4'$), 68.0 (CH, $\text{C}3$), 62.4 (CH_2 , $\text{C}6'$), 62.3 (CH_2 , $\text{C}1$), 41.8 (CH_2 , porzione fluorescente), 39.4 (CH_2NH , porzione fluorescente), 33.7 (CH_2 , α -metilene dell'acile della porzione fluorescente), 33.6 (CH_2 , α -metilene dell'acile della porzione arachidonoilica), 25.5 (CH_2 , metilene allilici), 25.3 (CH_2 , metilene bis-allilici), 24.5 (CH_2 , β -metilene degli acili), 25.9, 24.9, 24.4 (CH_2 , metilene della porzione fluorescente), 13.8 (CH_3); HRESIMS m/z calcolato per $\text{C}_{53}\text{H}_{69}\text{NO}_{11}\text{Na}$: 918.4768; trovato: 918.4772.

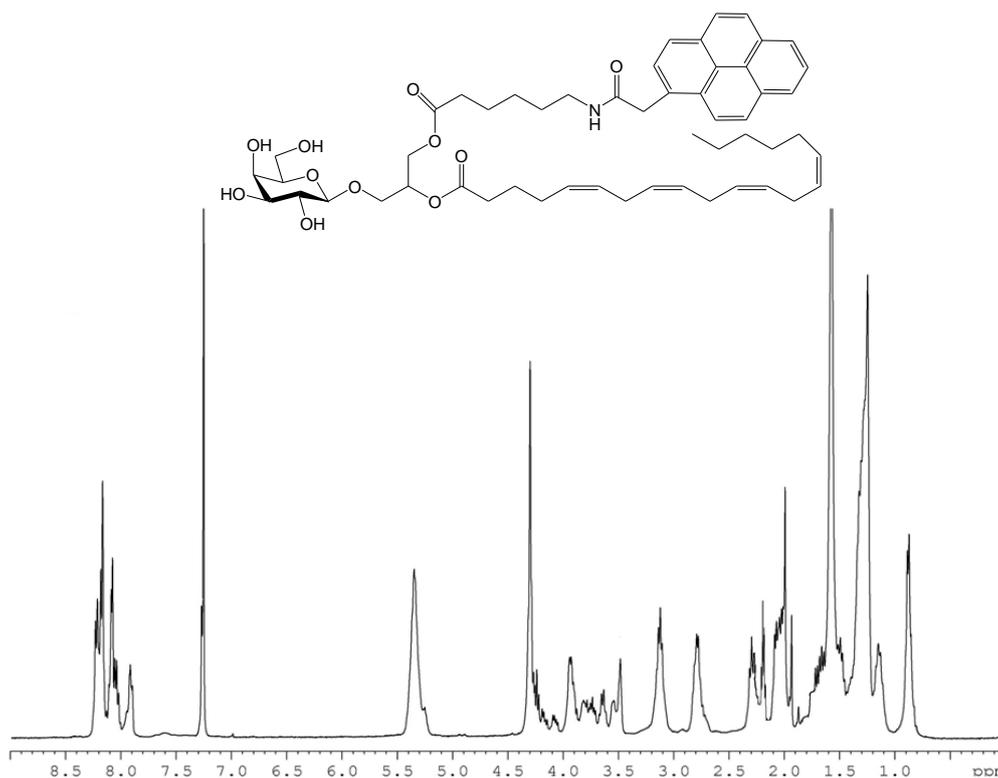


Figura 25. Spettro ^1H NMR del derivato **51**.

6.5.3. *Preparazione delle proteine e attività LAH di tuberi di patata.* Secondo la procedura presente in letteratura (Macrae et al., 1998), 0,2 Kg di tuberi di patata sono stati sospesi in 200 ml di soluzione tampone fosfato 0,025 M (pH= 7,0) contenente 1% di PVPP insolubile (polivinil polipirrolidone); la miscela è stata omogeneizzata con un frullatore e l'omogenato è stato filtrato attraverso un doppio strato di garza. Il filtrato è stato centrifugato a 10000 g per 30 minuti, è stato aggiunto solfato di ammonio al supernatante risultante per ottenere il 40% di saturazione; la miscela è stata mantenuta a 4 °C per 30 minuti e poi nuovamente centrifugata a 10000 g per 45 minuti a 4 °C. Il pellet è stato scartato ed è stato aggiunto ulteriormente solfato di ammonio al supernatante per raggiungere il 70 % di saturazione; la miscela è stata mantenuta a 4 °C per 30 minuti e poi è stata centrifugata a 10000 g per 45 minuti a 4 °C. Il pellet è stato recuperato e risospeso in 30 ml di tampone fosfato 0,025 M (pH 7,0), e *dializzata* con 18L dello stesso tampone per 24 ore a 5 °C per rimuovere il solfato di ammonio.

6.5.4. *Idrolisi enzimatica di sonde fluorescenti.* I composti **50** e **51** sono stati sciolti in una miscela di acetone/metanolo 2/1 (1 mg/50 µL) e dalle soluzioni risultanti 0,2 mg di composti 50 e 51 (10 µL) sono stati aggiunti separatamente a diverse aliquote di 1 mL di omogenato di patate. I composti sono stati incubati in 1 mL di tampone fosfato nelle stesse condizioni per escludere idrolisi spontanee. Contemporaneamente ad un'ulteriore millilitro di omogenato di patate è stata aggiunta una miscela di glicolipidi naturali isolati dalla marina diatomea *Skeletonema marinoi* seguendo la procedura descritta in letteratura (D'Ippolito et al., 2004). Dopo 1 ora di incubazione, la reazione è stata monitorata tramite cromatografia TLC a fase diretta (SiO₂) (eluente = cloroformio/metanolo/acqua 65/25/4) (**Figura 15c**) ed i risultati analizzati sotto la lampada UV a 365 nm. Gli omogenati sono stati estratti con 3,5 mL di CHCl₃/MeOH 60/40. La fase organica è stata nuovamente analizzata mediante TLC ed una piccola parte è stata metilata con diazometano ottenendo il FAME (miscela di metile steri di acidi grassi) per ulteriori verifiche dei risultati ottenuti mediante gas cromatografia-massa (GC-MS) (**Figura 26**).

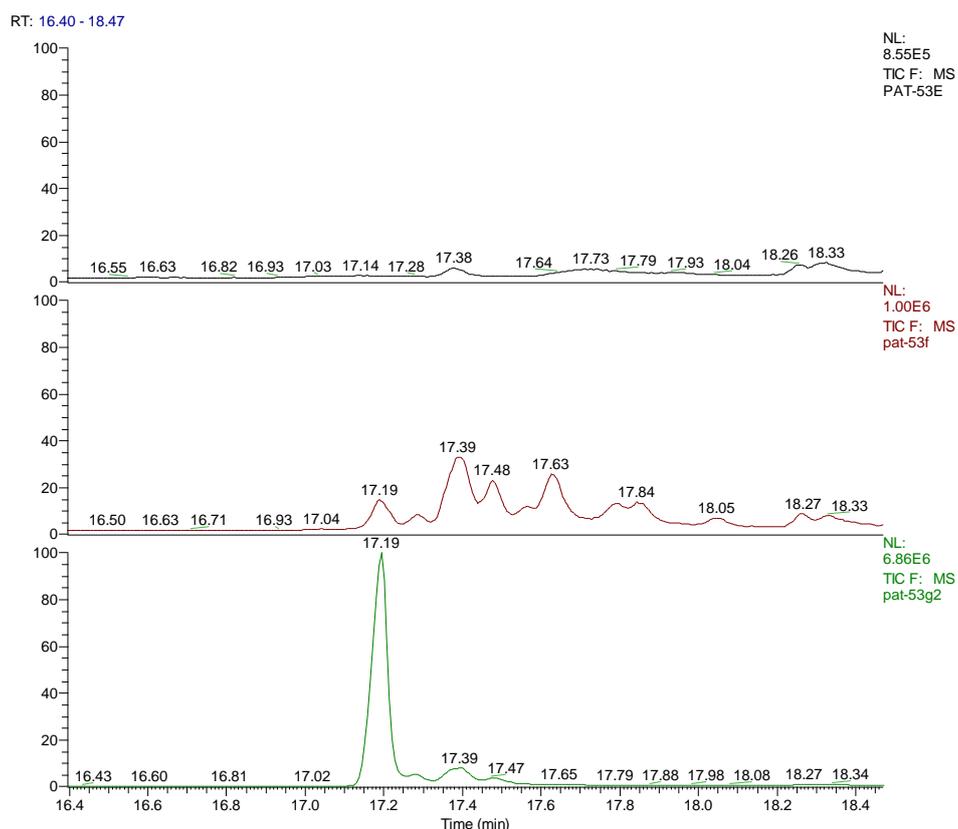


Figura 26. GC-MS cromatogramma dei FAME estratti degli omogenati incubati col composto **51** (in basso) e composto **50** (al centro). Omogenato di controllo (in alto). Il picco avente $R_t = 17.19$ corrisponde al metilestere dell'acido arachidonico.

Per caratterizzare le molecole formatesi in seguito all'idrolisi enzimatica, gli estratti organici derivanti dalle omogenati incubate con il composto **50** e **51** sono stati purificati mediante cromatografia su gel di silice usando un gradiente di cloroformio/metanolo, ottenendo il composto **60** (0,05 mg), caratterizzato mediante analisi NMR e MS; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 8.39-8.02 (9H, protoni aromatici), 4.31 (2H, s, metilene della porzione fluorescente), 4.25 (1H, d, $J=7.3$ Hz, H-1'), 4.13 (2H, m, H₂-1), 3.98 (1H, m, H-2), 3.84 (1H, app s, H-4'), 3.77 (1H, m, H-3a), 3.76 (2H, sovrapposti, H₂-6'), 3.71 (1H, m, H-3b), 3.70 (1H, m, H-2'), 3.56 (1H, m, H-5'), 3.51 (1H, m, H-3'), 3.24 (2H, t, $J=7.3$ Hz, N-metilene della porzione fluorescente), 2.26 (2H, t, $J=7.6$ Hz, α -metilene dell'acile della porzione fluorescente), 1.58 (2H, m, β -metilene dell'acile della porzione fluorescente), 1.53 (2H, m, metilene della porzione fluorescente), 1.31 (2H, m, metilene della porzione fluorescente); $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CD_3OD):

δ 174.1 (C, estere acilico della porzione fluorescente), 172.7 (C, CONH della porzione fluorescente), 129.1–124.5 (CH, metini aromatici), 105.2 (CH, C1'), 74.3 (CH, C3'), 74.0 (CH, C2'), 72.1 (CH, C5'), 70.5 (CH, C4'), 69.5 (CH, C2), 66.1 (CH₂, C1), 62.1 (CH₂, C6'), 62.0 (CH, C3), 41.5 (CH₂, porzione fluorescente), 40.3 (CH₂NH, porzione fluorescente), 34.7 (CH₂, α -metilene dell'acile della porzione fluorescente), 29.8, 27.0, 25.6 (CH₂, metileni della porzione fluorescente); HRESIMS m/z calcolato per C₃₃H₃₉NO₁₀Na: 632.2472; trovato: 632.2468.

6.5.5. *Analisi degli acidi grassi.* Le miscele di metilesteri di acidi grassi (FAME) sono state analizzate utilizzando un gascromatografo equipaggiato con uno spettrometro di massa (GC-fuoco Polaris Q). La temperatura di ingresso è stata mantenuta a 260 °C e i campioni sono stati iniettati in modalità *splitless*. Il forno a colonna è stato tenuto a 160 °C per 3 minuti, dopodichè la temperatura è stata innalzata da 160 a 260 °C a 5 °C/ min, e, successivamente, da 260 a 310 °C a 30°C/min e infine tenuto a questa temperatura per 5 min. L'elio è stato utilizzato come gas di trasporto in un flusso costante di 1,0 mL/min e il capillare di trasferimento è tenuto a 260 °C. L'energia di ionizzazione utilizzata era di 70 eV con la sorgente di ioni a 250 °C. L'acido erucico è stato usato come standard interno.

CAPITOLO 7

Conclusioni

Durante il mio corso di dottorato mi sono impegnato nella progettazione e nella realizzazione di metodiche sintetiche efficienti e versatili per l'ottenimento di glicoglicerolipidi immunogenici, realizzando in particolare la sintesi di β -monogalattosil- e β -monoglucosil- diacilgliceroli, α - e β - 6'-sulfochinovosil diacilgliceroli, β -6'-sulfochinovosil diacilgliceroli diastereopuri e β -monogalattosil diacilgliceroli fluorescenti.

Le metodiche approntate si sono rivelate particolarmente efficaci per raggiungere gli obiettivi prefissati. La strategia sintetica sviluppata ha consentito la preparazione di una serie di derivati glicoglicerolipidici differenti tra loro per la scelta della porzione zuccherina e/o della configurazione del legame glicosidico e/o della composizione delle catene aciliche ed infine anche della configurazione assoluta dello stereocentro in posizione 2 del glicerolo (**Figura 27**).

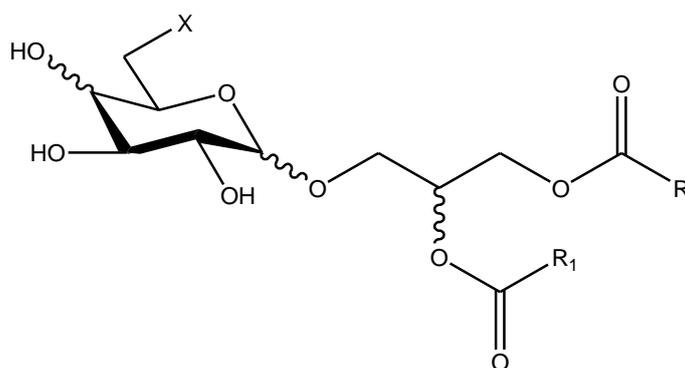


Figura 27. Struttura base dei glicoglicerolipidi sintetizzati

L'elevata versatilità, la riproducibilità e la semplicità del metodo hanno fatto sì che quasi tutti gli step siano stati realizzati attraverso operazioni di

preparazione e di purificazione dei prodotti non particolarmente complicate, conseguendo rese soddisfacenti per quasi tutti i derivati intermedi e finali.

L'unica eccezione è rappresentata dall'impiego dell' α -glucosidasi nella sintesi degli α -6'-sulfochinovosildiacilgliceroli, poiché, come noto, ricorrere ad approcci enzimatici non garantisce rese alte e le procedure associate all'utilizzo di enzimi risultano molto spesso complicate; tuttavia usufruire dell' α -glucosidasi proveniente dal mollusco marino *Aplysia fasciata* ha garantito la formazione del legame α -glicosidico con un'altissima stereoselettività.

Per quanto riguarda la sintesi di tutti i derivati β -glicoglicerolipidici abbiamo fatto ricorso all'impiego della metodica del tricloroacetimidato per la reazione di accoppiamento e a substrati peracetilati come molecole di partenza. Utilizzare gli acetili come gruppi protettori si è rivelata una scelta particolarmente felice poiché questi ultimi indirizzano l'attacco dell'aglicone allo zucchero in posizione equatoriale, garantendo alta stereoselettività nella formazione del legame β -glicosidico. Inoltre tali gruppi protettori sono rimossi mediante una reazione di idrazinolisi che salvaguarda la presenza di eventuali insaturazioni presenti sulle catene aciliche legate al glicerolo; permettendo di introdurre sul glicerolo catene aciliche sia sature che mono- o poli- insature.

Utilizzando le opportune condizioni sperimentali è possibile indirizzare l'introduzione delle catene aciliche ottenendo derivati regiopuri monoacilati o diacilati con catene a composizione mista. L'applicazione della metodica messa a punto consente di ottenere derivati stereopuri oltre che regiopuri dato che i requisiti richiesti per l'accoppiamento tra zucchero ed uno dei due enantiomeri puri dell'1,2-O-isopropilidenglicerolo (disponibili in commercio) consentono di ottenere diastereoisomeri puri in cui la configurazione del C-2 del glicerolo è stabilita già al momento della formazione del legame glicosidico, scongiurando

ipotesi di epimerizzazione di questo stereocentro che può avvenire utilizzando altre metodiche per l'accoppiamento. A dimostrazione di ciò è stata realizzata la sintesi stereospecifica dei β -glucosil- e β -6'-sulfochinovosil- diasteroil gliceroli diastereopuri.

La versatilità dell'approccio sintetico descritto è dimostrata ulteriormente dalla sintesi di un omologo fluorescente utile per studi di attività enzimatica cellulare.

Dai test farmacologici per la valutazione del potere immunomodulante è emerso in particolare che il β -6'Sulfochinovosil distearoilglicerolo ha stimolato una forte risposta anticorpale primaria nei topi attraverso immunizzazione sottocutanea. È stato molto interessante constatare come la produzione di anticorpi rilevata sia molto simile a quella innescata da formulazioni contenenti OVA insieme ad adiuvanti normalmente presenti nei vaccini terapeutici. Anche se dai risultati emersi dai saggi in vivo sui topi non è possibile ipotizzare alcun tipo di risposta negli esseri umani, è da notare che gli effetti specifici su IgG e IgM suggeriscono che i questi composti potrebbero rappresentare una nuova classe di adiuvanti per la preparazione di vaccini terapeutici.

Da un punto di vista chimico l'introduzione di acidi grassi saturi legati al glicerolo, la configurazione β del legame glicosidico e la presenza di un gruppo polare in posizione C-6 dello zucchero sembrano essere fattori determinanti per determinare l'attività stimolante di questi prodotti.

Ringraziamenti

Voglio ringraziare il mio tutor, il Dr. Emiliano Manzo per essere stato una guida sempre presente ed un punto di riferimento fondamentale durante questi tre anni di dottorato. La passione e l'abnegazione con le quali si dedica alla ricerca mi sono state di grande esempio e fonti di continua motivazione e il suo entusiasmo, l'allegria e la capacità di coinvolgere chi gli è intorno hanno reso semplice l'approccio ad un branca scientifica, quella della sintesi, così affascinante e allo stesso tempo complicata sin dai primi giorni in cui ho messo piede nel laboratorio. Le citate qualità sono accompagnate da importanti doti umane che fanno sì che Emiliano, oltre ad essere un eccellente ricercatore sia anche un'ottima persona alla quale sono profondamente e sinceramente grato per tutto.

Desidero ringraziare il mio tutor universitario, la Prof.ssa Maria Valeria D'Auria, la quale si è sempre dimostrata disponibile ogni qualvolta ho avuto bisogno del suo supporto ed ha speso sempre belle parole per me. Grazie al Dr. Angelo Fontana, il quale mi ha reso parte integrante di un progetto scientifico ambizioso ed affascinante ed ha scommesso sulla mia crescita scientifica, permettendomi di lavorare sempre in condizioni ottimali.

Un grazie al servizio NMR dell'ICB, in particolare alla Sig.ra Dominique Melck, al Sig. Vincenzo Mirra e al Dr. Alessandro Esposito, per la pazienza e la disponibilità nel registrare tutti gli spettri NMR, al Sig. Carmine Iodice per le misurazioni spettrofotometriche, al Sig. Maurizio Zampa per le analisi degli spettri di massa e al Sig. Francesco Castelluccio per gli innumerevoli supporti tecnici.

Grazie al Prof. Raffaele De Palma del Dipartimento di Medicina Interna della Seconda Università di Napoli ed i suoi collaboratori per i saggi farmacologici immunomodulanti in vitro ed in vivo, il cui contributo per lo sviluppo del progetto è dunque risultato essenziale.

Grazie al laboratorio di sintesi enzimatica dell'ICB ed in particolare alla Dott.ssa Tramice e al Dr. Trincone per aver contribuito in modo fondamentale alla riuscita della sintesi chemo-enzimatica.

Un grazie sentito va a tutte le persone che lavorano al CNR di Pozzuoli: dai tesisti ai tecnici più esperti, dai ragazzi del servizio portineria a quelli delle pulizie e della manutenzione, dall'amministrazione ai ricercatori e dottorandi tutti perché mi hanno fatto sentire a casa dal primo momento che ho messo piede in Istituto. In particolare, ringrazio affettuosamente coloro che hanno condiviso con me più tempo in laboratorio e mi hanno sopportato con infinita pazienza: la Dr.ssa Letizia Ciavatta, il Dr. Guido Villani, Jenny, Francesco, Rosa, Desirée, Fabiana e Anna.

Alla mia famiglia che mi sostiene sempre e con la quale continuerò a condividere tutti i miei successi va un grande e sentito grazie; senza di essa non potrei mai avere la forza giusta per affrontare le difficoltà piccole e grandi della vita.

A Maria Teresa va il mio più grande ringraziamento. Anche se durante questo mio percorso non è stato possibile stare sempre vicini fisicamente non mi ha mai fatto mancare sostegno ed amore, motivandomi quando necessario, tollerandomi con pazienza nei momenti difficili, gioiando con me per i buoni risultati conseguiti.

Grazie davvero a te che conosci i miei pregi ed i miei limiti meglio di me e che sai pizzicare le corde giuste della mia anima come nessun altro...

Grazie a te nonna che mi dicevi: “Fatt ‘e compiti!” dopo pranzo già dalla seconda elementare e che sei venuta a mancare nel corso di questi tre anni...Sarai sicuramente fiera di me.

A te che in tutto m'accompagni e in tutto t'accompagno....Forza Napoli!!!

Bibliografia

- Abbas, Lichtman, Pillai. *Immunologia cellulare e molecolare*. ELSEVIER, **2010**.
- Abbas, Lichtman, Pillai. *Immunologia cellulare e molecolare*. ELSEVIER, **2012**.
- Akira, S., Yamamoto, M., Takeda, K. *Biochem Soc Trans*. **2003**, 31, 637-642.
- Amara, S., Lafont, D., Fiorentino, B., Boullanger, P., Carriere, F., De Caro, A. *Biochim. Biophys. Acta*. **2009**, 1791, 983–990.
- Amprey, J.L., Im, J.S., Turco, S.J., Murray, H.W., Illarionov, P.A., Besra G.S., Porcelli S.A., Spath, G.F. *J Exp Med*. **2004**, 200, 895–904.
- Anderson, C., Pinsirodom, P., Parkin, K.L. *Journal of Food Biochemistry*. **2002**, 26, 63-74.
- Andreotti, G., Giordano, A., Tramice, A., Mollo, E., Trincone, A. *J. Biotechnol.* **2006**, 122, 274-284.
- Andrews, D.L, Beames, B., Summers, M.D., Park W.D. *Biochem J*. **1988**, 252, 199-206.
- Andrianasolo, E.H., Haramaty, L., Vardi, A., White, E., Lutz, R., Falkowski, P., *J Nat Prod*. **2008**, 71, 1197-1201.
- Awate, S., Babiuk, L.A., Mutwiri, G. *Frontiers in immunology*. **2013**, 4, 1-10.
- Barral, D.C., Brenner, M.B., *Nature*. **2007**, 12, 929-941.
- Bashkatova, A.I., Smirnova, V.N., Shvets, V.I.; Evstigneeva, R.P. *Zh. Org. Khim.* **1971**, 7, 1707–1714.
- Bashkatova, A.I., Smirnova, V.N., Volynskaya, V.N., Shvets, V.I., Evstigneeva, R.P. *Zh. Org. Khim.* **1973**, 9, 1422–1429.
- Bashkatova, A.I., Volynskayaya, V.N., Smirnova, V.N., Shvets, V.I., Evstigneeva, R.P. *Zh. Org. Khim.* **1972**, 8, 548–552.
- Batratkov, S.G., Il'ina, E.F., Panoysan, A.G. *Izvest. Akad. Nauk. SSSR, Ser Khim.* **1976**, 3, 626–632.
- Baulande, S., Langlois, C. *Medecine Science*. **2010**, 26, 177-84.
- Bendelac, A., Savage, P.B., Teyton, L. *Annu Rev Immunol*. **2007**, 25, 297–336.

- Benson, A.A., Daniel, H., Wisner, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1959**, 45, 1582-1587.
- Berge, J.P., Debiton, E., Dumay, J., Durand, P., Barthomeuf, C. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 6227-6232.
- Bevan, M.J. *Nature Immunology*. **2006**, 7, 363-365.
- Blumberg, R.S., Terhorst, C., Bleicher, P., McDermott, F.V., Allan, C.H., Landau, S.B., Trier, J.S., Balk, S.P. *J. Immunol.* **1991**, 147, 2518-2524.
- Boldyrev, I.A., Molotkovsky, J.G. *Russian Journal of biorg. Chem.* **2006**, 32, 78-83.
- Borisov, S.M., Wolfbeis, O.S. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 423-461.
- Brigl, M., Brenner, M.B.. *Annu Rev Immunol.* **2004**, 22, 817-890.
- Brossay, L., Chioda, M., Burdin, N., Koezuka, Y., Casorati, G., Dellabona, P., Kronenberg, M. *JEM.* **1998**, 188, 1521.
- Burrell, L.S., White, J.L., Hem, S.L. *Vaccine.* **2000**, 18, 2188-2192.
- Calabi, F., Jarvis, J.M., Martin, L., Milstein, C. *Eur. J. Immunol.* **1989**, 19, 285-292.
- Cateni, F., Bonivento, P., Procida, G., Zacchigna, M., Gabrielli Favretto, L., Scialino, G., Banfi, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 210-221.
- Cateni, F., Bonivento, P., Procida, G., Zacchigna, M., Scialino, G., Banfi, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 1971-1978.
- Cedergren, R.A., Hollingsworth, R.I. *J. Lipid Res.* **1994**, 35, 1452-1461.
- Chalfant, C.E., Spiegel, S. *J. Cell Sci.* 2005, 118, 4605-4612.
- Chen, J., Profit, A.A., Prestwitch, G.D. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 6305-6312.
- Chen, J., Zhang, Y.H., Wang, L.K., Steven, J.S., Angela, M.S., Sidney, M.H., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1998**, 2769-2770.
- Chevanne, M. *Appunti di patologia generale.* **2004**, 83-105.
- Colombo, D., Franchini, L., Toma, L., Ronchetti, F., Nakabe, N., Konoshima, T., Nishino, H., Tokuda, H., *Eur.J.Med.Chem.* **2005**, 40, 69-74.
- Colombo, D., Scala, A., Taiano, I.M., Toma, L., Ronchetti, F., Tokuda, H., Nishino, H., Sakakibara, J., *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **1996**, 6, 1187-1190.
- Cox, J.C., Coulter, A.R. *Vaccine.* **1997**, 15, 248-256.

- D'Ippolito, G., Tucci, S., Cutignano, A., Romano, G., Cimino, G., Miralto, A., Fontana, A. *BBA*. **2004**, 1686, 100–107.
- Davies, W.H., Mercer, F.I., Goodwin, T.W. *Phytochemistry*. **1965**, 4, 741-749.
- Davis, B.G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1999**, 1, 3215-3237.
- De Libero, G. *Science*. **2004**, 303, 485-486.
- De Libero, G., Mori, L., *Nature Reviews Immunology*. **2005**, 5, 485-96.
- Demchenko, A.V. *Synlett*. **2003**, 1225-1240.
- Deng, J.Z., Shelley, R.S., Sidney, M.H., *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1624-1626.
- Deng, J.Z., Sun, D.A., Shelley, R.S., Sidney, M.H., Ronald, L.C., John, R.E., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1999**, 1, 1147-1149.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R.C., Nishijima, M., Raetz, C.R.H., Shimizu, T., Spener, F., Van Meer, G., Wakelam, M.J.O., Dennis, E.A. *J Lipid Res.* **2009**. 50 Suppl, S9-14.
- Fernandez-Bolanos, J.G., Morales, J., Garcia, S., Dianez, M.J.; Estrada, M.D.; Lopez-Castro, A., Perez, S. *Carbohydr. Res.* **1993**, 248, 1-14.
- Fischer, K., Scotet, E., Niemeyer, M., Koebernick, H, Zerrahn, J., Maillet, S., Hurwitz, R., Kursar, M., Bonneville, M., Kaufmann, S.H.E., Schaible, U.E. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2004**, 101, 10685–10690.
- Fraser, C.K., Diener, K.R., Brown, M.P., Hayball, J.D. *Expert Rev. Vaccines*. **2007**, 6, 559–578.
- Gent, P.A., Gigg, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **1975**, 1521–1524.
- Gigg, R., Penglis, A.A.E., Conant, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **1980**, 2490-2493.
- Glenny, A.T., Pope, C.G., Waddington, H., Wallace, V. *J. Pathol. Bacteriol.* **1926**, 29, 38–45.
- Godfrey, D.I., Kronenberg M. *J Clin Invest.* **2004**, 114, 1379–1388.
- Godfrey, D.I., Macdonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., Van Kaer, L. *Nat Rev Immunol.* **2004**, 4, 231-237.
- Golik, J., Dickey, J.K., Todderud, G., Lee, D., Alford, J., Huang, S., Klohr, S., Eustice, D., Aruffo, A., Agler, M.L. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 387-389.
- Gordon, D.M., Danishefsky, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 659-663.
- Gouaze-Andersson, V., Cabot, M.C. *Biochim. Biophys. Acta.* **2006**, 1758, 2096–2103.

- Green, T.W., Wuts, P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis Eds. Wiley Intersciences.* **1999**, 207-215, 716-719.
- Grienerberger, E., Geoffroy, P., Mutterer, J., Legrand, M., Heitz, T. *Plant Signal. Behav.* **2010**, 5, 1181-1186.
- Gustafson, K.R., Cardellina II, J.H., Fuller, R.W., Weislow, O.S., Kiser, R.F., Snader, K.M., Patterson, G.M.L., Boyd, M.R. *J. Nat. Can. Inst.* **1989**, 81, 1254-1258.
- Guy, B. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, 5, 505-517.
- Hanashima, S., Mizushima, Y., Ohta, K., Yamazaki, T., Sugawara, F., Sakaguchi, K. *Jpn. J. Cancer Res.* **2000**, 91, 1073-1083.
- Hanashima, S., Mizushima, Y., Takayuki, Y., Keisuke, U., Takahashi, S., Koshino, Y., Sahara, H., Sakaguchi, K., Sugawara, F. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 46, 684.
- Hanashima, S., Mizushima, Y., Yamazaki, T., Ohta, K., Takahashi, S., Sahara, H., Sagakuchi, K., Sugawara, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 367-376.
- Heath, W.R., Carbone, F.R. *Nature Reviews Immunology.* **2001**, 1, 126-134.
- Herbert, W.J. *Immunology.* **1968**, 14, 301-318.
- Hinkovska-Galcheva, V. Boxer, L.A., Kindzelskii, A., Hiraoka, M., Abe, A., Goparju, S., Spiegel, S., Petty, H.R., Shayman, J.A., *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 26612-26621.
- Hla, T. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2004**, 15, 513-520.
- Hoebe, K., Janssen, E., Beutler, B. *Nat. Immunol.* **2004**, 5, 971-974.
- Hokin, M.R., Hokin, L.E. *J. Biol. Chem.* **1953**, 203, 967-977.
- Igarashi, K. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1977**, 34, 243-283.
- Ishiyama, H., Ishibashi, M., Ogawa, A., Yoshida, S., Kobayashi, J., *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 3831-3836.
- Jacob, J.S., Miller, K.R., *J. Cell. Biol.* **1986**, 103, 1337-1347.
- Janwitayanuchit, W., Sunwanborirux, K., Patarapanich, C., Pummangura, S., Lipipun, V., Vilaivan, T. *Phytochemistry.* **2003**, 64, 1253-1264.
- Jiang, Z., Du, Q. *Bioorg Med Chem Lett.* **2011**, 21, 1001-1003.
- Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee M.E., Kim, H.M., Paik, S.G., Lee, H., Lee, Y.O. *Cell.* **2007**, 130, 1071-1082.

- Kalinski, P., Hilkens, C.M.U., Wierenga, E.A., Kapsenberg, M.L. *Immunol. Today*. **1999**, 20, 561-567.
- Kaplum, A.P., Shvets, V.I., Evstigneeva, R.P. *Zh. Org. Khim.* **1977**, 13, 1483-1488.
- Kapsenberg, M.L., Hilkens, C.M.U., Wierenga, E.A., Kalinski, P., *Clin. Exp. Allergy*. **1999**, 29, 33-36.
- Kates, M. *Adv. Lipid Res.* **1970**, 8, 225-265.
- Kawai, T. *Nat Immunol.* **2010**, 11, 373-84.
- Kawano, T., Cui J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H., Taniguchi, M. *Science*. **1997**, 278, 1626-1629.
- Kinjo, Y., Illarionov, P., Vela, J.L., Pei, B., Girardi, E., Li, X., Li, Y., Imamura, M., Kaneko, Y., Okawara, A., Miyazaki, Y., Gomez-Velasco, A., Rogers, P., Dahesh, S., Uchiyama, S., Khurana, A., Kawahara, K., Yesilkaya, H., Andrew, P.W., Wong, C.H., Kawakami, K., Nizet, V., Besra, G.S., Tsuji, M., Zajonc, D.M., Kronenberg, M. *Nat. Immunol.* **2011**, 12, 966-974.
- Kinjo, Y., Tupin, E., Wu, D., Fujio, M., Garcia-Navarro R, Benhnia, M.R., Zajonc, D.M., Ben-Menachem, G., Ainge, G.D., Painter, G.F., Khurana, A., Hoebe, K., Behar, S.M., Beutler, B., Wilson, I.A., Tsuji, M., Sellati, T.J., Wong, C.H., Kronenberg, M. *Nat Immunol.* **2006**, 7, 978-986.
- Kinjo, Y., Wu, D., Kim, G., Xing, G.W., Poles, M.A., Ho, D.D., Tsuji, M., Kawahara, K., Wong, C.H., Kronenberg, M. *Nature*. **2005**, 434, 520-525.
- Kjer-Nielsen, L., Borg, N.A., Pellicci, D.G., Beddoe, T., Kostenko, L., Clements, C.S., Williamson, N.A., Smyth, M.J., Besra, G.S., Reid, H.H., Bharadwaj, M., Godfrey, D.I., Rossjohn, J., McCluskey, J. *J Exp Med.* **2006**, 203, 661-673.
- Koeller, K.M., Wong, C.H. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4465-4493.
- Koenigs, W., Knorr, E. *Ber. Dtsch.Chem.* **1970**, 103, 957-998.
- Kreuter, J. *J. Microencapsul.* **1988**, 5, 115-127.
- Kronenberg, M. *Annu Rev Immunol.* **2005**, 23, 877-900.
- Kronenberg, M., Rudensky, A. *Nature*. **2005**, 435, 598-604.
- Lafont, D., Carriere, F., Ferrato, F., Boullanger, P. *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 695-704.
- Lanzavecchia, A., Sallusto, F. *Science*. **2000**, 290, 92.
- Larsen, E., Kharazmi, A., Christensen, L.P., Christensen, S.B. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 994-995.

- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. *Cell*. **1996**, 86, 973-983.
- Liu, Y.-J., Kanzler, H., Soumelis, V., Gilliet, M. *Nature Immunol.* **2001**, 2, 585-589.
- Loya, S., Reshef, V., Mizrahi, E., Silberstein, C., Rachamin, Y., Carmeli, S., Hizi, A., *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 891-895.
- Ma, J., Shelley, R.S., Sidney, M.H., *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1660-1663.
- Macrae, A.R., Visicchio, J.E., Lanot, A. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1998**, 75, 1489-1494.
- Máñez, S., Recio, M.C., Gil, I., Gómez, C., Giner, R.M., Waterman, P.G., Ríos, J.L. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 601-604.
- Mannhalter, J.W., Neychev, H.O., Zlabinger, G.J., Ahmad, R., Eibl, M.M. *Clin. Exp. Immunol.* **1985**, 61, 143-151.
- Mannock, D., Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R.N. *Chem. Phys. Lipids*. **1987**, 43, 113-127.
- Mannock, D.A., Ruthven, N.A.H., McElhaney, L., McElhaney, R.N. *Chem. Phys. Lipids*. **1990**, 55, 309-321.
- Manzo, E., Ciavatta, M.L., Pagano, D., Fontana, A. *Tetrahedron Lett.* **2012 a**, 53, 879-881.
- Manzo, E., Tramice, A., Pagano, D., Trincone, A., Fontana, A. *Tetrahedron*. **2012 b**, 68, 10169-10175.
- Masaki, T., Tokuda, M., Ohnishi, M., Watanabe, S., Fujimura, T., Miyamoto, K., Itano, T., Matsui, H., Arima, K., Shirai, M., Maeba, T., Sogawa, K., Konishi, R., Taniguchi, K., Hatanaka, Y., Hatase, O., Nishioka, M. *Hepatology*. **1996**, 24, 72-81.
- Matos, A.R., D'Arcy-Lameta, A., Franca, M., Petres, S., Edelman, L., Kader, J., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.T. *FEBS Lett.* **2001**, 491, 188-192.
- Matos, A.R., Pham-Thi, A.T. *Plant Physiology and Biochemistry*. **2009**, 47, 491-503.
- Matsubara, K., Matsumoto, H., Mizushina, Y., Mori, M., Nakajima, N., Fuchigami, M., Yoshida, H., Hada, T., *Oncol.Rep.* **2005**, 14, 157-160.
- Matsuda, H., Hirayama, O. *Agric. Biol. Chem.* **1979**, 43, 697-703.
- Matsumoto, Y., Sahara, H., Fujita, T., Hanashima, S., Yamazaki, T., Takahashi, S., Sugawara, F., Mizushina, Y., Ohta, K., Takahashi, N., Jimbow, K., Sakaguchi, K., Sato, N. *Transplant. Proc.* **2000**, 32, 2051-2053.

- Matsumoto, Y., Sahara, H., Fujita, T., Shimozawa, K., Takenouchi, M., Torigoe, T., Hanashima, S., Yamazaki, T., Takahashi, S., Sugawara, F., Mizushina, Y., Ohta, K., Takahashi, N., Gasa, S., Jimbow, K., Sakaguchi, K., Sato, N. *Transplantation*. **2002**, 74, 261-267.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A. *Nature*. **1997**, 388, 394-397.
- Mitsutake, S., Kim, T.J., Inagaki, Y., Kato, M., Yamashita, T., Igarashi, Y. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 17570–17577.
- Mizushina, Y., Maeda, N., Kawasaki, M., Ichikawa, H., Murakami, C., Takemura, M., Xu, X., Sugawara, F., Fukumori, Y., Yoshida, H., Sakaguchi, K. *Lipids*. **2003**, 38, 1065-1074.
- Mizushina, Y., Watanabe, I., Ohta, K., Takemura, M., Sahara, M., Takahashi, N., Gasa, S., Sugawara, F., Matsukage, A., Yoshida, S., Sakaguchi, K., *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 55, 537-541.
- Molotkovsky, J.G., Mikhalyov, I.I., Imbs, A.B., Bergelson, L.D. *Chemistry and physics of lipids*. **1991**, 58, 199-212.
- Moser, M., Murphy, K.M. *Nature Immunol.* **2000**, 1,199.
- Murakami, C., Yamazaki, T., Hanashima, S., Takahashi, S., Ohta, K., Yoshida, H., Sugawara, F., Sakaguchi, K., Mizushina, Y. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, 403, 229-236.
- Murakami, C., Yamazaki, T., Hanashima, S., Takahashi, S., Takemura, M., Yoshida, S., Ohta, K., Yoshida, H., Sugawara, F., Sakaguchi, K., Mizushina, Y. *Biochim. Biophys. Acta.* **2003**, 1645, 72–80.
- Nagatsu, A., Watanabe, M., Ikemoto, K., Hashimoto, M., Murakami, N., Sakakibara, J., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A., Yazawa, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 41, 1619-1622.
- Nakano, H., Kiso, T., Okamoto, K., Tomita, T., Bin Abdul Manan, M., Kitahata, S.J. *Biosci. Bioeng.* **2003**, 95, 583-588.
- Nakato, K., Guo, C.T., Matsufuji, M., Yoshimoto, A., Inagaki, M., Higuchi, R., Suzuki, Y. *J. Biochem.* **2000**, 127, 191-198.
- Nishizuka, Y. *Science* **1992**, 258, 607–614.
- Obeid, L.M., Linardic, C M., Karolak, L.A., Hannun, Y.A. *Science*. **1993**, 259, 1769–1771
- Ohta, K., Mizushina, Y., Hirata, N., Takemura, M., Sugawara, F., Matsukage, A., Yoshida, S., Sakaguchi, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, 46, 684-686.
- Ohta, K., Mizushina, Y., Yamazaki, T., Hanashima, S., Sugawara, F., Sakaguchi, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 288, 893-900.
- Oshida, Y., Yamada, S., Matsunaga, K., Moriya, T., Ohizumi, Y., *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 534-536.

- Ota, M., Okamoto, T., Wakabayashi, H. *Carbohydr. Res.* **2009**, 344, 460-465.
- Park, K.H., Yoon, Y. J., Lee, S.G. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9737-9740.
- Paulsen, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1982**, 21, 155-224.
- Petrovsky, N., Aquilar, J.C. *Immunol. Cell. Bio.* **2004**, 82, 488-496.
- Porcelli, S.A. *Adv. Immunol.* **1995**, 59, 1-98.
- Quarantino, S., Duddy, L.P., Londei, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2000**, 97, 10911-10916.
- Radin, N.S., Shayman, J.A., Inokuchi, J.-I. *Adv. Lipid Res.* **1993**, 26, 183-211.
- Ramon, G. *Ann.Inst. Pasteur.* **1924**, 38, 1-10.
- Rasmussen, J.A.M., Hermetter, A. *Prog. Lip. Res.* **2008**, 47, 436-460.
- Reshef, V., Mizrachi, E., Maretzki, T., Silberstein, C., Loya, S., Hizi, A., Carmeli, S.J. *Nat. Prod.* **1997**, 60, 1251-1260.
- Reymond, J.L. *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions.* Ed. Wolf-Dieter Fessner and Threlif Anthonsen. **2009**, 1-19.
- Rissoan, M.-C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., De Waal Malefyt, R., Liu, Y.J. *Science.* **1999**, 283, 1183-1186.
- Rossjohn, J., Pellicci, D.G., Patel, O., Gapin, L., Godfrey, D.I. *Nature Reviews.* **2012**, 12, 845-857.
- Sahara, H., Ishikawa, M., Takahaschi, N., Ohtani, S., Sato, N., Gasa, S., Akino, T., Kikuchi, K., *J. Cancer.* **1997**, 75, 324-332.
- Sahsah, Y., Thi, A.T.P., Roy-Macaulev, H., Arcy-Lameta, A.; Reppelin, A.; ZuilyFodil, Y. *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, 1215, 66-73.
- Sanderson, J.P., Brennan, P.J., Mansour, S., Matulis, G., Patel, O., Lissin, N., Godfrey, D.I., Kawahara, K., Zähringer, U., Rossjohn, J., Brenner, M.B., Gadola, S.D. *Eur J Immunol.* **2013**, 43, 815-825.
- Sarka, M., Hana, D., Richard, H., Blanka, K. *Carbohydr. Res.* **1999**, 322, 209-218.
- Sasaki, G.L., Gorin, P.A.J., Tisher, C. A., Iacomini, M. *Glycobiology.* **2001**, 11, 345-351;
- Sawai, T., Hehere, E. J. *J. Biol. Chem.* **1962**, 2047-2052.
- Schmidt, R. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1986**, 25, 212-235
- Schmidt, R. R.; Michel, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1980**, 19, 731-732.

- Scott-Browne, J.P., Matsuda, J.L., Mallevaey, T., White, J., Borg, N.A., McCluskey, J., Rossjohn, J., Kappler, J., Marrack, P., Gapin, L. *Nat Immunol.* **2007**, 8, 1105–1113.
- Seki, Y.; Hayashi, K.; Matsumoto, A.; Seki, N.; Tsukada, J.; Ransom, J., Naka, T., Kishimoto, T., Yoshimura, A., Kubo, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 13003–13008.
- Serhan, C.N. Savill, J. *Nature Immunol.* **6**, **2005**, 1191–1197.
- Shah, J. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2005**, 43, 229-260.
- Shingu, Y., Nishida, Y., Dohi, H., Kobayashi, K. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 2518–2521.
- Shirahashi, H., Murakami, N., Watanabe, M., Nagatsu, A., Sakakibara, J., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A., *Chem.Pharm.Bull.*, **1993**, 41, 1664-1666.
- Shvets, V.I., Bashkatova, A. I., Evstigneeva, R. P. *Chem. Phys. Lipids.* **1973**, 3, 267–285.
- Sias, B., Ferrato, F., Grandval, P., Lafont, D., Boullanger, P., De Caro, A., Leboeuf, B., Verger, R., Carriere, F. *Biochemistry.* **2004**, 43, 10138–10148.
- Siskind, G.W., Benacerraf, B. *Adv. Immunol.* **1969**, 10, 1–50.
- Smith, E.R., Merrill, A.H., Obeid, L.M., Hannun, Y.A.. *Methods Enzymol.* **2000**, 312, 361–373.
- Sun, D.A., Deng, J.Z., Shelley, R.S., Sidney, M.H., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6120-6124.
- Takenaka, F., Uchiyama, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, 64, 1821-1826.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. *Immunity.* **1999**, 11, 443-451.
- Tokuda, H., Nishino, H., Shirahashi, H., Murakami, N., Nagatsu, A., Sakakibara, J. *Cancer Lett.* **1996**, 104, 91–95.
- Trincone, A., Giordano, A. *Curr. Org. Chem.* **2006**, 10, 1163-1193.
- Trincone, A., Tramice, A., Giordano, A., Andreotti, G. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **2008**, 25, 129-148.
- Tulloch, A. P., Heinz, F., Fisher, W. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1973**, 354, 879-889.
- Van Kaer, L., Joyce, S. *Curr Biol.* **2005**, 15, 429–431.
- Venable, M.E., Lee, J.Y., Smyth, M.J., Bielawska, A., Obeid, L.M. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 30701–30708.
- Vieira, P.L., De Jong, E.C., Wierenga, E.A., Kapsenberg, M.L., Kaliński, P. *J. Immunol.* **2000**, 164, 4507.

- Vijayasradhi, S., Singh, J., Aidhen, I.S. *Synlett.* **2000**, 110–112.
- Wahlstrom, J.L., Ronald, R.C. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 6021-6022.
- Wehrli, H.P., Pomeranz, Y. *Chem. Phys. Lipids.* **1969**, 3, 357–370.
- Weier, T.E., Benson, A.A. *Am. J. Bot.* **1967**, 54, 389-402.
- Wickberg, B. *Acta Chem. Scand.* **1958**, 12, 1187–1201.
- Wu, D.Y., Segal, N.H., Sidobre, S., Kronenberg, M., Chapman, P.B. *J Exp Med.* **2003**. 198, 173–181.
- Wulff, G., Rohle, G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1974**, 13, 157–170.
- Wun, K.S., Borg, N.A., Kjer-Nielsen L., Beddoe, T., Koh, R., Richardson, S.K., Thakur, M., Howell, A.R., Scott-Browne, J.P., Gapin, L., Godfrey, D.I., McCluskey, J., Rossjohn, J. *J Exp Med.* **2008**, 205, 939–949.
- Zandonella, G., Haalk, L., Spener, F., Paltauf, F., Hermetter, A. *Journal of Molec. Cat. B: Enzymatic.* **1997**, 3, 127-130.