



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CHIMICHE

CICLO XXII

COORDINATORE Prof. Gilli Gastone

**SINTESI DI BIOISOSTERI DEGLI OLIGOMANNOSI CON POTENZIALE ATTIVITA'
ANTITUBERCOLARE**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/06

Dottorando
Dott. Mauro Lo Conte

Tutore
Prof. Alberto Marra

Anni 2007/2009

	<i>PAGINA</i>
<i>ABSTRACT (ITALIANO)</i>	3
<i>ABSTRACT (INGLESE)</i>	4
<i>CAPITOLO 1 - TUBERCOLOSI: UNA NUOVA EMERGENZA</i>	5
1.1 Introduzione.	5
1.2 Il ritorno della tubercolosi.	6
1.3 Trattamento farmacologico attuale e prospettive future.	8
1.4 La parete cellulare del <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	13
1.5 Sintesi di accettori e inibitori delle mannosiltransferasi.	18
1.6 Bibliografia.	21
<i>CAPITOLO 2 - I C-GLICOSIDI.</i>	25
2.1 Introduzione.	25
2.2 Sintesi di C-oligosaccaridi per approccio ionico.	27
2.3 Sintesi di C-oligosaccaridi mediante reazione di Witting.	28
2.4 Sintesi di C-oligosaccaridi mediante Click-chemistry.	29
2.5 Sintesi di C-oligosaccaridi attraverso metodi alternativi.	30
2.5 Bibliografia.	31

<i>CAPITOLO 3 - LA CLICK CHEMISTRY</i>	32
3.1 Introduzione.	32
3.2 La cicloaddizione tra azide ed alchino catalizzata da Cu(I) o CuAAC.	35
3.3 Metodi iterativi per la sintesi di oligomeri mediante cicloaddizione CuAAC	39
3.4 Bibliografia.	44
<i>CAPITOLO 4 - SINTESI DEI TRIAZOLMANNOSI</i>	47
4.1 Introduzione	47
4.2 Sintesi degli oligomannosiltriazoli.	49
4.2.1 Il Cobalto ottacarbonile	50
4.4.2 Il Trimetilsilile.	52
4.2.3 Il 3-idrossi-3-metilbutinile.	54
4.2.4 Sintesi del decasaccaride: un approccio convergente.	56
4.2.4 Sintesi convergente e modulare di triazol-oligomannosidi.	58
4.3 Screening degli analoghi come inibitori della ManT.	64
4.4 Conclusioni.	66
4.5 Bibliografia.	67
<i>CAPITOLO 5 - PARTE SPERIMENTALE</i>	68
5.1 Informazioni generali	68
5.2 Sintesi e caratterizzazioni.	70
5.3 Bibliografia	114

ABSTRACT (ITALIANO)

Mycobacterium tuberculosis è l'agente eziologico di una malattia infettiva mortale, la tubercolosi (TBC). Secondo l'Organizzazione mondiale della sanità, quasi un terzo della popolazione mondiale è infetto e ogni anno si stimano 1.6 milioni di decessi. La TBC, inoltre, genera un'infezione letale nei soggetti con HIV/AIDS. Il recente emergere in molti paesi industrializzati di ceppi di Tubercolosi resistenti al trattamento antibiotico ha contribuito a portare nuovo interesse verso la malattia. La ricerca di base e lo sviluppo di nuovi farmaci sono diventati quindi una priorità.

Il *Mycobacterium* possiede una parete cellulare piuttosto complessa che include la presenza di glicofosfolipidi come i fosfatidilinositol mannosidi (PIM_S), i lipomannani (LM), e i lipoarabinomannani (LAM). Questi glicolipidi presentano tutti un nucleo comune costituito da α -1,6-mannosidi, mentre i PIM_S più grandi e i LAM possiedono anche residui α -1,2-mannosidici. E' stato dimostrato che semplici α -1,6-oligomannosidi sono in grado di essere riconosciuti come substrato per le α -1,6-mannosiltransferasi del micobatterio, che sono gli enzimi responsabili della biosintesi dei PIM_S, LM e LAM.

Questo lavoro di tesi si è incentrato sullo sviluppo di potenziali inibitori delle α -1,6-mannosiltransferasi. E' stato sviluppato un approccio iterativo e/o convergente alla sintesi di analoghi di (1,6)-oligosaccaridi, che presentano un anello 1,2,3-triazolico come linker rigido e stabile tra i residui di α -D-mannosio (triazolo-oligomannosidi). Inoltre la posizione 6 del residuo terminale è desossigenata. Questa variazione dovrebbe evitare che tali composti siano attivi come substrati delle α -1,6-mannosiltransferasi nel micobatterio. Inoltre il legame C-C anomero e l'anello triazolico dovrebbero conferire un'elevata stabilità alla degradazione chimica ed enzimatica. Attraverso una cicloadizione 1,3 dipolare tra un azide e un alchino catalizzata da Cu(I) è possibile facilmente sintetizzare degli anelli 1,2,3-triazolici. Il processo di oligomerizzazione è stato quindi eseguito tramite reazioni successive di opportuni building blocks opportunamente funzionalizzati. Attraverso questo approccio sono stati sintetizzati una famiglia di triazol-oligomannosidi a complessità progressiva (2-16 unità) al fine di valutare l'influenza della lunghezza della catena con l'affinità per le 1,6-mannosiltransferasi. Dai saggi in vitro è stato dimostrato che l'esamannoside e l'ottamannoside mostrano attività inibitoria maggiore (95% d'inibizione alla concentrazione di 1 mM) e che la loro lunghezza rappresenta quella ottimale per interagire con l'enzima.

ABSTRACT (ENGLISH)

Mycobacterium tuberculosis is the cause of the deadly infectious disease, tuberculosis (TB). According to the World Health Organization, nearly one-third of the world's population has been exposed to the tuberculosis pathogen and nearly 1.6 million deaths result every year. TB is, in addition, the leading infectious killer of people living with HIV/AIDS. Recent outbreaks of drug-resistant TB in many industrialized nations have led to a new interest in the disease, and basic research and drug development have again become priorities.

The *Mycobacterium* organism possesses a complex cell wall including glycolipids such as phosphatidylinositol mannosides (PIMs), lipomannan (LM), and lipoarabinomannan (LAM). These glycolipids all contain a common α -1,6-linked mannoside core, and the higher PIMs and LAM possess α -1,2-linked mannosyl residues. It has been shown that simple α -1,6-linked oligomannosides can act as substrates for α -1,6-mannosyltransferases in mycobacterium, i.e. the enzymes that promote the synthesis of the above mentioned PIMs, LM, and LAM

This thesis focused on synthesis of potential inhibitors of α -1,6-mannosyltransferases. Iterative and/or a convergent approaches to (1,6)-oligomannoside mimics are reported. These synthetic oligosaccharides display the 1,2,3-triazole ring as a rigid and stable linker between α -D-mannose residues (triazolo-oligomannoses). Moreover the 6-position of the terminal mannosyl residue is deoxygenated. This structural feature is expected to prevent such compounds from acting as substrates for α -1,6-mannosyltransferases in mycobacterium. High stability can be foreseen for these oligomers owing to the resistance of anomeric carbon-carbon bond and triazole ring toward chemical and enzymatic degradation. The assembly of the designed triazolo-oligomannoses relied on the great efficiency of the Cu(I)-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition of suitable building blocks duly prepared for his purpose. In this way six triazole-linked oligomannosides with progressive length chain (2-16 mannose units) were prepared in order to evaluate the influence of length on their affinity toward the α -1,6-mannosyltransferases. *In vitro* assays showed that the hexamannoside and octamannoside were the most active derivatives (95% inhibition at 1 mM concentration) and it was therefore deduced that these compounds were endowed with the optimal chain length for the interaction with α -1,6-mannosyltransferases.

“Ciò che l'esperienza e la storia insegnano è questo: che uomini e governi non hanno mai imparato nulla dalla storia, né mai agito in base a principi da essa edotti.”

Georg Wilhelm Friedrich Hegel, *Lezioni sulla filosofia della storia*, 1833

“Quelli che non sanno ricordare il passato sono condannati a ripeterlo.”

George Santayana, *La vita della ragione*, 1905

1.1 Introduzione.

In occidente molti ritengono la tubercolosi (TBC) una malattia appartenente al passato. La storia della tubercolosi è vecchia almeno quanto la storia dell'uomo e per millenni ha rappresentato una minaccia costante. La parola Tisi deriva direttamente da *Phthisis*, termine greco per indicare la tubercolosi. Negli anni settanta, grazie allo sviluppo di efficaci antibiotici, la comunità scientifica ha creduto fosse una malattia sconfitta, o almeno sotto controllo. In verità il trattamento della tubercolosi è la storia un profondo fallimento scientifico e sociale.

Oggi la TBC rimane una delle principali cause di morte. Si stima che ogni anno causi il decesso di 1,7 milioni di persone. Un terzo della popolazione mondiale è infetto ed ogni anno nove milioni di persone sono contagiate, potendo potenzialmente sviluppare la forma attiva che in molti casi, se non adeguatamente curata, porta alla morte.^{1,2}

La “*peste bianca*”³ è tornata, più forte e con nuovi volti, mettendo a dura prova le nostre risorse. Minaccia aree che si ritenevano sicure, come l'Europa e il Nord America, e le nostri armi per combatterla sono sempre più inefficaci. L'alleanza letale con l'HIV⁴ e il proliferare di ceppi resistenti al trattamento antibiotico rischia di diventare una delle minacce più sottovalutate per la salute mondiale⁵ ed è perciò diventa vitale continuare ad investire nella ricerca di nuove ed efficaci terapie farmacologiche contro la TBC.

1.2 Il ritorno della Tuberculosis.

Alla fine degli anni 80, la tubercolosi non poteva più essere ignorata. Sempre più frequentemente venivano diagnosticati nuovi e mortali casi tubercolosi negli Stati Uniti e in altri paesi occidentali.⁶ La malattia non era più limitata tra poveri ed emarginati, ma rappresentava un problema anche per le classi agiate. E' il primo riconoscimento della sinergia mortale tra l'HIV e la TBC. Le persone sieropositive sono particolarmente vulnerabili alla tubercolosi, non solo perché hanno delle probabilità assai più alte di sviluppare la forma attiva, ma anche perché la malattia progredisce con molta più rapidità nei pazienti immunodepressi. Non è un caso che la TBC è incredibilmente aumentata nei paesi con epidemia di HIV, come quelli dell'Africa subsahariana, dove il numero di contagiati è triplicato nell'ultimo decennio.⁷ Nei casi di TBC in pazienti sieropositivi il trattamento farmacologico è reso più ostico. La rifampicina, uno dei farmaci più efficaci, diminuisce l'efficacia di alcuni antiretrovirali impiegati nella cura dell'AIDS, come la nevirapina.⁸ Di conseguenza lo scema di farmaci utilizzabili diventa ancora minore.

La comparsa di ceppi resistenti al trattamento farmacologico ha incrementato le preoccupazioni intorno al riemergere della malattia.⁹ Le forme resistenti si sono evolute con estrema rapidità e nuovi casi sono costantemente rilevati in ogni parte del mondo,¹⁰ compresi i paesi altamente sviluppati, evidenziando la larga diffusione del problema (Figura 2). La resistenza a un solo farmaco è una conseguenza della mutazione genetica naturale all'interno del micobatterio, ma quella a più farmaci è il risultato di trattamenti inadeguati, interrotti o reiterati.¹¹ Al momento la terapia contro la tubercolosi è complessa e di lunga durata e richiede la combinazione di diversi farmaci. L'eccessiva durata del trattamento, dai sei agli otto mesi, e i pesanti effetti collaterali inducano spesso i pazienti a interrompere il ciclo di cure o a ridurre il dosaggio. In questi casi è probabile che la malattia riemerge in forme più resistenti, riducendo il numero di farmaci efficaci contro l'infezione batterica. Al momento la migliore strategia per diminuire il tasso di interruzioni precoci è l'aderenza al protocollo DOT, *Directly Observed Therapy*,¹² nel quale il paziente assume farmaci sotto il controllo di operatore sanitario.

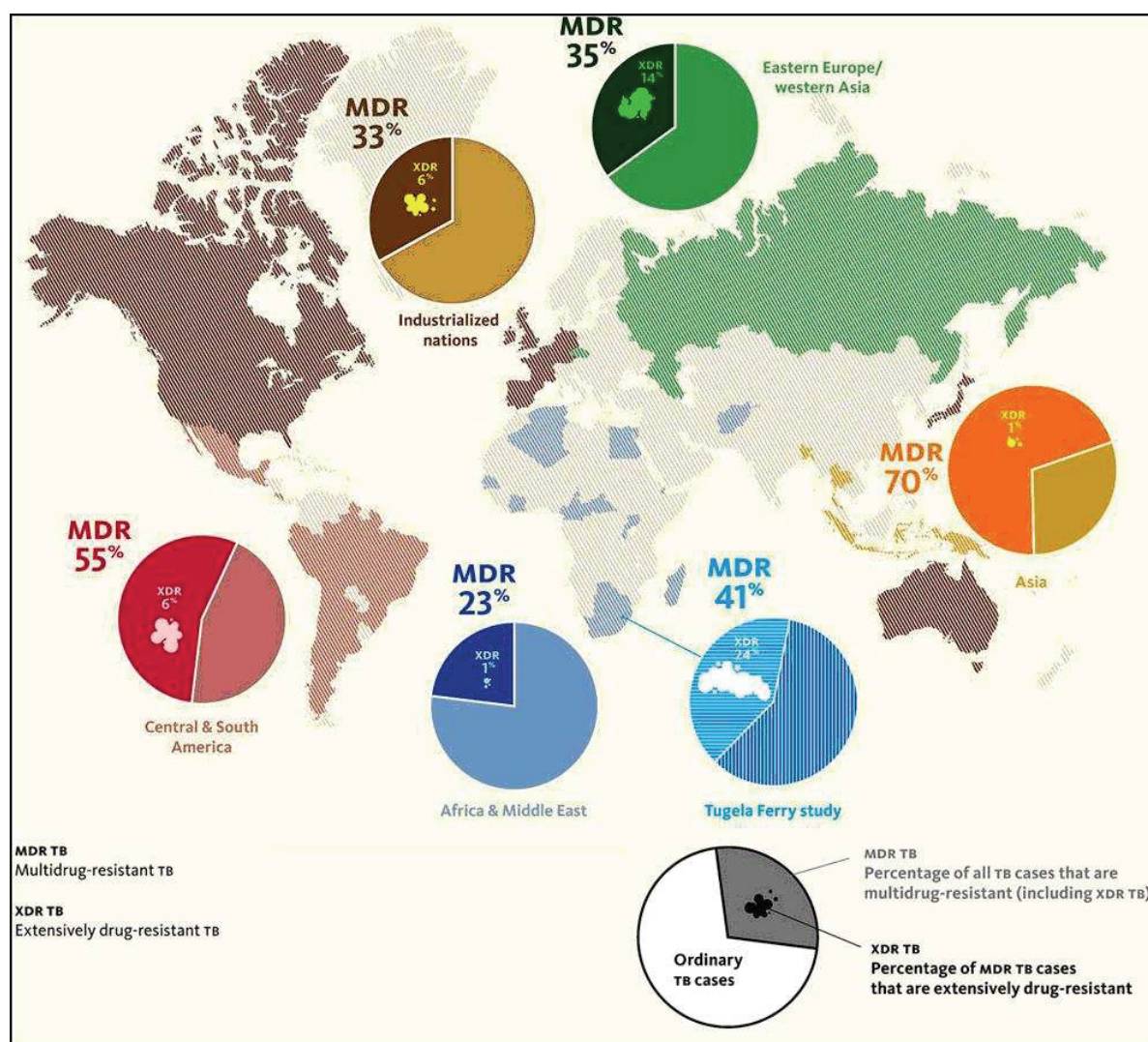


Figura 2. Percentuali di casi di tubercolosi resistente.

Sebbene questa strategia possa essere molto efficace, comporta un grande onere di lavoro da parte del personale medico locale, affaticando un sistema sanitario spesso già inefficiente e con scarse disponibilità economiche. Esiste comunque la possibilità di essere direttamente infettati da un ceppo resistente, attraverso il contatto diretto con una persona che ha già sviluppato la resistenza ai farmaci. L'attenzione della comunità scientifica è, infatti, posta proprio sul rapido diffondersi del contagio diretto di ceppi resistenti, che sembra essere fuori controllo. Molti paesi in via di sviluppo non hanno la minima consapevolezza dell'incidenza della resistenza agli antibiotici tra la popolazione affetta da TBC.

La situazione è resa più complessa dalla reale difficoltà di diagnosticare facilmente le varianti resistenti di tubercolosi e di poter direttamente intervenire con una terapia adeguata. Ogni singolo paziente può infatti avere un diverso profilo di resistenza.

Con il termine DR-TB si identificano quei ceppi di tubercolosi che mostrano resistenza a uno o più farmaci di prima linea. I pazienti infetti da un ceppo resistente ad almeno due dei più efficaci antibiotici, la rifampicina e l'isoniazide, sono contagiati dalla così detta tubercolosi multiresistente o MDR-TB. Esistono varianti ancor più complesse da trattare, che presentano una resistenza estesa anche ai farmaci di seconda linea (per convenzione deve mostrare resistenza ad un farmaco della classe dei fluorochinoloni ed uno dei farmaci iniettabili) e sono definiti tubercolosi a farmaco resistenza estesa o XDR-TB.¹³ L'organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che ogni anno vi siano mezzo milione di nuovi casi di MDR-TB.¹⁴ Diagnosticare, curare e prevenire le forme di tubercolosi resistenti è abbastanza difficile, ma diventa una sfida titanica se colpisce pazienti immunodepressi. E' ovvio che servono nuovi strumenti e strategie per frenare questo rapido diffondersi delle forme mutanti.

1.3 Trattamento farmacologico attuale e prospettive future.

L'agente eziologico della tubercolosi è il *Mycobacterium tuberculosis* anche detto bacillo di Koch. La trasmissione avviene per via aerea, attraverso l'esposizione al bacillo presente nelle goccioline di secreto bronchiale del soggetto infetto, o più raramente per via cutaneo-mucosa, per contatto di lesioni cutanee o di membrane mucose con materiale infetto. Gli antibiotici attivi contro il micobatterio sono pochi e datati. La maggior parte di essi, infatti, è stata sviluppata più di quaranta anni fa. Vediamo velocemente i più noti e il loro meccanismo di azione.¹⁵

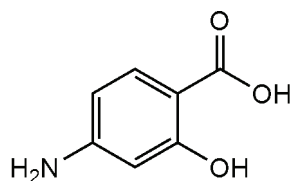


Figura 2.

Acido para-aminosalicilico (PAS). E' senz'altro, tra i farmaci di seconda scelta, il più conosciuto e studiato (Figura 2). Sviluppato nel 1946, è ritenuto un inibitore della di-idropteroato sintetasi, bloccando la sintesi dell'acido folico (la vitamina B9), indispensabile in molti processi che coinvolgono la replicazione del DNA. Si tratterebbe quindi di un analogo dell'acido p-aminobenzoico (PAB), il substrato naturale della di-idropteroato sintetasi, nei confronti del quale esercita azione competitiva analoga a quella dei sulfamidici. Essendo un enzima assente nell'organismo ospite, che assume l'acido folico dalla dieta, non dovrebbe avere effetti sull'uomo. In realtà Nopponpunth e collaboratori hanno dimostrato che il PAS è un blando inibitore in vitro dell'enzima,¹⁶ e alcuni ritengono che sia più probabile un suo coinvolgimento nell'assorbimento del ferro, elemento essenziale per accrescimento del micobatterio. La resistenza insorge attraverso una mutazione nel gene della timidilato sintetasi (thyA).¹⁷ Il gene determina i livelli intracellulari di folato e la sua mutazione sembra essere responsabile anche della resistenza ad altri farmaci che intervengono sul metabolismo della vitamina B9. Attualmente l'acido para-aminosalicilico è usato per il trattamento della MDR-TB.

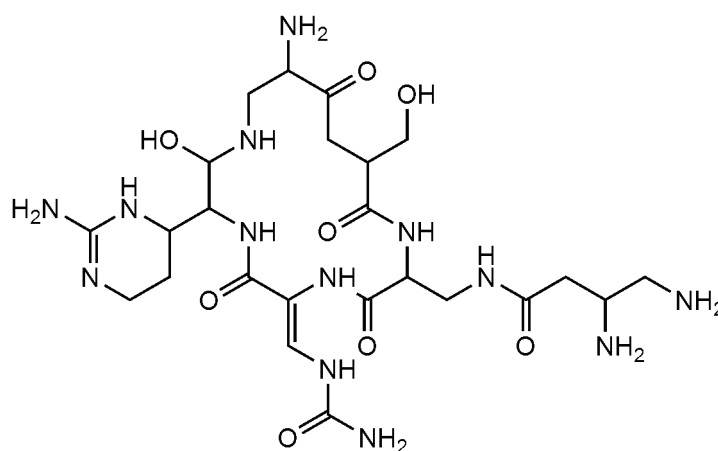


Figura 3.

Capreomicina (PAC). E' un antibiotico polipeptidico (Figura 3) isolato per la prima volta nel 1963 dallo *Streptomyces capreolus*. Il meccanismo di azione non è completamente conosciuto, anche se chiaramente interagisce con i ribosomi batterici, inibendo la sintesi proteica. La resistenza infatti è associata a mutazioni nei geni ribosomiali.

E' interessante notare che non dà mai resistenza crociata con la Streptomicina, risultando perciò uno strumento terapeutico efficace nei pazienti resistenti a quest'ultima.

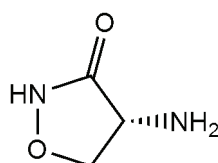


Figura 4.

Cicloserina. E' un analogo aminoacidico della D-alanina (Figura 4) – nell'uomo sono presenti soltanto aminoacidi della serie L- introdotto in commercio nel 1952. La cicloserina inibisce la *Alanina racemasi*, un enzima in grado di catalizzare la conversione della L-alanina in D-alanina, e la *D-alanina-D-alanina ligasi*, enzima responsabile della formazione del nucleo pentapetidico formato da cinque D-alanine legate tra loro. Entrambi gli enzimi sono essenziali per la sintesi dei *peptidoglicani*, uno dei costituenti principali della parete batterica.¹⁸ Essendo una struttura molto comune nei batteri, la cicloserina è un antibiotico a largo spettro ed è perciò di seconda scelta. Mutazioni a carico del gene *Alanina racemasi* conferiscono resistenza al farmaco.

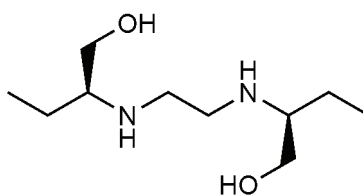


Figura 5.

Etambutolo (Figura 5). Sviluppato nel 1966, inibisce l'arabinosil transferasi, enzima coinvolto nella biosintesi degli arabinogalattani, alterando la permeabilità della parete dei micobatteri e rendendola più facilmente attraversabile da altri farmaci più lipofili come la rifampicina. E' sempre dato in associazione per limitare l'insorgenza di ceppi resistenti.

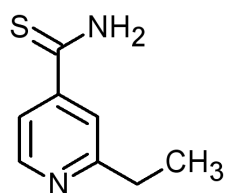


Figura 6.

Etionamide (Figura 6). Il suo meccanismo di azione dovrebbe essere identico a quello dell'Isoniazide. Funziona quindi da inibitore competitivo dell'*Enoil-ACP reduttasi* - dove ACP è l'acronimo di *Acyl Carrier Protein* (proteina trasportante gruppi acili)- enzima essenziale nella produzione di acidi grassi e interferendo quindi con la sintesi degli acidi micolici, che costituiscono il 40% in peso della parte del micobatterio. Si tratta di un mimetico del NADH, nicotinammide adenina di nucleotide, il cofattore dell'*Enoil-ACP reduttasi*. E' stato sviluppato nel 1956.

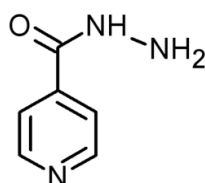


Figura 7.

Isoniazide (Figura 7). E' un pro-farmaco attivato da un emoproteina, la catalasi-perossidasi *KatG*. Come l' Etionamide, inibisce l' *Enoil-ACP reduttasi NADH specifica*. La resistenza si verifica attraverso mutazioni sul gene *KatG*, perciò pur avendo un meccanismo di azione analogo all'etionamide, non dà resistenza crociata con quest'ultima.¹⁹ Il farmaco, formulato nel 1912 ma messo in commercio nel 1952, è il farmaco di elezione per il trattamento della tubercolosi insieme alla rifampicina. Ha il miglior rapporto costo/benefici, riducendo drasticamente la popolazione batterica in sole due settimane di trattamento, ed è il più tollerato dai pazienti.

Rifampicina. Si tratta di un antibiotico (Figura 8) ottenuto per via semisintetica dall'*Amycolaptosis rifamycinica* ed è stata scoperta nel 1959 nei laboratori italiani della Lapetit. Inibisce la sintesi proteica, legandosi alla subunità β della *RNA-polimerasi DNA dipendente* e di fatto impedendo la sintesi dell' RNA batterico.²⁰ La resistenza insorge proprio attraverso mutazioni a carico del gene codificante per questo enzima.²¹ E' un farmaco di prima scelta, ma presenta pesanti effetti collaterali.

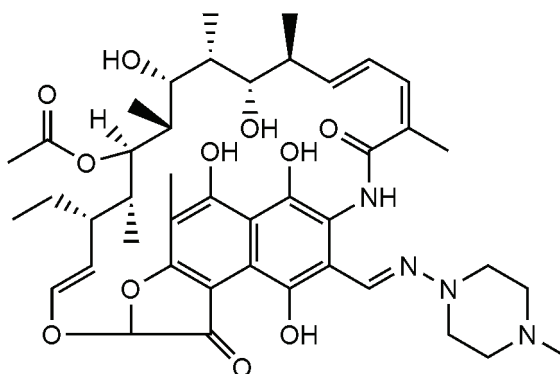


Figure 8.

Le strategie per la ricerca di nuovi farmaci si stanno muovendo su diversi fronti.²² Lo screening di librerie molecolari, l'utilizzo di vecchi farmaci con nuovi impieghi, o lo sviluppo di nuovi antibiotici da molecole note hanno già dato buoni risultati e rappresentano una via semplice e economica per le industrie farmaceutiche.²³ Ma le più brillanti scoperte stanno arrivando da una conoscenza più profonda dei meccanismi biologici del micobatterio, che porta allo sviluppo di nuove e più mirate terapie.^{24,25}

Un esempio perfetto di questa nuova tendenza è rappresentato dal lavoro di Chris Abell e collaboratori²⁶ in cui sono state sviluppate molecole attive sulla *Pantotenato sintetasi*, enzima capace di legare il pantoato con la β -alanina per formare il pantotenato, una vitamina (la vit. B5) che riveste un ruolo essenziale nel metabolismo cellulare e che l'uomo assume dalla dieta. Il particolare target di azione è stato individuato basandosi sui recenti risultati ottenuti attraverso l'indagine specifica del DNA batterico. In particolare è stato dimostrato che topi immunodepressi infettati con ceppi di *Mycobacterium tuberculosis*, in cui geni codificanti per questo specifico enzima erano stati resi difettosi, sopravvivevano per tempi molto più lunghi rispetto al controllo.²⁷ Queste osservazioni rendono la pantotenato sintetasi un bersaglio ideale per lo sviluppo di nuovi farmaci.

1.4 La parete cellulare del *Mycobacterium tuberculosis*.

La parete cellulare ha una funzione duplice difesa, proteggendo il micobatterio dagli attacchi del sistema immunitario dell'organismo ospite e limitando il passaggio degli agenti farmacologici.²⁸ Possiede strutture estremamente specifiche, la cui biosintesi rappresenta un target ideale per una azione mirata contro il micobatterio, e una percentuale insolitamente elevata di lipidi (il 60% del peso secco). Si tratta di lipidi particolarmente complessi, che conferiscono alla parete una bassa permeabilità e svolgono un ruolo cruciale nella resistenza intrinseca del *M. tuberculosis* agli antibiotici, agli agenti chimici e agli enzimi litici.²⁹ Risulta perciò evidente che lo sviluppo di nuovi antibiotici in grado di intervenire su queste strutture potrebbe anche migliorare l'azione degli farmaci noti.

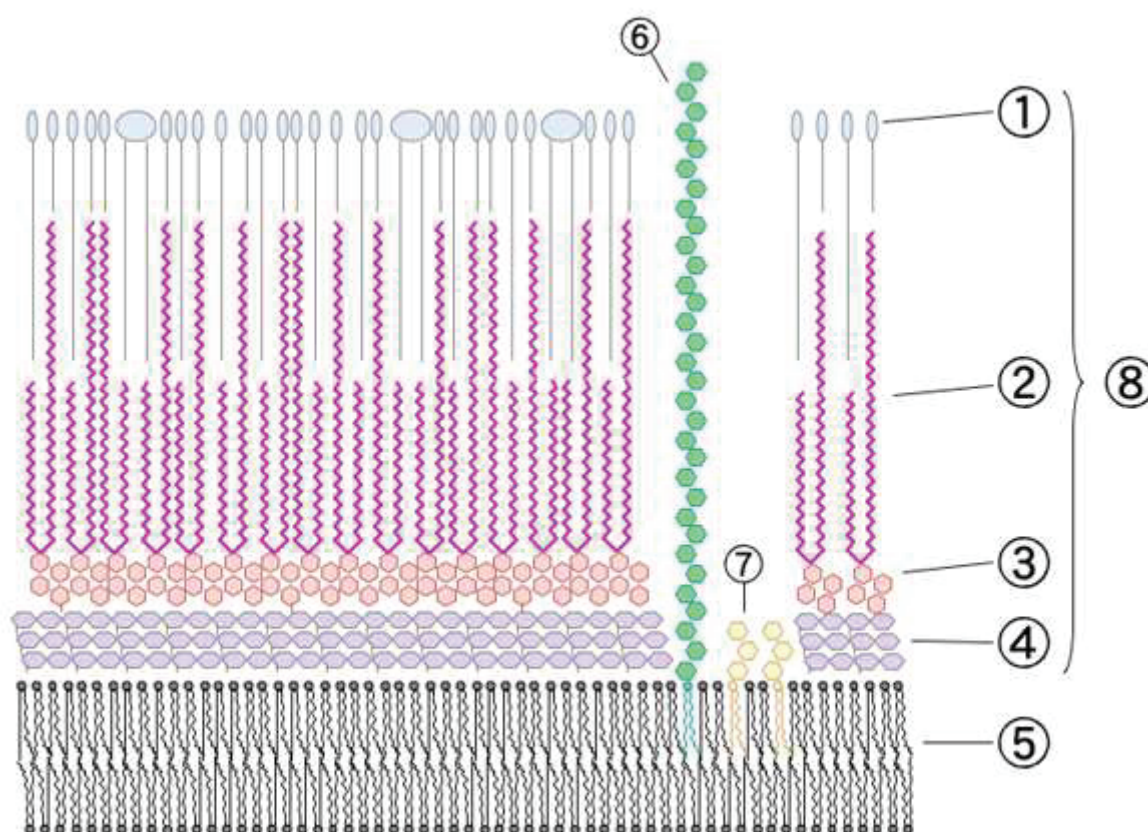


Figura 9. Parete cellulare del *M. tuberculosis* schematizzata:(1) Lipidi; (2) Acidi Micolici; (3)Arabinogalattani; (4) Peptidoglicano; (5) Membrana cellulare; (6) Lipoarabinomannani; (7) Fofotidilinositolmannosidi; (8) Parete cellulare.

C'è da notare, infatti, che spesso l'elevata lunghezza della terapia è dovuta proprio allo scarso potere di penetrazione degli agenti farmacologici ed è sempre per lo stesso motivo che l'isoniazide, attivo sulla biosintesi della parete cellulare (nello specifico su quella degli acidi micolici), fa parte del protocollo DOT, dimostrandosi molto efficace nel ridurre l'insorgenza di ceppi resistenti.

La parete cellulare del *M. tuberculosis* è formata da due parti (Figura 9), una superiore e una inferiore.³⁰ La prima è a diretto contatto con la membrana cellulare ed è composta da uno strato di *peptidoglicano*, un polimero a struttura reticolata di aminoacidi e carboidrati, dove le catene zuccherine sono disposte in una griglia perpendicolare al piano della membrana plasmatica e sono collegate tra loro da catene peptidiche. Mediante un gruppo fosfato le unità di ramnosio del peptidoglicano sono legate covalentemente con catene lineari di *arabinogalattani*. Quest'ultime sono a sua volta unite agli *acidi micolici*. L'insieme forma una macrostruttura denominata *mAGP* (mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan).³¹

Il segmento superiore è composto da acidi grassi liberi, a complessità variabile, inframmezzati da proteine e da diversi tipi di glicofosfolipidi: i *fosfatidil-inositolo mannosidi* (PIM), i *lipomannani* (LM) e *lipoarabinomannani* (LAM). In questo lavoro di tesi tratteremo esclusivamente quest'ultime macromolecole.

Questi glicofosfolipidi sono stati descritti per la prima volta negli anni sessanta,³² ma soltanto negli ultimi anni, grazie alle intensificarsi di studi mirati sul genoma batterico, è stata chiarito il loro ruolo e la loro biosintesi (Figura 10). I PIMs sono costituiti da un nucleo fosfatidil-*myo*-inositolico (PI), a cui sono ancorate dalle due alle sei unità mannosidiche collegate attraverso un legame α -1,6-*O*-glicosidico.³³ I PIM con due unità mannosidiche sono gli elementi più comuni nella parete cellulare del micobatterio. Da poco più di un decennio è stato scoperto che gli LM e i LAM non sono altro che estensioni dei PIMs, in cui la catena mannosidica è ulteriormente allungata e ramificata attraverso l'inserzione anche di unità di ramnosio legate in α -1,2 e, nei Lipoarabinomannani, è infine legata una catena di arabinani.³⁴

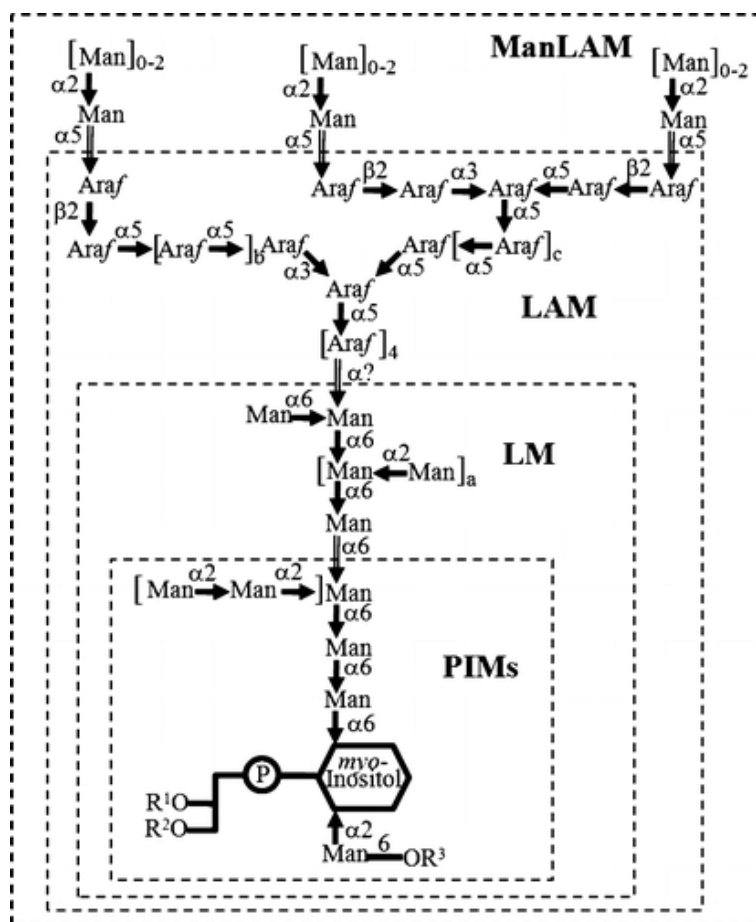


Figura 10.

Vi è un forte interesse sul ruolo svolto dai LAM, poiché rappresentano le strutture più esterne della parete batterica. In particolare è stato notato come i lipoarabinomannani possiedano un “cappello” superficiale, formato da poche unità mannosidiche, capace di essere riconosciuto dal DC-SIGN, un particolare tipo di recettore lectinico presente sulla superficie dei macrofagi e delle cellule dendritiche e specifico per i residui di mannosio. Recentemente, è stato dimostrato che, sebbene i residui di mannosio siano essenziali per il legame, l'eliminazione genetica di tali residui non diminuisce l'interazione dei micobatteri con DC-SIGN e DCS.³⁵

La loro biosintesi (Figura 11) inizia attraverso l'azione di due distinte mannosiltransferasi che utilizzano il *GDP-Manp* molecola in cui l'unità di mannosio è attivata in posizione anomericamente dalla presenza del guanosina difosfato, che funziona da buon gruppo uscente o in altre parole da donatore di zuccheri. La prima fase prevede il trasferimento di un'unità di mannosio alla posizione 2 dell'anello inositico del fosfatidil-myo-inositolo formando il PIM1. Questa reazione è catalizzata dalla α -mannosiltransferasi PimA,³⁶ del cui complesso con la *GDP-Manp* è stata determinata anche la struttura ai raggi.³⁷

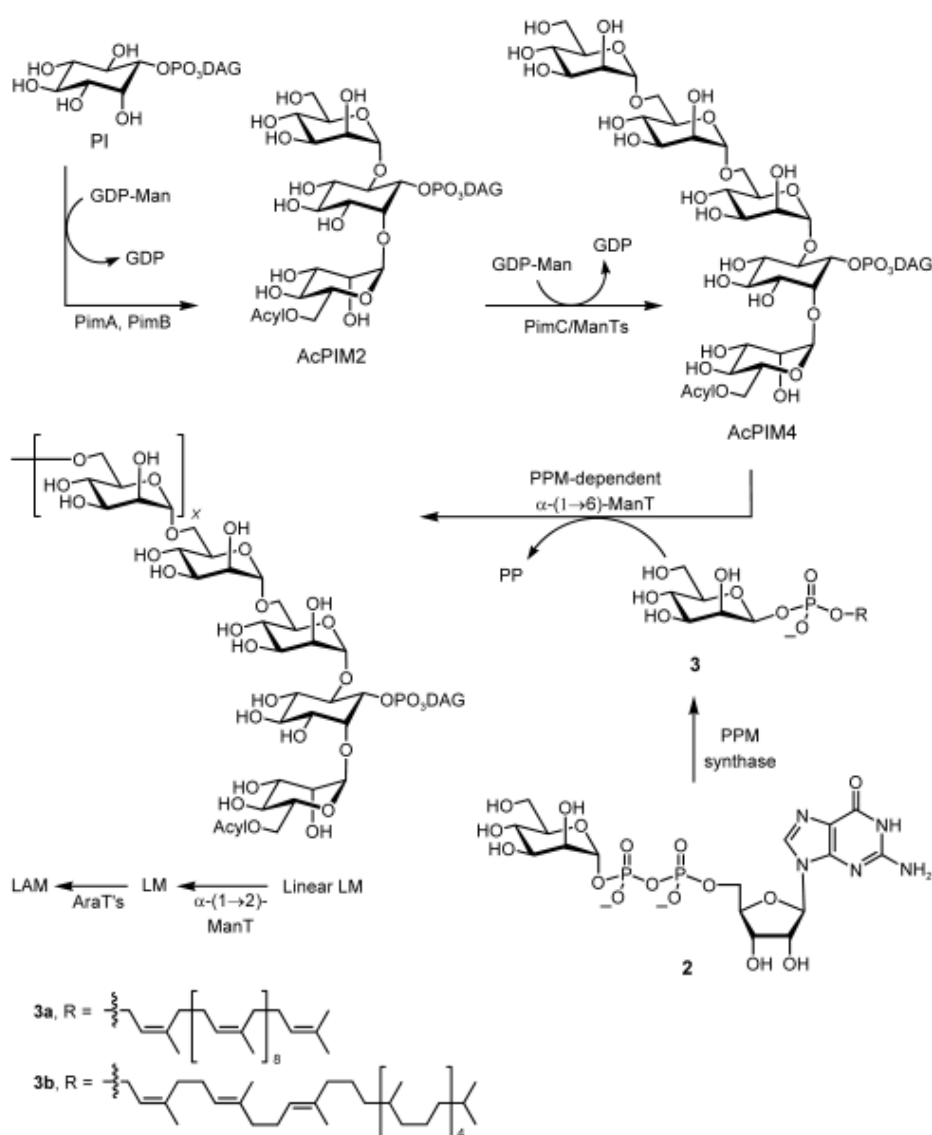
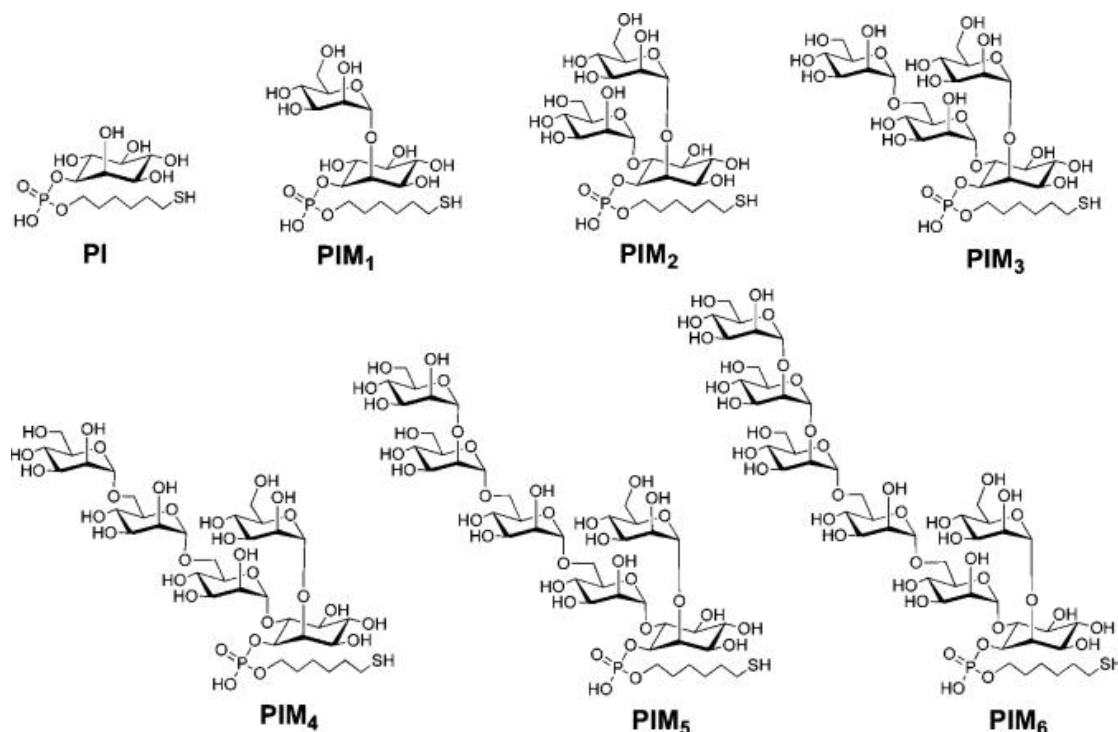


Figura 11.

Il gene per la PimA è fondamentale per la vita del micobatterio, a dimostrazione che i PIM1 e gli omologhi superiori siano essenziali per la crescita cellulare. La seconda unità di mannosio viene legata alla posizione 6 nel nucleo inositolico grazie all'azione della α -mannosiltransferasi PimB, portando alla formazione del PIM2.³⁸ Una terza molecola di mannosio viene trasferita sulla posizione 6 della seconda unità mannosidica per catalisi della α -mannosiltransferasi PimC, formando il PIM3.³⁹ Le unità successive sono legate attraverso l'azione di altre mannosiltransferasi non ancora identificate. Sappiamo invece con certezza che, dal PIM6 in poi, le mannosiltransferasi sicuramente usano, come donatore di unità di mannosio, il C₃₅/C₅₀ poliprenil monofosfomannosio (C₃₅/C₅₀-P-Manp), ottenuto attraverso il trasferimento del mannosio dal *GDP-Manp* ai poliprenoli per azione della poliprenol monofosfomannosil (*ppm*) sintetasi.⁴⁰ Attualmente sono in esame diversi analoghi di questo mannosil-donatore come accettori e inibitore della *ppm-sintetasi*, intervenendo quindi sulla biosintesi dei LM e dei LAM.^{41,42} Le α -1,2-mannosiltransferasi aumentano il grado di complessità del LM, ma non è ancora stato possibile individuare i geni legati alla loro espressione e perciò sappiamo ancora molto poco a loro riguardo.



Schema 12.

I lipomannani dalla giusta lunghezza sono infine legati a diverse unità di arabinosio, per formare i lipoarabinomannani, per azione di α -1,3-arabinosiltransferasi che utilizza come donatore di unità di arabinofuranosio la monofosfoarabinosio C_{35}/C_{50} poliprenil (C_{35}/C_{50} -P-Araf),⁴³ a sua volta ottenuto dal 5-fosfo-D-ribosil pirofosfato. L'importanza di queste strutture è ulteriormente testimoniata dai recenti lavori di Seeberger e collaboratori,⁴⁴ i quali hanno sviluppato la sintesi totale dei PIMs (Figura 12), compresa la porzione lipidica costituita dal fosfatidil diacilglicerolo, in modo da chiarire il ruolo svolto da tali molecole nei processi immunogeni. I PIMs (PIM1-6) sono stati immobilizzati su dei vetrini-microarray ed è stato dimostrato la loro capacità di legarsi al recettore DC-SIGN delle cellule dendritiche. Sono stati inoltre coniugati al KLH (una proteina di trasporto immunogena), stimolando la risposta immunitaria nei topi trattati. Tutto ciò conferma le enormi potenzialità terapeutiche che potrebbero scaturire da una comprensione più ampia di questi glicofosfolipidi.⁴⁵

1.5 Sintesi di accettori e inibitori delle mannosiltransferasi.

Lo sviluppo di accettori e inibitori artificiali degli enzimi coinvolti nella biosintesi dei glicofosfolipidi della parete del *M. tuberculosis* permette di indagare e comprendere meglio i meccanismi biomolecolari che li coinvolgono, stabilirne l'importanza e, eventualmente, portare alla progettazione di nuovi farmaci attivi contro la TBC.

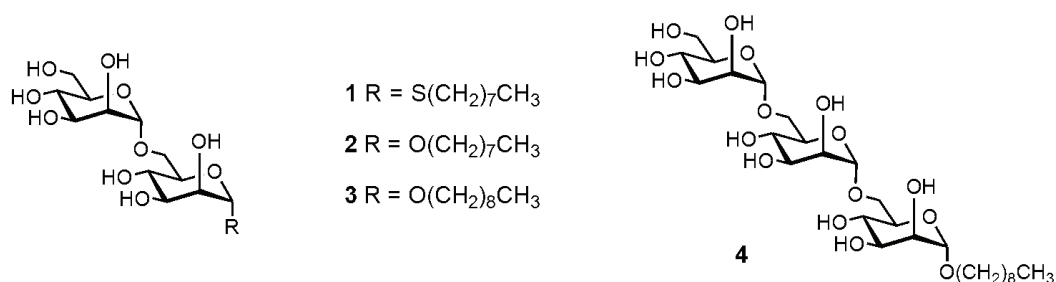


Figura 13.

J. R. Brown e collaboratori sono stati i primi a sviluppare degli accettori semplificati delle α -1,6-mannosiltransferasi C_{35}/C_{50} poliprenil monofosfomannosio dipendenti.⁴⁶ Sono stati sintetizzati diversi disaccaridi (Figura 13), aventi in posizione anomericamente una catena idrofobica a diversa lunghezza (8-10 atomi di carbonio) attraverso un legame *O*-glicosidico o *S*-glicosidico, e sono stati testati come accettori della mannosiltransferasi batterica.

Per valutarne l'attività è stato isolato il prodotto di reazione, cioè il trisaccaride ottenuto per addizione di una nuova molecola di mannosio in posizione 6. Dall'esame dei test è chiaro che l'accettore migliore è risultato essere il prodotto 2 (ottil α -D-mannopiranosil- α -1,6-D-mannopiranoside), più affine anche rispetto al suo omologo superiore. Tale molecola è stata usata come riferimento per ogni successiva indagine e come accettore negli studi di inibizione competitiva dell'enzima.

Lowary ha approfondito l'indagine, variando ulteriormente la casistica, al fine di stabilire quali sostituenti sullo zucchero fossero fondamentali per legare l'enzima. Dapprima è stata valutata l'importanza del sostituito in posizione C-2' (Figura 14). I test biologici hanno dimostrato che tale posizione non crea delle interazioni fondamentali con gruppi polari del sito attivo dell'enzima (come dimostra il desossiderivato), ma comunque non tollera la presenza di gruppi ingombranti come un OCH_3 .⁴⁷

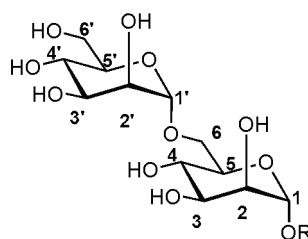


Figura 14.

In seguito è stata valutata l'importanza del sostituito in posizione C-6'. Come si può facilmente intuire questa posizione è essenziale per l'attacco di un'altra unità di mannosio e difatti distingue gli accettori dagli inibitori. La presenza di un gruppo amminico sembra migliorare il grado di inibizione, forse perché esistono delle interazioni ioniche con gli aminoacidi carichi negativamente presenti nel sito attivo.⁴⁸ A questo punto sono state fatte variazioni anche in posizione C-3' e C-4'. La prima evidentemente richiede la presenza di un gruppo in grado di effettuare un legame idrogeno, dato che il desossi-derivato non è riconosciuto come substrato, mentre il metossi-derivato ha una attività paragonabile al modello. La posizione C-4 è invece fondamentale per l'interazione con l'enzima. La stessa indagine è stata fatta sulle posizioni C-2, C-3 e C4 (quindi sulle posizioni della prima unità mannosidica).

La posizione C-2 risulta fondamentale e non tollera alcuna variazione, a differenza della stessa posizione sull'altra unità mannosidica, mentre variazioni sulle altre due posizioni sono piuttosto ininfluenti.⁴⁹ Sono state valutate anche catene a lunghezza maggiore, con tre o quattro unità mannosidiche, ma se il trisaccaride ha mostrato un'attività paragonabile al modello (il disaccaride), l'omologo superiore ha perso gran parte dell'attività. Recentemente questo studio è stato completato con l'analisi degli epimeri del disaccaride modello. L'uso di zuccheri della serie *gluco* o *talo* a permesso di confermare che la posizione C-2' e C-4 sono fondamentali per l'interazione con le mannosiltransferasi. La contemporanea sostituzione del gruppo alcolico con uno amminico in posizione C-6' dimostra, al contrario, che ai fini inibitori le suddette posizioni risultano poco influenti. Essendo però dei blandi inibitori, non sono state eseguite successive indagini per stabilirne la ragione.⁵⁰

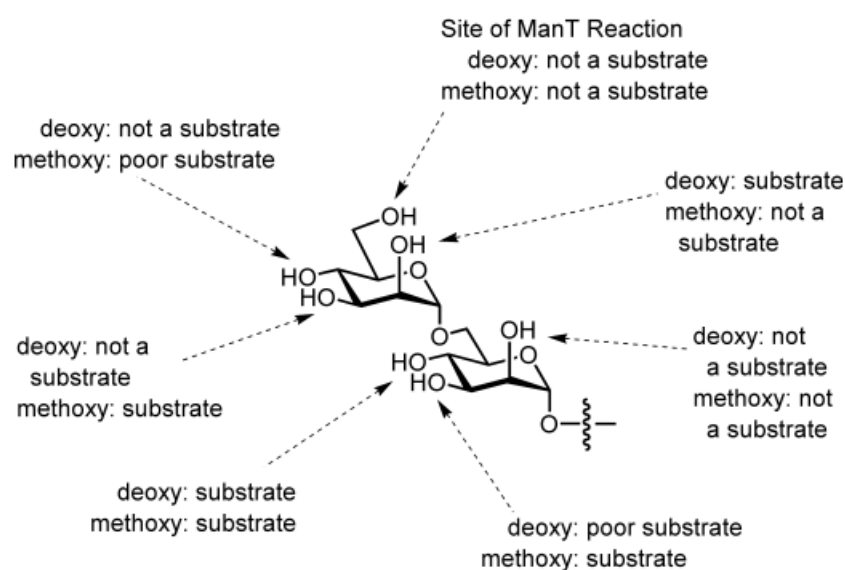


Figura 15.

Al fine di approfondire la comprensione dei meccanismi di inibizione nel 2005 Watt e Williams hanno sintetizzato una libreria di oligomannosidi (1-4 unità) aventi la posizione C-6 terminale desossigenata, in modo da impedire l'attacco di un'ulteriore unità mannosidica e agire da inibitori. Purtroppo, inspiegabilmente, non è stata eseguita alcuna prova biologica.⁵¹

1.6 Bibliografia.

1. WHO. Global tuberculosis control—surveillance, planning, financing. Geneva: World Health Organization, **2008**. WHO/HTM/TB/2008.393.
2. Stop TB Partnership. The Global Plan to Stop TB 2006–2015. Geneva: World Health Organization, **2006**. WHO/HTM/STB/2006.35.
3. The Return of the White Plague: Global Poverty and the New Tuberculosis, Gaudy, M. and Zumla, A., Eds.; Verso : London, **2003**.
4. Corbett E. L.; Watt C. J.; Walker N., Maher, D.; Williams, B. G.; Raviglione, M. C.; Dye, C. *Archives of Internal Medicine* **2003**; 163, 1009-1021.
5. WHO. TB: a global emergency. Geneva: World Health Organization, **1994** WHO/TB/94.177.
6. Zumla, A.; Mwaba, P.; Huggett, J.; Kapata, N.; Chanda, D.; Grange, J. *Lancet Infect Dis.* **2009**; 9, 197–202.
7. Mukadi, Y. D.; Maher, D.; Harries, A. *AIDS* **2001**, 15, 143-152.
8. Furlan V.; Taburet A.M.; *Therapie* **2001**, 56, 267-271.
9. Aziz, M. A.; Wright, A.; Laszlo, A.; De Muynck, A.; Portaels, F.; Van Deun, A.; Wells, C.; Nunn, P.; Blanc, L.; Raviglione, M. C.; and WHO/International Union Against Tuberculosis And Lung Disease Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *The Lancet.* **2006**, 368, 2142-2154.
10. Pablos-Mendez, A., Raviglione M. C.; Laszlo, A.; et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994–1997: World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N. Engl. J. Med.* **1998**, 338, 1641-1649.
11. Mukherjee, J. S.; Rich, M. L.; Socci, A. R.; Joseph, J. K.; Virú, F. A.; Shin, S. S.; Furin, J. J.; Becerra, M. C.; Barry, D. J.; Kim, J. Y.; Bayona, J.; Farmer, P.; Smith Fawzi, M. C.; Seung, K. J. *The Lancet.* **2004**, 363, 474-481.
12. Bayer, R.; Wilkinson, D. *The Lancet.* **1995**, 345, 1545-1548.

13. Shah, N. S.; Wright, A.; Bai, G. H.; Barrera, L.; Boulahbal, F.; Martin-Casabona, N.; Drobniewski, F.; Gilpin, C.; Havelkova, M.; Lepe, R.; Lumb, R.; Metchock, B.; Portaels, F.; Rodrigues, M. F.; Rusch-Gerdes, S.; Van Deun, A.; Vincent, V.; Laserson, K.; Wells, C.; Cegielski, J. P. *Emerging Infectious Diseases* **2007**, 13, 380-387
14. WHO/IUATLD. Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World. Report n°4. Geneva: World Health Organization and International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases, **2008**.
(http://www.who.int/tb/publications/2008/drs_report4_26feb08.pdf).
15. Global Alliance for TB Drug Development *Handbook of Anti-Tuberculosis Agents Tuberculosis* **2008**, 88, 85–170.
16. Nopponpunnth, V.; Worachart Sirawaraporn, W.; Greene, P. J.; Santi, D. V. Nopponpunnth V, *J. Bacteriol* 1999, 181, 6814-6821.
17. Rengarajan, J.; Sasseti, C. M.; Naroditskaya, V.; Sloutsky, A.; Bloom, B. R.; Rubin, E. J. *Mol. Microbiol.* 2004, 53, 275-282.
18. Di Perri, G.; Bonora, S. *J Antimicrob Chemother* **2004**, 54, 593-602.
19. Mdluli, K.; Slayden, R. A.; Zhu, Y.Q.; Ramaswamy, S.; Pan, X.; Mead, M.; Crane, D. D.; Musser, J. M.; Barry III, C. E. *Science* **1998**, 280, 1607-1610
20. Wehrli, W.; Knüsel, F.; Schmid, K.; M Staehelin, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1968**, 61, 667–673.
21. Huitric, E.; Werngren, J.; Juréen, P.; Hoffner S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 2860-2.
22. Lenaerts, A. J.; Degroote, M.A.; Orme, I. M. *Trends Microbiol.* **2008**, 16, 48-54
23. Palomino, J.C.; Ramos, D. F.; da Silva, P. A. *Curr Med Chem.* **2009**, 16, 1898-1904.
24. Loughheed, K. E.; Taylor, D. L.; Osborne, S. A.; Bryans, J. S.; Buxton RS. *Tuberculosis* **2009**; 89, 364-70.
25. Showalter, H. D. H.; William A. Denny, W. A. *Tuberculosis* **2008**, 88(Suppl. 1), S3-S17
26. Hung, A. W.; Silvestre, H. L.; Wen, S.; Ciulli, A.; Blundell, T. L.; Abell, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 8452-8456.
27. Sambandamurthy, V. K.; Wang, X.; Chen, B.; Russell, R. G.; Derrick, S.; Collins, F. M.; Morris, S. L.; Jacobs Jr., W. R. *Nature Medicine* **2002**, 8, 1171-1174.

28. Brennan, P. J. *Tuberculosis* **2003**, 83, 91–97.
29. Bhowruth, V.; Alderwick, L. J.; Brown, A. K.; Bhatt, A.; Besra, G. S. *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, 36, 555–565.
30. Tam, P-H; Lowary, T. L. *Current Opinion in Chemical Biology* **2009**, 13, 618–625.
31. Besra, G. S.; Khoo, K-H.; McNeil, M. R.; Dell, A.; Morris, H. R.; Brennan, P. J. *Biochemistry* **1995** 34, 4257–4266
32. Goren, M. B.; Brennan, P. J. *Tuberculosis* **1980** 63–193.
33. Crick, D. C.; Mahapatra, S.; Brennan, P. J. *Glycobiology*, **2001**, 11, 107R-118R
34. Chatterjee, D.; Khoo, K-H. *Glycobiology* **1998**, 8, 113–20.
35. Driessen, N. N.; Ummels, R.; Maaskant, J. J.; Gurcha, S. S.; Besra, G. S.; Ainge, G. D.; Larsen, D. S.; Painter, G. F.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E.; Geurtsen, J.; Appelmelk, B. J. *Infection and Immunity* **2009**, 77, 4538-4547.
36. Kordulakova, J.; Gilleron, M.; Mikusova, K.; Puzo, G.; Brennan, P.J.; Gicquel, B.; Jackson, M. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 31335–31344.
37. Guerin, M. E.; Kordula'kova' J.; Schaeffer, F.; Svetlikova, Z.; Buschiazzi, A.; Giganti, D.; Gicquel, B.; Mikus'ova', K.; Jackson, M.; Alzari, P. M. *J Biol Chem* **2007**, 282, 20705-20714.
38. Schaeffer, M. L.; Khoo, K-H.; Besra, G. S.; Chatterjee, D.; Brennan, P. J.; Belisle, J. T.; Inamine, J. M. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 31625–31631.
39. Kremer, L.; Gurcha, S. S.; Bifani, P.; Hitchen, P. G.; Baulard, A.; Morris, H. R.; Dell, A.; Brennan, P. J.; Besra, G. S. *Biochem. J.* **2002**, 363, 437–447.
40. Gibson, K. J.; Eggeling, L.; Maughan, W. N.; Krumbach, K.; Gurcha, S. S.; Nigou, J.; Puzo, G.; Sahm, H.; Besra, G. S. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 40842–40850.
41. Guy, M. R.; Petr A. Illarionov, P. A.; Gurcha, S. S.; Urcha, Dover, L. G.; KGibson, K. J. C.; Smith, P. W.; David E. Minnikin, D. E.; S. Besra, G. S. *Biochem. J.* **2004**, 382, 905–912.
42. Subramaniam, V.; Gurcha S. S.; Besra, G. S.; Lowary, T. L. *Biorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, 13, 1083-1094 .
43. Wolucka, B. A.; McNeil, M. R.; de Hoffmann, E.; Chojnacki, T.; Brennan, P. J.; *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 23328–23335.
44. Liu, X.; Stocker, B. L.; Seeberger, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3638-3648.
45. Boonyarattanakalin, S.; Liu, X.; Michieletti, M.; Lepenies, B.; Seeberger, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 16791–16799

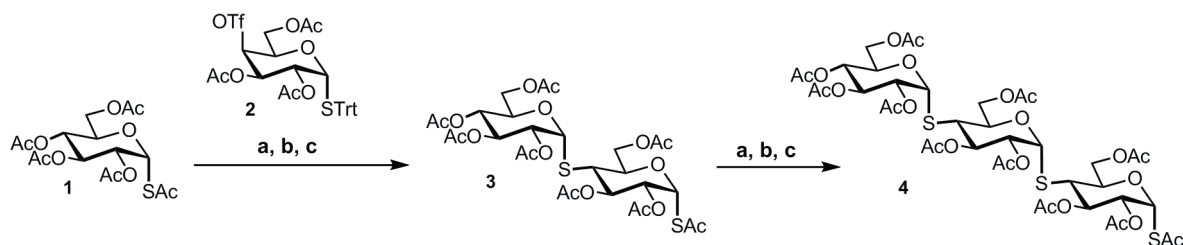
46. Brown, J. R.; Field, R. A.; Barker, A.; Guy, M.; Grewal, R.; Kay-Hooi Khoo, K-H.; Brennan, P.J.; Gurdyal, S.; Besra, S.; Chatterjee, D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2001**, 9, 815-824
47. Subramaniam, V.; Gurcha, S.S.; Besra, G. S.; Lowary, T. L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, 13, 1083–1094
48. Subramaniam, V.; Sudagar, V Gurcha, S.; Besra, G. S.; Lowary, T. L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 553–567
49. Tam, P. H.; Besra, G. S.; Lowary, T. L. *ChemBioChem* **2008**, 9, 267-278
50. Tam, P. H.; Lowary, T. L. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 181–192
51. Watt, J. A.; Williams, S. J. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1982–1992

2.1 Introduzione.

Negli ultimi decenni il ruolo dei carboidrati nei processi biologici ha acquisito sempre maggior importanza, travalicando ampiamente il loro ruolo di semplice fonte di energia.¹ In particolare gli oligosaccaridi legati a proteine o lipidi di membrana rivestono un ruolo fondamentale nei processi di riconoscimento cellulare, infezione batterica, nei processi infiammatori o di metastasi.² Gli oligosaccaridi, avendo a disposizione un ampio ventaglio di collegamenti possibili e diversi punti di ramificazione, possono generare strutture molto complesse in grado di fornire un numero potenzialmente illimitato di combinazioni, che, attraverso processi biologici di codifica, sono in grado di regolare e modificare un enorme numero di processi cellulari. Questo ruolo fondamentale nei processi vitali ha portato a una maggiore richiesta di nuovi ed efficienti metodi sintetici che permettessero un efficiente sviluppo di un'ampia gamma di oligosaccaridi, da poter utilizzare sia nell'indagine approfondita delle loro funzioni biologiche che come agenti terapeutici. Come proteine e acidi nucleici, gli oligosaccaridi sono notevolmente suscettibili alla biodegradazione, limitandone la loro applicazione terapeutica. La ricerca si è quindi indirizzata verso la progettazione e la sintesi di analoghi stabili metabolicamente.

Il centro anomero è la zona più suscettibile all'attacco enzimatico o chimico, perciò sono stati sviluppati diversi isosteri, che minimizzassero la reattività di questa posizione attraverso la sostituzione dell'atomo di ossigeno anomero oppure, più raramente, di quello inserito nell'anello piranosico o furanosico. In quest'ultimo caso si parla di pseudo zuccheri. Queste variazioni possono influire notevolmente sulla disposizione nello spazio dell'oligosaccaride.

I tioglicosidi, aventi un atomo di zolfo in posizione anomeric, rappresentano gli analoghi con minor differenze rispetto agli *O*-glicosidi naturali.³ La buona nucleofilicità dello zolfo ha permesso lo sviluppo di un gran numero di processi sintetici che portassero alla formazione di tioglicosidi,^{4,5} tra cui anche efficienti sintesi iterative (Schema 1). Qui è riportato in particolare l'interessante approccio di Driguez e collaboratori,⁶ in cui un *S*-acetil tiolo (**1**) viene deprotetto selettivamente in presenza di dietilammina, trasformandosi in un potente nucleofilo in grado di attaccare il triflato-derivato (**2**). Il disaccaride ottenuto può dare un nuovo ciclo di reazioni, una volta rimosso in *S*-tritele e successiva conversione in *S*-acetile



Schema 1. a) Et_2NH ; b) H^+ ; c) Ac_2O .

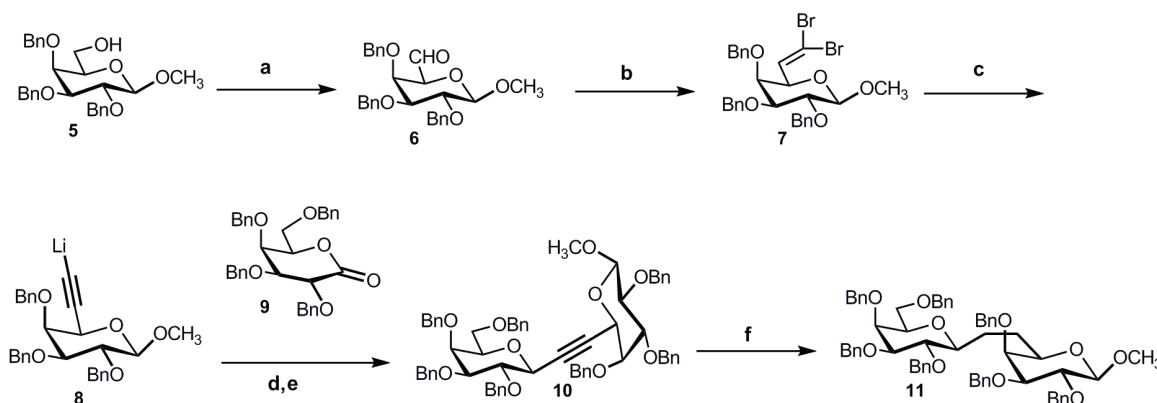
Pur avendo una stabilità di svariati ordini di grandezza più alta rispetto ai loro analoghi naturali, possono comunque essere attaccate dalle glicosidasi.⁷ I *C*-glicosidi possiedono un atomo di carbonio in posizione anomeric e possiedono una stabilità particolarmente elevata. Tale caratteristica rende questi substrati dei target molto preziosi per studi biologici. In questo capitolo si concentrerà esclusivamente sulla trattazione di quest'ultimi.

La sintesi dei *C*-glicosidi comporta due principali problematiche: la formazione di un legame carbonio-carbonio in posizione anomeric sotto il controllo stereochimico e la compatibilità della condizioni di reazione con i gruppo protettivi sugli alcoli. La reazione di glicosilazione solitamente avviene attraverso la reazione di un donatore glicosidico elettrofilo con un nucleofilo, oppure tra un donatore glicosidico nucleofilo ed un elettrofilo.⁸ La reazione di Wittig può rappresentare un altro facile accesso ai *C*-glicosidi. Una quarta possibilità, più rara, è rappresentata dalle reazioni di accoppiamento radicaliche.⁹

Questi metodi sono utili soprattutto per sviluppare dei C-glicosidi di monosaccaridi, ma diventano di difficile applicazione per la sintesi di oligosaccaridi. Il numero di approcci possibili in questo caso è piuttosto esiguo.

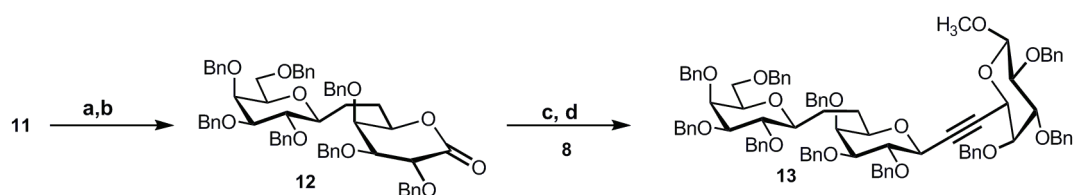
2.2 Sintesi di C-oligosaccaridi per approccio ionico.

E' stato il primo metodo sviluppato per la sintesi di un C-disaccaride. Questo approccio (Schema 2) prevede l'attacco di un acetiluro-derivato (**8**) su glicolactone (**9**). Il primo viene ottenuto attraverso l'ossidazione dell'alcool primario in posizione 6 ad aldeide, successiva conversione ad dibromoleifina che, in presenza di Buli, si converte nel corrispondente acetiluro di litio. Si ottiene una miscela dei due anomeri, che per trattamento con Et₃SiH e BF₃·EtO₂ da il corrispondente prodotto desossigenato esclusivamente come anomero β. L'alchino di sostituito viene ridotto per dare il C-glicoside desiderato.¹⁰



Schema 2. Reagenti e condizioni: a) PCC, CH₂Cl₂, 84%; b) CBr₄, Ph₃P, CH₂Cl₂, 87%; c) *n*BuLi (2 equiv.), THF, -78 °C → -20 °C; d) THF, -78 °C → r. t., 75%; e) Et₃SiH, BF₃ · OEt₂, CH₂Cl₂/CH₃CN, 82%; f) H₂, Pd/C, MeOH, AcOEt, 90%

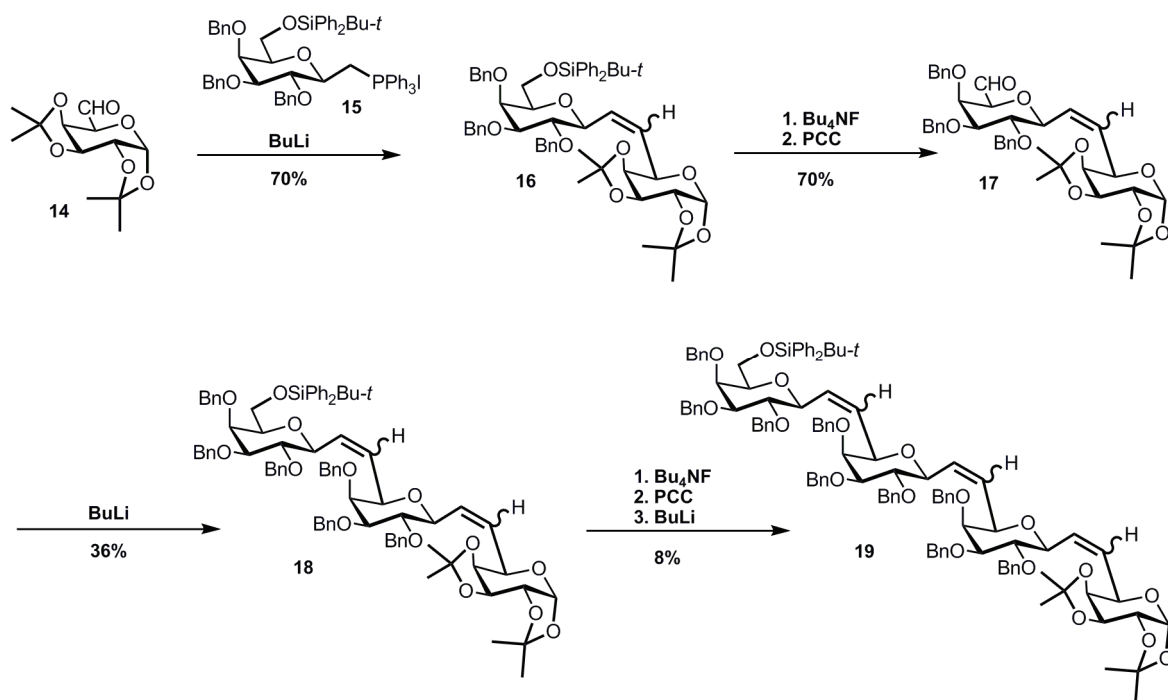
La catena può essere ulteriormente allungata mediante ossidazione della posizione anomeric a lattone e successiva attacco di una nuova unità di acetiluro,¹¹ o idealmente per de protezione selettiva dell'alcol primario, che dopo ossidazione ad aldeide, può essere nuovamente convertito in acetililene (Schema 3).



Schema 3. Reagenti e condizioni: a) H_2SO_4 , AcOH, 60°C , 15 h, 71%; b) PCC, 4-Å molecular sieves, CH_2Cl_2 , 87%; c) THF, $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{r. t.}$, 67%; d) Et_3SiH , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$, 82%.

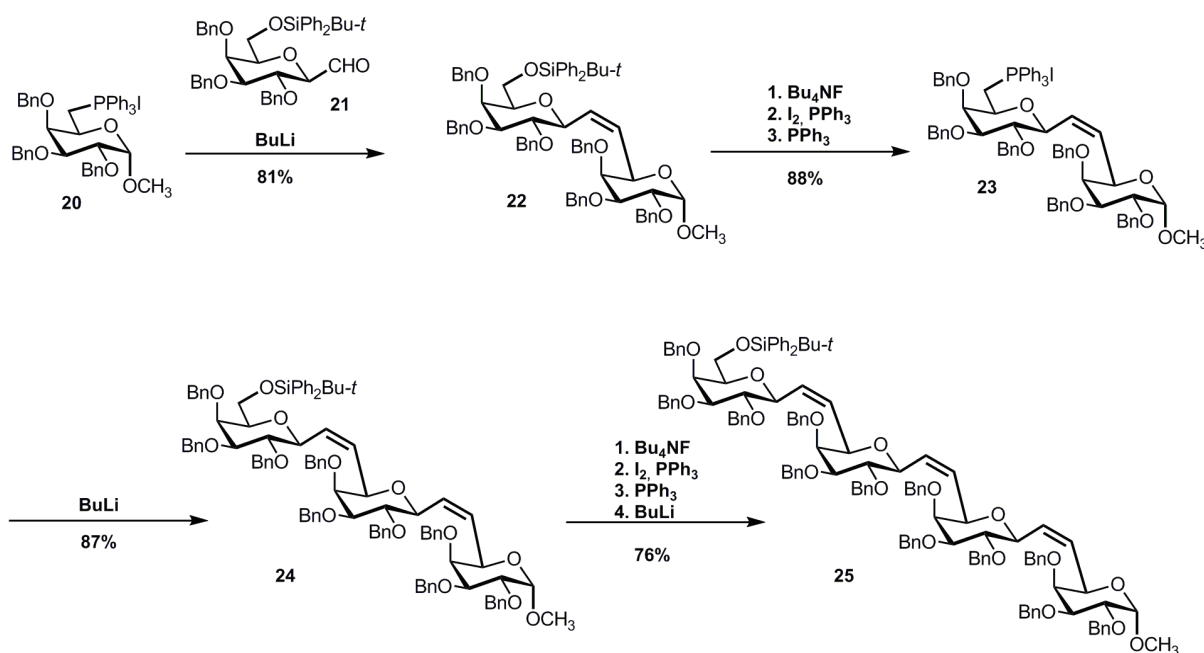
2.3 Sintesi di C-oligosaccaridi mediante reazione di Wittig.

Questo approccio, sviluppato dal gruppo di ricerca, prevede la reazione di una ilide generata in situ (**15**) con un'aldeide (**14**). Si forma un alchene (**16**) che, attraverso la deprotezione selettiva dell'alcool primario -rimuovendo il gruppo *t*-butildifenilsilil- può formare nuovamente l'aldeide (**17**) e dare un nuovo ciclo di reazione.¹² Purtroppo le rese di reazione crollano all'aumentare della lunghezza della catena.



Schema 4.

Un incremento delle rese è stato ottenuto invertendo l'approccio sintetico e quindi andando a rigenerare l'ilide (Schema 5).¹³ L'oligomero ottenuto viene infine idrogenato per rimuovere i gruppi benzilici, con contemporanea riduzione dei doppi legami.¹⁴ Questo via sintetica è stata poi estesa anche a diversi substrati zuccherini.¹⁵

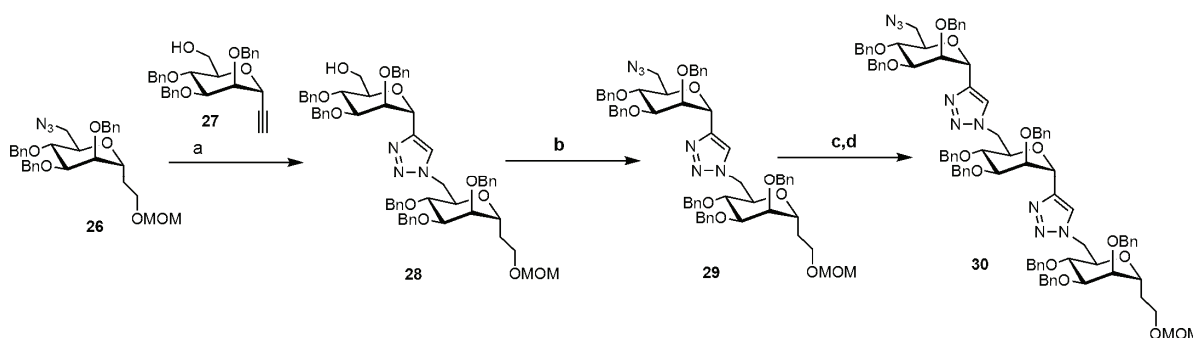


Schema 5.

2.4 Sintesi di C-oligosaccaridi mediante Click-chemistry.

Anche questo approccio è stato sviluppato dal gruppo di ricerca di Dondoni e fa uso di una reazione ampiamente conosciuta, che verrà trattata nei dettagli nel capitolo successivo. Rispetto agli analoghi precedenti, in cui l'ossigeno era sostituito da un gruppo metilenico, abbiamo un anello triazolico.

Lo schema sintetico (Schema 6) prevede la reazione tra un azide (**26**) e un alchino (**27**) formando il corrispondente cicloaddotto (**28**) con ottime rese. L'elongazione della catena è ottenuta attraverso la conversione dell'alcool primario in azide (**29**).¹⁶ Questo metodo offre il vantaggio di mantenere praticamente costanti le rese all'aumentare della complessità della molecola e sembra perciò l'approccio più adeguato per lo sviluppo di oligosaccaridi a lunga catena.



Schema 6. a) CuI, *i*-Pr₂EtN, DMF, MW, 80 °C, 15 min, 80%; b) DPPA, DBU, DMF, MW, 130 °C, 2 h, 81%; c) CuI, *i*-Pr₂EtN, DMF, MW, 80 °C, 15 min, 87%; b) DPPA, DBU, DMF, MW, 130 °C, 2 h, 85%.

2.5 Sintesi di C-oligosaccaridi attraverso metodi alternativi.

Esistono altri approcci per ottenere C-glicosidi di di- o tri-saccaridi. Uno dei metodi più classici è la sintesi *de novo*, in cui lo scheletro zuccherino viene parzialmente ricostruito.^{17,18} Sono stati sviluppati diversi disaccaridi per cross-metatesi^{19,20} o attraverso condensazione nitro-aldolica.²¹ Tutti questi metodi, pur molto interessanti, mal si adattano ad una applicazione iterativa.

2.6 Bibliografia.

1. Inbar, M. LEO Sachs, L. *Nature* **1969**, 223, 710-712.
2. Brandley, B. K.; Sweidler, S. J.; Robbins, P. W. *Cell* **1990**, 63, 891-898.
3. Driguez, H. *ChemBioChem* **2001**, 2, 311-318.
4. Pachamuthu, K. Richard R. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 160-187.
5. Michele Fiore, Alberto Marra, and Alessandro Dondoni *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 4422–4425.
6. Ratajczak, F.; Greffe, L.; Cttaz, S.; Driguez, H. *Synlett* **2003**, 1253.
7. Rich, J. R.; Szpacenko, A.; Palcic, M. M.; Bundle D. R. *Angew. Chem.* **2004**, 116, 623–625.
8. Dondoni, A.; Marra A. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4395-4421.
9. Hideya, Y.; Hironobu, H. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **2001**, 13, 31-55.
10. Rouzad, D.; Sinay, P. J. *Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 1353-1358.
11. Xin, Y-C. ; Zhang, Y-M.; Mallet, J-M.; Glaudemans, C. P. J.; Sinay, P. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2, 471-476.
12. Alessandro Dondoni, A.; Kleban, M.; Zuurmond, H.; Marra A. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 7991-7994.
13. Dondoni, A.; Mizuno, M.; Marra A. *Tetrahedron Letters* **2000**, 41, 6657-6660.
14. Dondoni, A.; Marra A.; Mizuno, M.; Giovannini, P. P. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4186-4199.
15. Dondoni, A.; Marra A. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, 4067–4071.
16. Cheshev, P.; Marra A.; Dondoni, A. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 3225-3227.
17. Wei, A.; Haudrechy, A.; Audin, C.; Jun, H-S.; Haudrechy-Bretel, N.; Yoshito *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2160-2169.
18. Sutherlin, D. P.; Armstrong, R. W. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 5267-5283.
19. G. X.; Todd L. Lowary, T. L. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 4561–4564.
20. Postema, M. H. D.; Piper, J. L.; Komanduri, V.; Liu, L. *Angew. Chem.* **2004**, 116, 2975 –2978.
21. Gurjar, M. K.; Nagaprasad, R.; Ramana, C. V. *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, 7577–7579.

3.1 Introduzione.

Il concetto di “*click chemistry*” fu elaborato per la prima volta nel 2001 da Karl B. Sharpless¹ per indicare reazioni chimiche con particolari caratteristiche.

“The reaction must be modular, wide in scope, give very high yields, generate only inoffensive byproducts that can be removed by non chromatographic methods, and be stereospecific (but not necessarily enantioselective).

The required process characteristics include simple reaction conditions (ideally, the process should be insensitive to oxygen and water), readily available starting materials and reagents, the use of no solvent or a solvent that is benign (such as water) or easily removed, and simple product isolation.”

K. B. Sharpless in “Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions.”¹

In altre parole le reazioni di click chemistry sono un modo rapido, semplice ed efficiente per assemblare molecole, anche assai differenti, in modo regioselettivo e stereoselettivo, minimizzando le problematiche di compatibilità con i diversi gruppi funzionali e potendo usare un ampio ventaglio di condizioni di reazione.

Essendo criteri parzialmente soggettivi, negli anni sono state evidenziate diverse reazioni che soddisfacevano tali principi. Uno dei primi esempi di “*click reaction*” è la cicloaddizione rame(I) catalizzata tra un' azide ed un alchino terminale a formare un eterociclo a 5 termini chiamato 1,2,3-triazolo. Questa è la reazione di click chemistry più nota e potente ed è spesso identificata semplicemente come reazione “click”. Esistono comunque anche altre reazioni efficienti, anche se non sempre è facile sintetizzare le molecole di partenza con gli opportuni gruppi funzionali in grado di dare la reazione di coupling.²

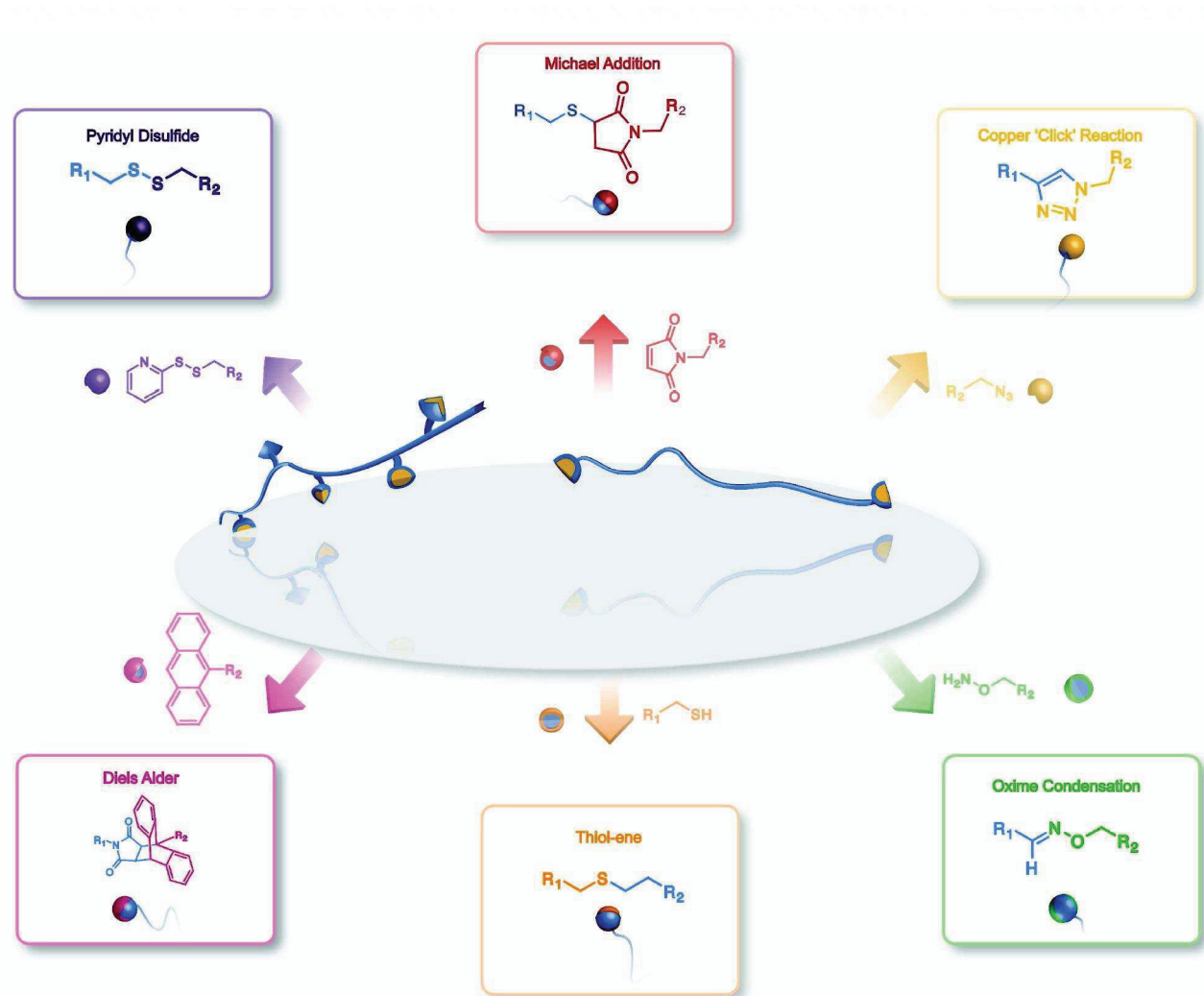


Figura 1.

Reazioni di Diels-Alder. Le Diels-Alder sono in possesso delle tipiche caratteristiche di una reazione di click, essendo specifiche, efficienti e dotate di atom-economy.³ Sviluppata per la prima volta nel 1928,⁴ rispetto alle altre reazioni di click, in cui si forma un legame carbonio-eteroatomo, si ha in genere la formazione di un legame carbonio-carbonio tra il diene e il dienofilo elettron-povero. Parte dell'interesse suscitato da questa metodica è dovuto alla possibile reversibilità della reazione, per retro-Diels-Alder,⁵ che potrebbe permettere l'attacco e il distacco di specifiche molecole in determinate condizioni. Le Diels-Alder sono state ampiamente utilizzate per la sintesi di polimeri,⁶ dendrimeri,^{7,8} macromolecole⁹ e perfino per immobilizzare macromolecole biologiche su superfici^{10,11} o nanoparticelle.¹²

Addizioni di Michael. Un'altra reazione di click chemistry è l'addizione di Michael di tioli su sistemi α,β -insaturi,¹³ in particolare su derivati della maleimmide (Figura 2).¹⁴ Si tratta di una reazione regioselettiva, ma non stereoselettiva, poiché si viene a formare una miscela dei due possibili stereoisomeri. Questo approccio si è sviluppato soprattutto per funzionalizzare materiale biologico, grazie alla selettività di reazione e sulla possibilità di avvenire con estrema facilità anche in condizioni fisiologiche. Pur essendo relativamente poco abbondante, le moderne tecniche di manipolazione del DNA permettano un facile accesso a proteine mutate selettivamente, in cui sono state inserite cisteine in specifiche posizioni, al fine di ottenere dei tioli liberi in grado di dare reazione di Michael.¹⁵

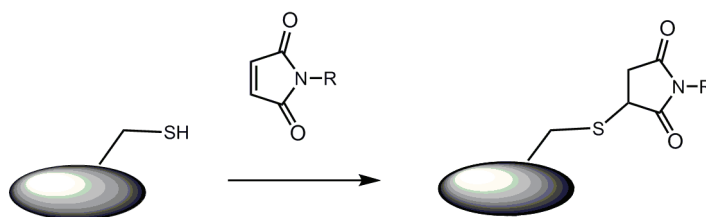


Figura 2.

Reazione di Tiol-ene. Negli ultimi anni è stata riscoperta anche un'altra reazione che coinvolge i tioli a cui ha contribuito anche il gruppo di ricerca di Dondoni: la thiol-ene chemistry.¹⁶ Si tratta di una reazione di addizione radicalica tra un tiolo ed un alchene per dare il corrispondente tioetere anti-Markovnikov (Figura 3), che è stata a lungo confinata nella chimica dei materiali,¹⁷ ma che sta trovando rapidamente nuove ed interessanti applicazioni.¹⁸ L'enorme potenziale di questa metodica è dato dalla possibilità di effettuare la reazione per via fotochimica, senza l'ausilio di catalizzatori metallici e anche in ambiente acquoso.

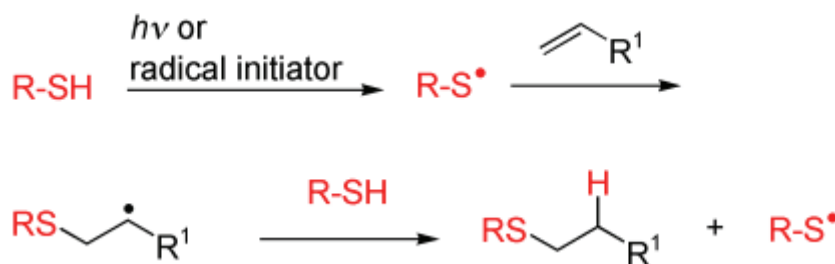


Figura 3.

Piridil-disolfuri. I derivati dei piridil-disolfuri hanno un ponte disolfuro particolarmente attivato, che in presenza di tioli liberi, sono in grado di dare facilmente reazioni di cross-linking, con la formazione di un nuovo e più stabile ponte disolfuro (Figura 4). Anche questa tecnica è stata ampiamente utilizzata per funzionalizzare macromolecole biologiche,¹⁹ biomateriali^{20,21} e polimeri.²² Ciò che rende questo approccio poco utilizzato è la relativa instabilità del legame disolfuro, che in condizioni riducenti, o in presenza di altri tioli liberi, può essere facilmente rotto.

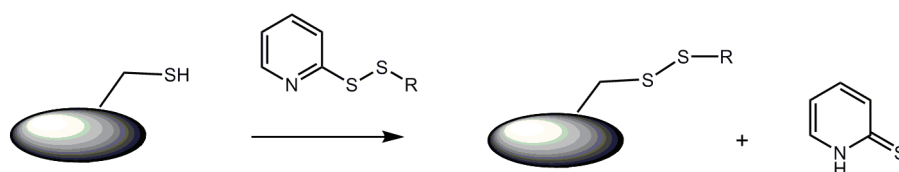


Figura 4.

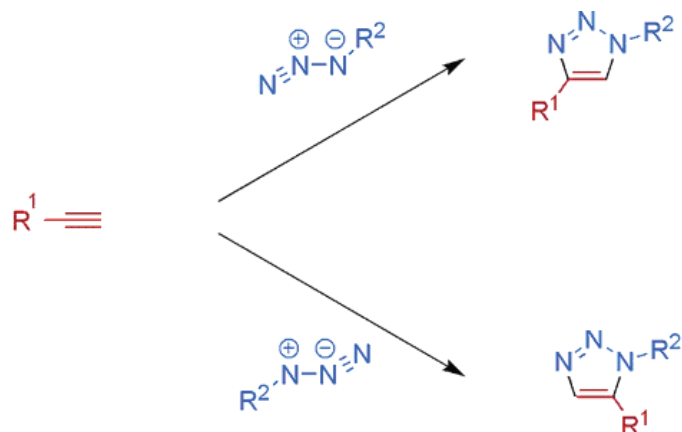
Formazioni di ossime. E' noto da tempo che derivati dell'idrossilammina reagiscono facilmente con i composti carbonilici per dare una condensazione che porta alla formazione di un ossima. Questa reazione è stata sfruttata anche per legare tra di loro molecole diverse in condizioni click, soprattutto per la formazione di polimeri²³ o biopolimeri,²⁴ essendo efficace anche in ambiente acquoso.

Altre reazioni di click-chemistry. A seconda dei substrati e delle condizioni, ci sono molte altri metodi di coupling da poter considerare reazioni click, come l'apertura di epossidi o aziridine. Queste reazioni, pur soddisfacendo molti criteri appartenenti alla click-chemistry, hanno l'inconveniente di partire da reagenti instabili o molto reattivi, rendendole poco regioselettive in presenza di molti gruppi funzionali.

3.2 La cicloadizione tra azide ed alchino catalizzata da Cu(I) o CuAAC.

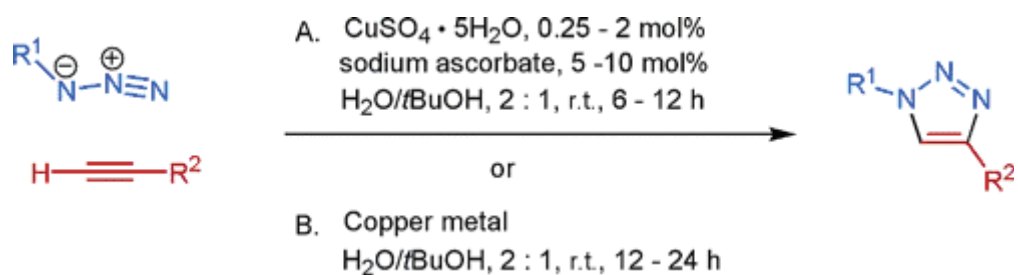
La cicloadizione 1,3-dipolare tra un alchino ed un azide è conosciuta da decenni come cicloadizione di Huisgen.²⁵

Veniva condotta per semplice riscaldamento dei due reagenti, ma ha trovato scarsa applicazione in sintesi organica in quanto scarsamente regioselettiva. Infatti, poiché l'orientamento relativo dell'alchino e dell'azide durante la cicloaddizione è praticamente casuale, si ottengono miscele di triazoli disostituiti in posizione 1,4 e 1,5 (Schema 1).



Schema 1.

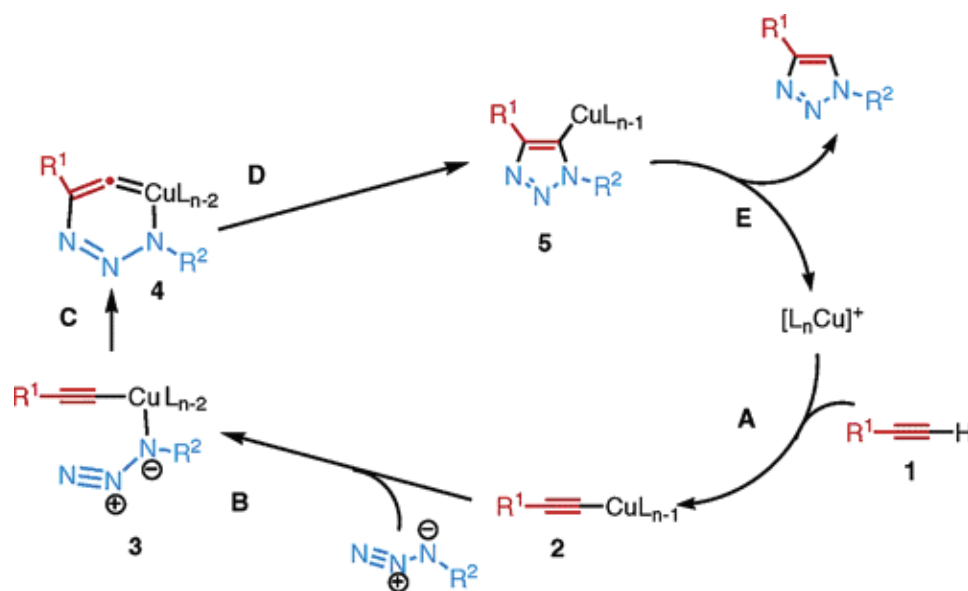
Nel 2002 è stata descritta per la prima volta in lavori contemporanei e indipendenti da Meldal²⁶ e Sharpless²⁷ una variante in cui si utilizzava un sale di rame(I) come catalizzatore (Schema 2). Con questa semplice modifica si ottiene non solo un notevole incremento della velocità di reazione, tale da non richiedere prolungati riscaldamenti, ma anche una totale regioselettività a favore dell'isomero 1,4-disostituito.



Schema 2.

Il meccanismo proposto da Sharpless prevede diversi passaggi (Schema 3). Il ciclo catalitico inizia con la formazione dell'intermedio chiave **2**, un acetiluro di rame formato in situ per reazione dell'alchino terminale con sale di rame(I).

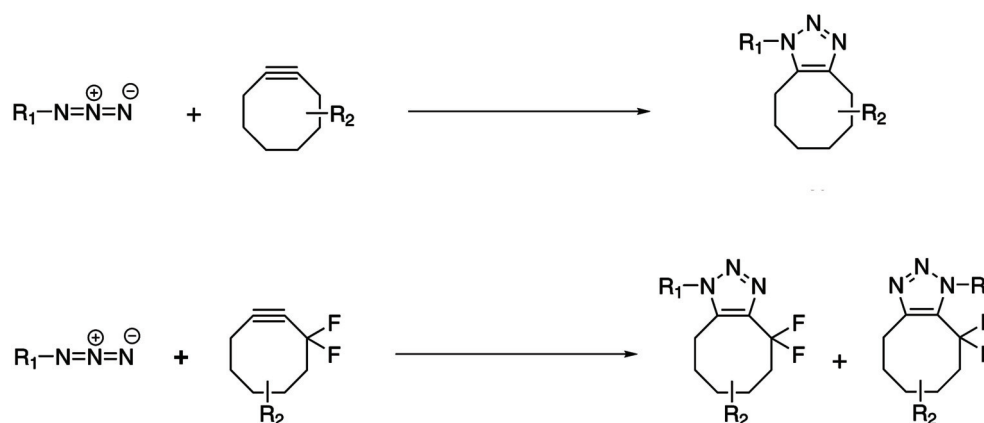
Calcoli teorici²⁸ hanno dimostrato che il passaggio diretto da **2** a **5**, attraverso un meccanismo di tipo concertato, è fortemente sfavorito, e probabilmente la reazione procede per tappe (B→C→D), con la formazione dell'intermedio a sei termini **4**.



Schema 3.

L'estrema efficienza chimica di questa reazione, la sua regioselettività e la tolleranza delle più svariate condizioni sperimentali, la rende particolarmente utile nella costruzione di strutture organiche complesse, come ad esempio *clusters*, dendrimeri, polimeri, peptidi e macrocicli. Il triazolo può essere considerato come una “keystone”,²⁹ una unità centrale indispensabile per tenere insieme gli altri elementi della struttura.

Negli ultimi anni si è sviluppata la ricerca di metodi che permettessero di evitare l'uso di catalizzatori, in particolare per applicazioni biologiche, considerando l'elevata biotossicità del rame. Nel 1961, Wittig e Krebs hanno osservato che la reazione “neat” tra il cicloottino, il più piccolo cicloalchino stabile, e la fenil-azide, “procedette come un'esplosione per dare un unico prodotto,” il triazolo.³⁰ I triplo legame, essendo circoscritto nell'anello, ha un angolo di legame di 163° .³¹ Questa destabilizzazione dello stato fondamentale, rispetto allo stato di transizione della reazione, fornisce un'accelerazione della cicloadizione,³² che può quindi avvenire anche in assenza di catalizzatore, naturalmente perdendo la regioselettività (Schema 4).



Schema 4.

Bertozzi e collaboratori³³ sono stati i primi ad intuire l'enorme potenzialità di questa reazione e applicarla su sistemi biologici in vivo,³⁴ sviluppando tutta una classe di ciclottrini variamente sostituiti³⁵ e sempre più efficienti anche in ambiente acquoso.³⁶ In questo modo è stato possibile funzionalizzare in vivo cellule, che avevano precedentemente espresso sulla propria parete uno zucchero avente un azido gruppo in grado di cicloaddurre con un cicloottino avente legato un *tag* fluorescente (Figura 5).

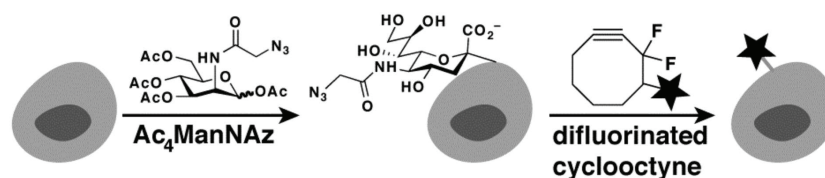


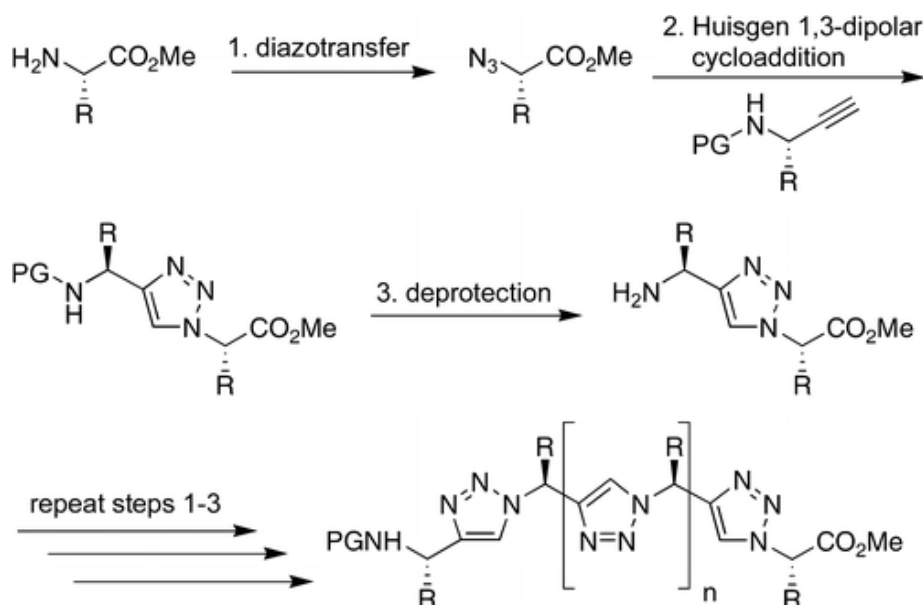
Figura 5.

In generale la reazione di cicloaddizione CuAAC è stata ampiamente sfruttata, in particolar modo nel campo della sintesi di sistemi glicosilati, in quanto, oltre ai vantaggi sopra elencati, possiede due fondamentali caratteristiche: si tratta di una reazione estremamente chemoselettiva, per cui può essere usata per funzionalizzare molecole complesse con tanti gruppi funzionali come i carboidrati, e può essere eseguita anche su zuccheri deprotetti.

Negli ultimi anni sono stati pubblicati un numero elevato di lavori nei quali è stata sfruttata la cicloaddizione azide-alchino rame(I) per la sintesi di sistemi diversi glicoconiugati, come ad esempio glicoaminoacidi,³⁷ glicoproteine,³⁸ glicodendrimeri³⁹ e glicopolimeri.⁴⁰

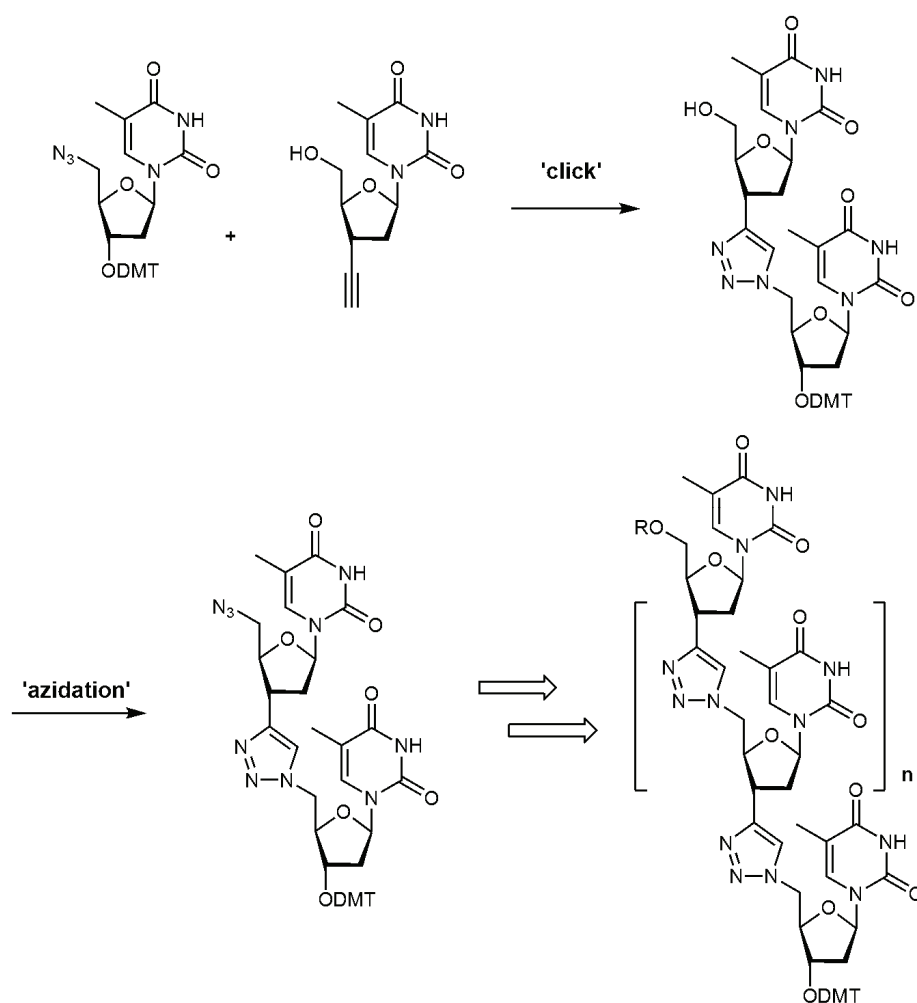
3.3 Metodi iterativi per la sintesi di oligomeri mediante cicloaddizione CuAAC.

La cicloaddizione tra un azide e un alchino può essere un metodo molto veloce e pratico per assemblare insieme le varie unità di un oligomero in modo iterativo e potenzialmente estendere tale approccio ad una sintesi supportata. In questo modo sono stati sviluppati oligonucleotidi,⁴¹ oligosaccaridi,⁴² oligopeptidi⁴³ e oligoetilenglicoli.⁴⁴ Tutte le strategie prevedono la presenza di un'unità ripetitiva e la reintroduzione di uno dei due gruppi funzionali e ciò può avvenire con modalità e efficienza assai diversa. Vediamo nel dettaglio i vari approcci che possono essere raggruppati in due categorie: quelli in cui si ri-introduce l'azido gruppo e quella in cui si rigenera alchino.



Schema 5.

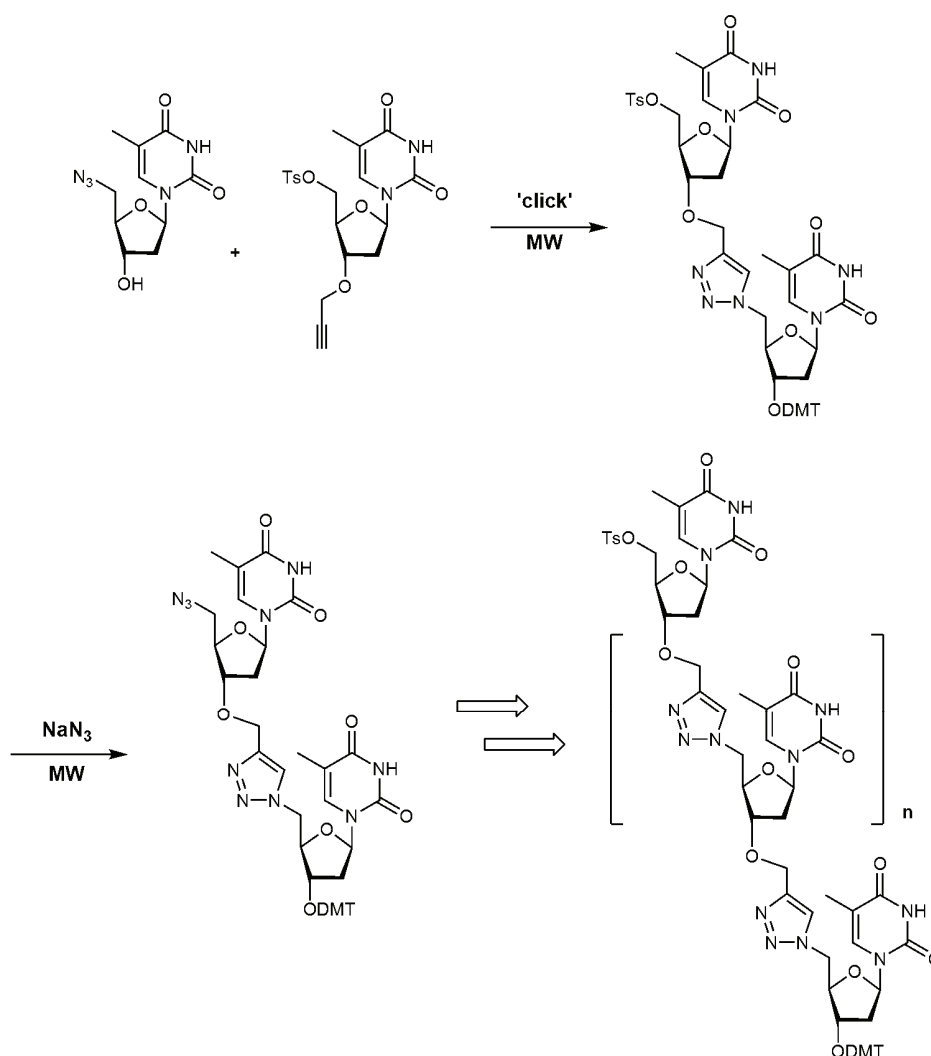
La prima via è quella più semplice ed immediata. Il lavoro di P. S. Arora⁴³ è uno primi esempi di sintesi iterativa in cui si rigenera l'azido gruppo attraverso una reazione di diazotrasfert (Schema 5). Per costruire un oligopseudopeptide, in cui il legame peptidico è sostituito da un anello triazolico, Arora ha progettato un'unità ripetitiva in cui la funzione azide è mascherata da un gruppo amino protetto come Boc. Una volta avvenuta la cicloadizione, il triazol-oligomero viene trattato con una soluzione di acido trifluoroacetico, in modo da liberare l'ammina, e quindi sottoposto alle condizioni di diazotrasfert per la rigenerazione dell'azide. Questo processo è stato ottimizzato sviluppando un metodo che permettesse una reintroduzione dell'azide e successiva reazione di click in condizioni one-pot.⁴⁵ La diazotrasfert è, infatti, catalizzata da solfato di rame, che nella forma ridotta (in presenza di ascorbato) è in grado di catalizzare anche la cicloadizione tra alchino e azide.



Schema 6.

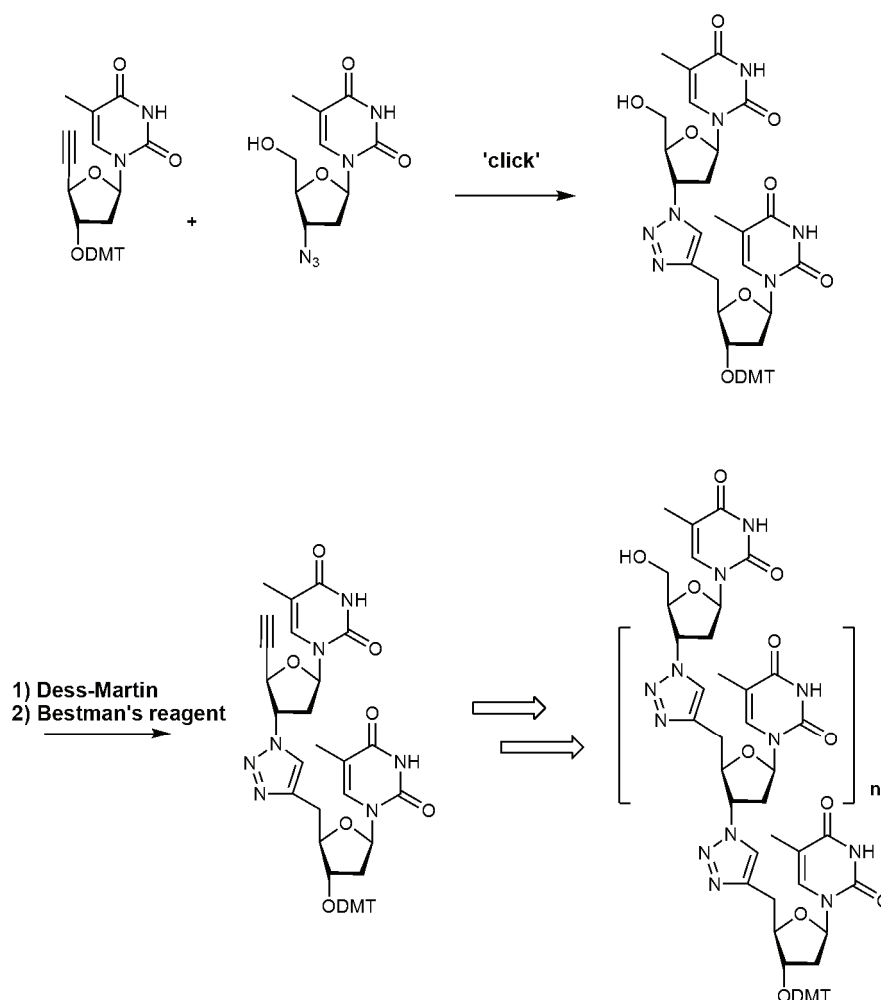
L'azido gruppo può essere introdotto anche a partire dalla funzione alcolica. E' la strategia seguita dal gruppo di ricerca di Dondoni per la sintesi di oligonucleotidi (Schema 6).⁴¹ In questo caso l'unità ripetitiva presenta un alcool primario, che dopo la cicloaddizione, può essere facilmente convertito in azide per trattamento con difenil-fosforilazide (DPPA).

Questa reazione non è molto efficiente su alcoli secondari o terziari. In questo caso bisogna attivare l'alcool come mesil-derivato o tosil-derivato. E' la scelta fatta da R. Zerrouki,⁴⁶ che per sintetizzare degli oligonucleotidi, ha utilizzato una 5-O-tosilimidina come unità ripetitiva. Il tosil-derivato, in presenza di sodio azide e sottoposto alla microonde, si converte in azide in tempi brevissimi (1 minuto). In questo modo è riuscito a sintetizzare un pentamero riducendo i tempi di reazioni totali a soli 18 minuti.



Schema 7.

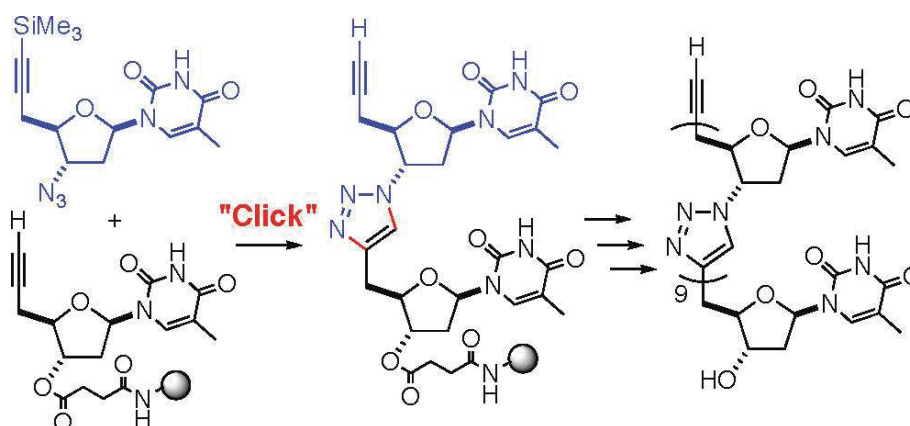
L'approccio opposto, in cui si rigenera l'alchino terminale, è stata eseguita sempre dal gruppo di ricerca di Dondoni.⁴¹ L'unità ripetitiva presenta un'alcool primario che, dopo la cicloaddizione, può essere ossidato ad aldeide con il reattivo di Dess-Martin e quindi trasformata in alchino per trattamento con il reagente di Bestman (Schema 8). Questa tecnica, pur presentando rese dignitose, mal si presta ad omologazione prolungata.



Schema 9.

Il gruppo di Isobe ha sviluppato un approccio più efficiente in cui l'unità ripetitiva presenta già i due gruppi funzionali, ma con l'alchino protetto come silyl-derivato (Schema 9).⁴⁷ In questo modo non partecipa alla reazione di click e può essere facilmente rimosso in seguito.

Questa tecnica si adatta molto bene ad una sintesi su fase solida. Attraverso ripetuti cicli di coupling/deprotezione è stato sintetizzato un decamero con una resa totale dello 0.61%.



Schema 9.

E' ovvio che, pur dimostrandosi la metodica più efficiente, non può essere applicata alla sintesi di oligomeri molto lunghi. Isobe ha quindi optato, attraverso un approccio simile a quello contemporaneamente sviluppato in questo lavoro di tesi, per una sintesi convergente, in cui oligomeri più corti sono stati sintetizzati con entrambi gli approcci (rigenerazione dell'azide e dell'alchino) e sono quindi stati uniti insieme per formare oligomeri più grandi.⁴⁸

3.4 Bibliografia.

1. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021
2. Becer, C. R.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4900–4908
3. Franc, G.; Kakkar, A. K. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 5630 – 5639.
4. Diels, O.; Alder, K.; *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, 460, 98– 122.
5. Kwart, H.; King, K. *Chem. Rev.* **1968**, 68, 415 –447.
6. Durmaz, H.; Dag, A.; Altintas, O.; Erdogan, T.; Hizal, G.; Tunca, U. *Macromolecules* **2007**, 40, 191–198.
7. McElhanon, J. R.; Wheeler, D. R. *Org. Lett.* **2001**, 3, 2681
8. Kose, M. M.; Yesilbag, G.; Sanyal, A. *Org. Lett.* **2008**, 10, 2353–2356.
9. Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 2297 – 2299.
10. Yeo, W. S.; Yousaf, M. N.; Mrksich, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14994.
11. Yousaf, M. N.; Houseman, B. T.; Mrksich, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40, 1093.
12. Proupin-Perez, M.; Cosstick, R.; Liz-Marzan, L. M.; Salgueirino- Maceira, V.; Brust, M. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, 24, 1075
13. Lin, W.; Yuan, L.; Cao, Z.; Feng, Y.; Long, L. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 5096 – 5103
14. Langmuir, M. E.; Yang, J. R.; Moussa, A. M.; Laura, R.; LeCompte, K. A. *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36(23): 3989–3992
15. Wu, W.; Hsiao, S. C.; Carrico, Z. M.; Francis, M. B. *Angewandte Chemie* **2008**, 48 (50), 9493 - 9497
16. Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1540 – 1573
17. Lowe, A. B. *Polym. Chem.*, **2010**, 1, 17-36
18. Dondoni, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8995 – 8997
19. Bontempo, D.; Heredia, K. L.; Fish, B. A.; Maynard H. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126 (47), 15372–15373
20. Kamruzzahan, A. S. M.; Ebner, A.; Wildling, L.; Kienberger, K.; Riener, C. K.; Hahn, C. D.; Pollheimer, P. D.; Winklehner, P.; Hořlzl, M.; Lackner, B.; M. Schořrkl, D.; Hinterdorfer, P.; Gruber, H. J. *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 1473-1481

21. Heredia, K. L.; Bontempo, D.; Ly, T.; Byers, J. T.; Halstenberg, S.; Maynard, H. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127 (48), 16955–16960
22. Hsiue, G-H.; Chiang, H-Z.; Wang, C-H.; Juan, T-M. *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 781-786
23. Barrett, D. G.; Yousaf, M. N. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 2029–2035
24. Godula, K.; Rabuka, D.; Nam, K. T.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4973–4976
25. Huisgen, R. in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*; Padwa, A., Ed.; Wiley: New York, **1984**; pp 1-176
26. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057.
27. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596.
28. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K.B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127 (1), 210–216
29. Dondoni A. *Chem. Asian J.*, **2007**, 2, 700.
30. Wittig, G.; Krebs, A. *Chem. Ber.* **1961**, 94, 3260-3275.
31. Meier, H.; Petersen, H.; Kolshorn, H. *Chem. Ber.* **1980**, 113, 2398-2409.
32. Shea, K.; Kim J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4846-4855.
33. Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15046-15047
34. Baskin, J. M., Prescher, J. A., Laughlin, S. T., Agard, N. J., Chang, P. V., Miller, I. A., Lo, A., Codelli, J. A., and Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, 104, 16793–7.
35. Codelli, J. A., Baskin, J. M., Agard, N. J., and Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 11486–11493.
36. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Org Lett.* **2008**; 10(14),3097–3099.
37. Dondoni, A.; Giovannini, P. P.; Massi, A. *Org. Lett.* **2004**, 6, 2929 –2932;
38. van Kasteren, S. I.; Kramer, H. B.; Gamblin, D. P.; Davis B. G. *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 3185-3194
39. Fernandez-Megia E.; Correa J.; Rodriguez-Meizoso I.; Riguera R. *Macromolecules*, **2006**, 39, 2113.
40. Ladmiral V.; Mantovani G.; Clarkson G. J.; Cauet S.; Irwin J. L.; Haddleton D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4823

41. Nuzzi, A.; Massi, A.; Dondoni, A. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, 26 (11-12), 1191 – 1199
42. Cheshev, P.; Marra, A.; Dondoni, A. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 3225 – 3227.
43. Angelo, N. G.; Arora, P. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 17134-17135
44. Lu, G.; Lam, S.; Burgess, K. *Chem. Commun.*, **2006**, 1652–1654
45. Angelo, N. G.; Arora, P. S. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 7963-7967
46. Lucas, R.; Zerrouki, R.; Granet, R.; Krausz, P.; Champavier, Y. *Tetrahedron* **2008**, 64, 5467–5471
47. Isobe, H.; Yamazaki, N.; Guillot-Nieckowski, M.; Nakamura, E. *Org. Lett.*, **2008** 10(17), 3729-3732.
48. Fujino, T.; Yamazaki, N.; Isobe, H. *Tetrahedron Letters* **2009**, 50, 4101–4103

4.1 Introduzione.

Partendo dalle premesse espresse nei capitoli precedenti, in questo lavoro di tesi si è eseguita la sintesi e la valutazione biologica di oligomannosidi come analoghi dei lipomannani e potenziali inibitori della biosintesi della parte batterica del *Mycobacterium tuberculosis*. Recuperando l'intuizione di Watt e Williams,¹ si è sviluppato analoghi aventi la posizione C-6 terminale desossigenata, al fine di impedire l'azione delle α -1,6-mannosiltrasferasi poliprenol monofosfomannosil dipendenti.

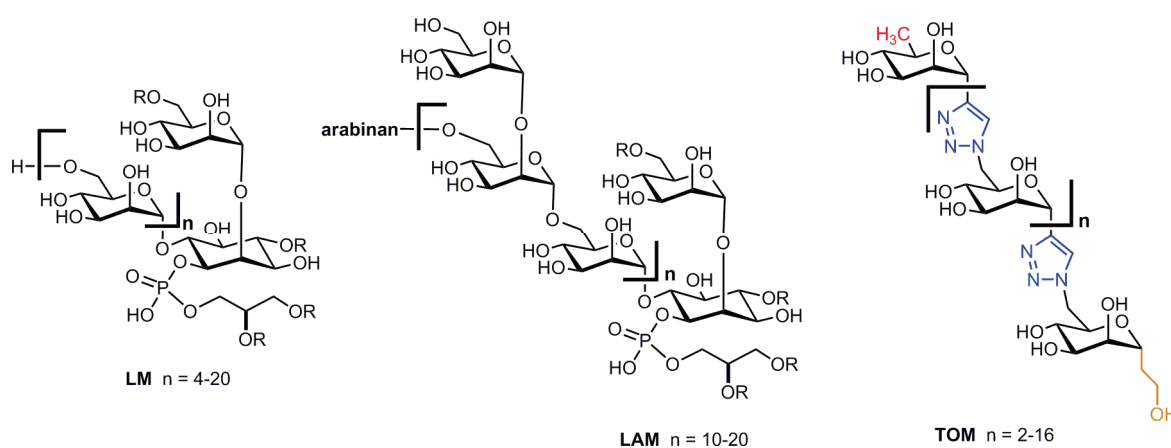


Figura 1.

Sono stati sintetizzati oligomeri con lunghezza variabile (2-16 unità), in modo da stabilire in modo chiaro ed univoco quanto la lunghezza della catena mannosidica possa influire positivamente sul grado di inibizione. Al fine di rendere queste molecole più interessanti dal punto di vista farmacologico, il legame *O*-glicosidico è stato sostituito dal corrispondente analogo *C*-glicosidico, mediante l'utilizzo di un anello triazolico come linker, che può essere facilmente ottenuto per semplice cicloaddizione tra un azide e un alchino (Figura 1). Questa sostituzione dovrebbe rendere la molecola estremamente stabile all'idrolisi acida e all'attacco enzimatico ad opera delle glicosidasi, fornendo dati sicuri e riproducibili sulla capacità inibitoria. D'altra parte, l'anello triazolo può formare legami a idrogeno e interazioni dipolo, in modo da favorire i processi di riconoscimento molecolare e migliorare la solubilità.

La sintesi di una catena “triazolmannosidica” (**TOM**) era stata in precedenza sviluppata dal gruppo di ricerca di Dondoni su un lavoro preliminare e propedeutico.² Tale approccio prevede la sintesi di due building block: una piattaforma **1** e un’unità ripetitiva **2** (Figura 2).

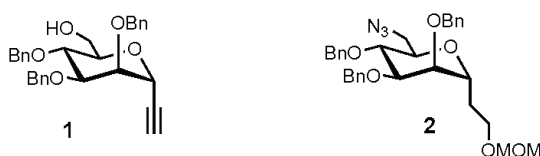
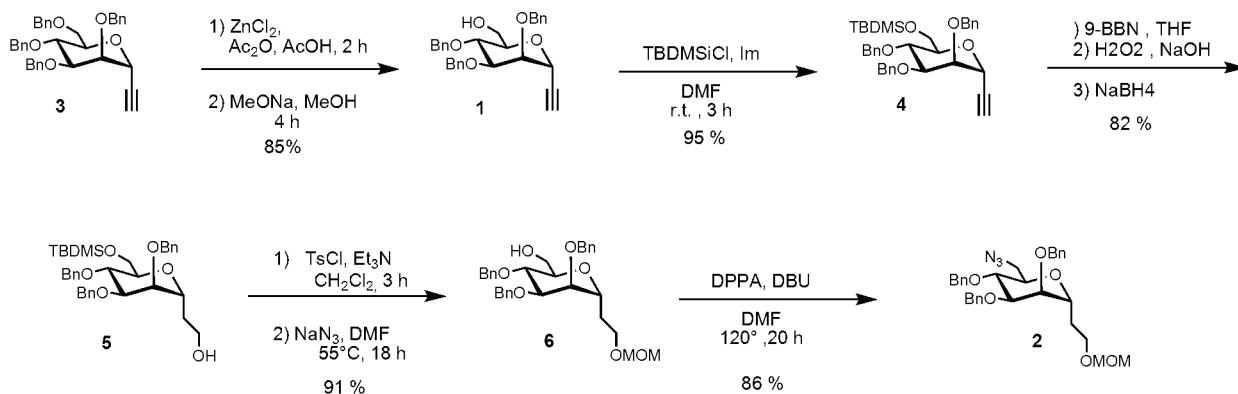


Figura 2.

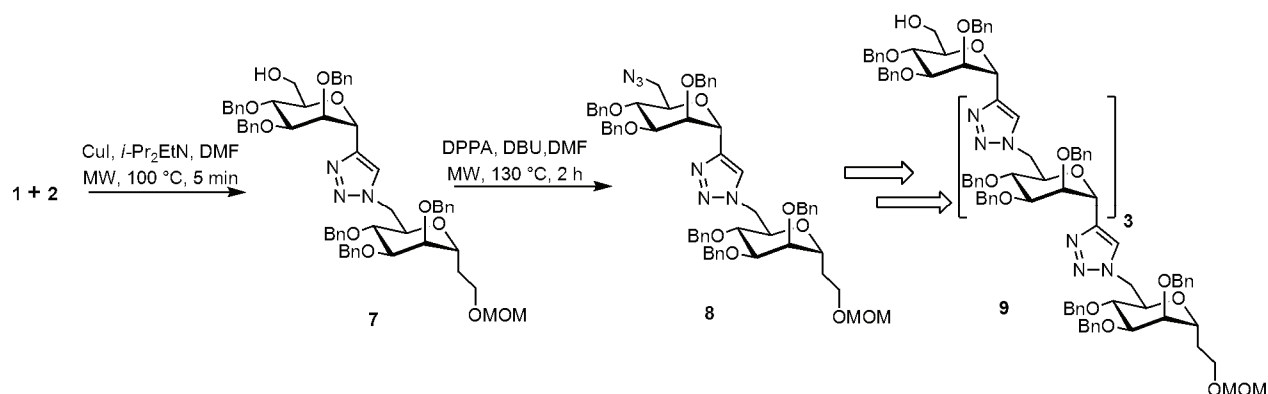
Le due unità ripetitive sono sintetizzate partendo dallo stesso precursore, l’ etinil α -C-mannoside perbenzilato **3**.³ Quest’ultimo, attraverso una debenzilazione selettiva dell’alcool primario per acetolisi in presenza di cloruro di zinco⁴ e successiva deacetilazione, fornisce direttamente l’unità ripetitiva **1**. Da questa si ottiene infine la piattaforma **2**, attraverso sei passaggi che portano alla riduzione dell’alchino e all’inserimento dell’azido gruppo (Schema 1).



Schema 1.

L’unità ripetitiva quindi presenta un alchino terminale e un alcool primario, che, dopo la cicloaddizione, può rigenerare l’azide per trattamento con difenilfosforilazide (DPPA).

Attraverso quattro cicli di reazione, è stato possibile sintetizzare un pentamero, **9**, con una resa totale del 28% (schema 2). Le reazioni sono state eseguite anche con l'ausilio delle microonde mantenendo in pratica inalterate le rese, ma riducendo notevolmente i tempi di reazione.



Schema 2.

4.2 Sintesi degli oligomannosiltriazoli.

Per preparare gli oligomannosidi, si è dapprima sviluppato una strategia lineare di oligomerizzazione basata sulla reazione di click CuAAC (Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition).⁵ Pur rappresentando un ottimo approccio, la rigenerazione dell'azide sembra essere troppo laboriosa e inefficiente per la sintesi di oligomeri molto lunghi e complessi. E' per questo motivo che si è cercato di sviluppare una metodica alternativa e complementare, che permettesse di rigenerare l'alchino.

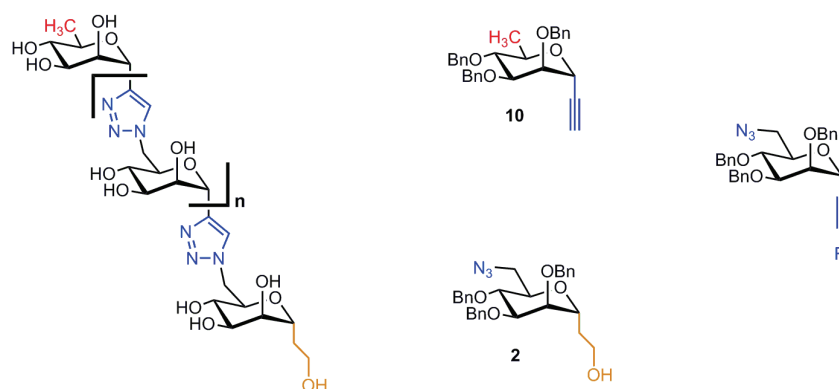
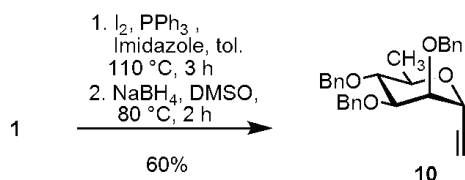


Figura 3

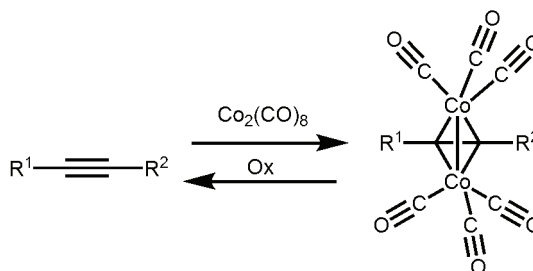
Devono quindi essere progettati tre building block (Figura 3): un'estremità iniziale avente la posizione 6 desossigenata (**10**); un unità ripetitiva in cui è presente contemporaneamente un azide e un alchino mascherato; e un'estremità finale per chiudere la catena. Per quest'ultima si è utilizzato direttamente l'idrossietil 6-azidomannoside protetto come MOM (**2**), sviluppato nel lavoro precedente, poiché per semplice idrolisi acida si ottiene un ossidrile libero adatto per legare degli acidi grassi tramite esterificazione, al fine di mimare meglio le strutture naturali. L'etnil 6-desossi mannoside **10** può essere facilmente ottenuto dal composto **1** visto in precedenza, attraverso il suo corrispondente iodo-derivato e successiva riduzione con NaBH_4 (Schema 3).



Schema 3.

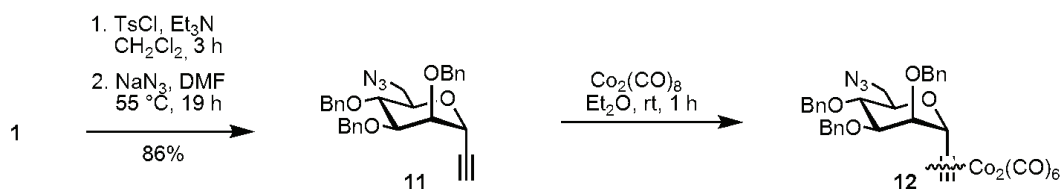
4.2.1 Il Cobalto ottacarbonile.

Non esistono molti modi per proteggere o mascherare un alchino terminale. Il cobalto ottacarbonile è un reagente che, selettivamente e senza l'ausilio di nessun catalizzatore, si coordina direttamente con gli alchini, formando un complesso esacarbonilico stabile e isolabile (Schema 4).



Schema 4.

Questo complesso è largamente usato in sintesi organica, ad esempio come reattivo di partenza nella reazione di Pauson-Khand,⁶ oppure per mascherare temporaneamente l'alchino.⁷ La rimozione del cobalto avviene per ossidazione del monossido di carbonio ad anidride carbonica, che quindi non può più fungere da ligante, attraverso l'esposizione ai più comuni agenti ossidanti come l'NMO (*N*-metil morfolina *N*-ossido) o lo iodo elementare. Questo complesso avrebbe potuto rappresentare la soluzione ideale per proteggere temporaneamente l'alchino (**11**), possedendo una procedura di inserzione e rimozione molto semplici (Schema 5).



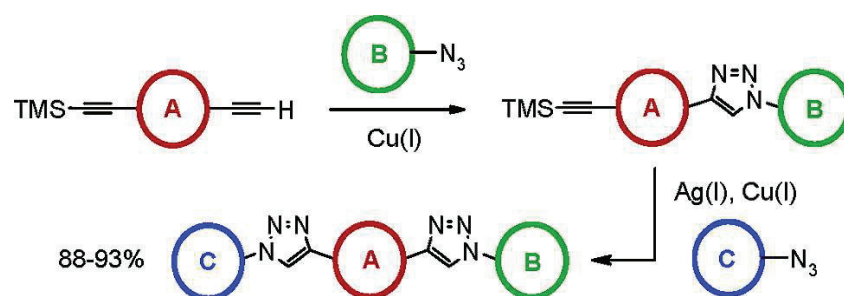
Schema 5

Purtroppo queste caratteristiche si riflettono anche sulla relativa instabilità alle condizioni di click chemistry. Nelle classiche condizioni di cicloaddizione catalizzata da CuI e di-isopropilettilammina (DIPEA), si ha una parziale deprotezione dell'alchino e le rese di coupling sono molto basse. Probabilmente è la nucleofilicità dell'ammina a rendere il complesso instabile, andando a scalzare le molecole di monossido di carbonio e sostituendosi come ligante. E', infatti, noto che l'etilendiammina è usata come agente decompressante.⁸

Un incremento delle rese si ottiene sfruttando la catalisi indotta dalle nanoparticelle di Cu(0), che in ambiente lievemente acido si ossida parzialmente a Cu(I). Queste piccole quantità bastano a catalizzare la reazione di cicloaddizione. Purtroppo, anche applicando queste condizioni, l'ulteriori omologazioni procedono con drastiche riduzioni delle rese. In particolare si nota la formazione di complessi stabili tra gli oligomeri e il cobalto, anche dopo il processo di ossidazione del monossido di carbonio, che forse nascono dalla coordinazione offerta dagli anelli triazolici. L'uso del cobalto ottacarbonile risulta quindi del tutto insoddisfacente per un processo di elongazione iterativo, ma potrebbe essere comunque interessante per applicazioni semplificate.

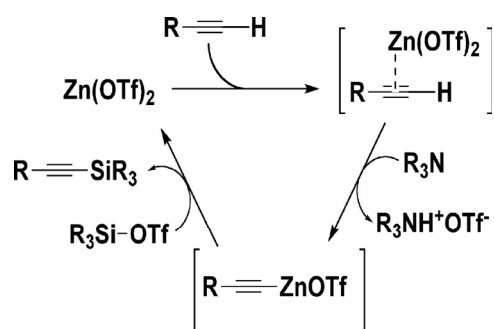
4.2.2 Il Trimetilsilile.

In un lavoro del 2006 di Aucagne e Leigh⁹ il trimetilsilile (TMS) è usato come gruppo protettivo sull'alchino, capace di resistere nelle condizioni di cicloadizione, creando una procedura one-pot di “doppia click” (Schema 6).



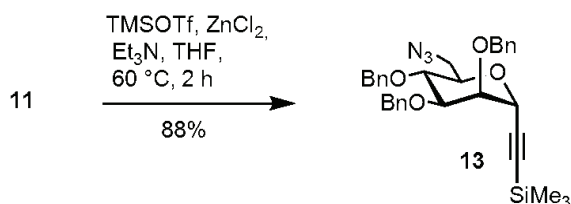
Schema 6.

E' stato quindi adottato lo stesso principio, sviluppando un'unità ripetitiva in cui fossero presenti l'azide e l'alchino protetto come TMS. Partendo dal composto X, si ottiene il corrispondente azido-derivato per attivazione dell'alcool primario come tosilato e successiva sostituzione nucleofila con NaN_3 . L'inserimento del TMS avviene attraverso un approccio innovativo che permette l'uso di condizioni piuttosto blande, sviluppato da Gevorgyan¹⁰ nel 2002. L'uso di ZnCl_2 , tramite la formazione di un complesso dello zinco sul triplo legame, aumenta il carattere acido dell'alchino. In presenza di basi deboli può quindi formarsi un acetiluro di zinco che funge da nucleofilo attaccando il silil-elettrofilo. Questa metodica è stata poi ottimizzata dai successivi lavori di Zhu¹¹ e Shaw,¹² facendo entrambi uso di $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ che funge da catalizzatore più efficiente (Schema 7).



Schema 7.

Si è quindi adottato un approccio mediano, usando ZnCl_2 , che può essere facilmente anidrificato per fusione, e TMSOTf. Questo permette la formazione in situ del più efficiente catalizzatore di $\text{Zn}(\text{OTf})_2$, man mano che la reazione procede. In questo modo otteniamo l'unità ripetitiva con l'88% di resa (Schema 8).



Schema 8.

Partendo quindi dai tre building block (Figura 4), è stato eseguito il processo di oligomerizzazione graduale Cu(I)-catalizzata legando il etinil 6-deoxymannoside **10** con TMS etinil 6-azido-mannoside **13**. Una volta avvenuta la reazione di coupling, la rimozione del gruppo TMS avviene per semplice trattamento alcalino, che porta alla formazione del dimannoside avente l'alchino gruppo libero **14a** (Schema 9). Si può notare come la CuAAC avviene con un tempo di reazione molto breve, 15 minuti, per semplice riscaldamento alle microonde, mentre la desilizzazione richiede solo un'ora. La ripetizione della sequenza di cicloaddizioni/desilizzazione eseguita su tre cicli consecutivi permette di ottenere i *tri*-, *tetra*- e *penta*-mannosidi **14b-d**, le cui rese e purezze sono riportati nello Schema 9.

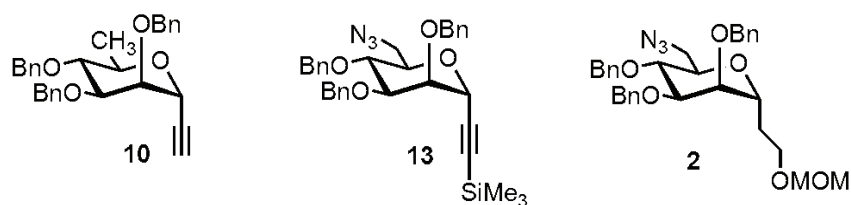
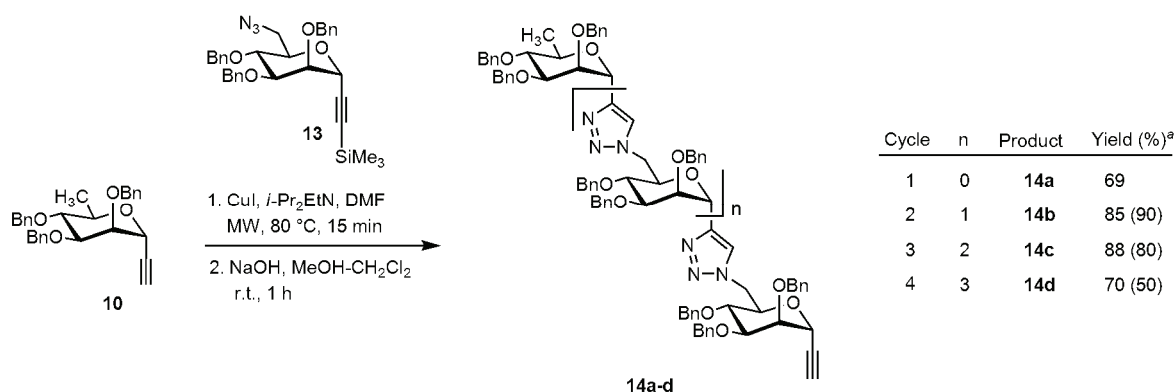


Figura 4.

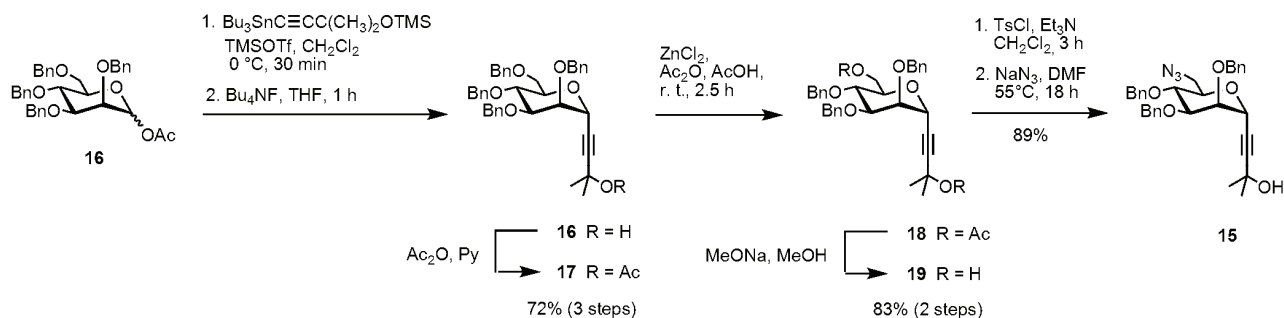
Dall'esame di questi risultati appare chiaro che gli oligomeri sono sempre contaminati. Queste impurezze sono dovute alla parziale desililazione dell'alchino durante la procedura di CuAAC. Questa deprotezione, seppur minima, comporta la formazione di omologhi superiori che rendono la procedura di purificazione molto ardua, soprattutto all'aumentare della complessità della molecola, diminuendo di fatto le rese.



Schema 9.

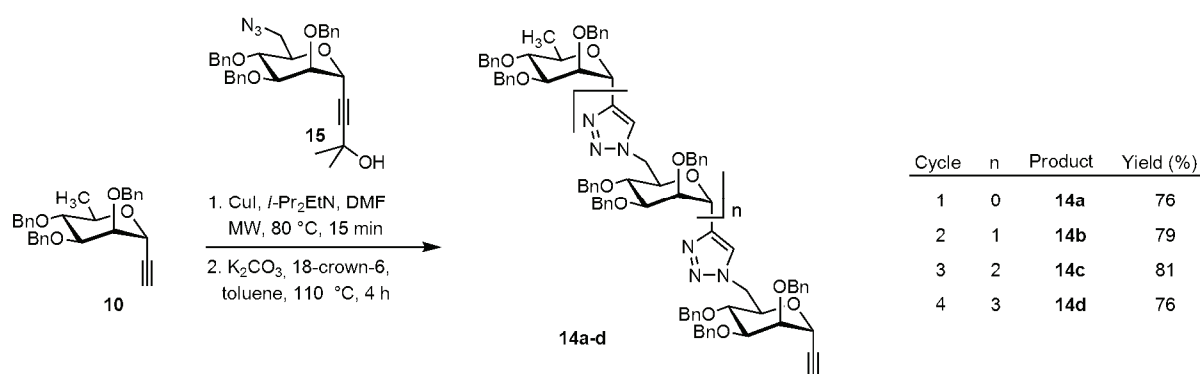
4.2.3 Il 3-idrossi-3-metilbutinile.

Alla luce di risultati ottenuti, anche il TMS risulta un gruppo inefficiente per la sintesi di oligomeri a lunga catena per via iterativa. La soluzione è rappresentata dall'uso del 3-idrossi-3-metil-butinil 6-azidomannoside (**15**), un addotto formale dell'acetone sull'entinil 6-azidomannoside (**11**). E' da notare come in realtà questa addizione sia del tutto fallimentare se condotta direttamente sul composto **11**, portando facilmente all'eliminazione 1,2 dell'alcool benzilico, con conseguente formazione dell'indesiderato glicale.



Schema 10.

Si è quindi riprogettata la sintesi dell'unità ripetitiva, introducendo l'alchino protetto come 3-idrossi-3-metilbutinile (HMB) per glicosilazione diretta della miscela α e β dell'*O*-perbenzilato acetil mannoside (**16**). Il *C*-glicoside ottenuto è quindi deprotezionato selettivamente in posizione 6 e l'alcool primario viene convertito in azide, attraverso condizioni già utilizzate precedentemente.

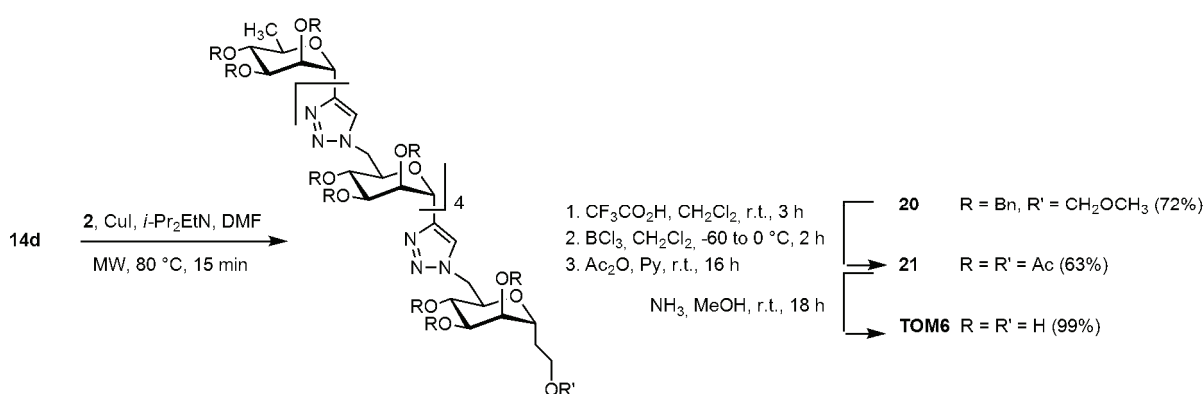


Schema 11.

Durante la procedura di oligomerizzazione iterativa (Schema 11), l'HMB si dimostra un gruppo protettivo più robusto rispetto al trimetilsilile, portando alla formazione dei prodotti desiderati con alte percentuali di resa e purezza. L'HMB viene quindi rimosso in condizioni alcaline -40 mol % di 18-C-6 e K_2CO_3 in toluene a reflusso¹³ trattando direttamente il prodotto di cicloaddizione in un processo one-pot. L'esecuzione di quattro cicli ripetuti di cicloaddizione/deprotezione portano alla formazione del pentamannoside **14d** con una resa totale del 38%. Un risultato che dimostra la migliore efficacia di quest'approccio rispetto al lavoro propedeutico (in cui si rigenerava l'azide) ma che soprattutto diminuisce il numero di cromatografie necessarie, non dovendo isolare i prodotti intermedi di cicloaddizione.

Il pentamannoside **14d** fatto cicloaddurre con l'estremità terminale **2** (Schema 12), porta alla formazione dell'oligomero **20** con buone rese (72%). L'esamannoside è in seguito sottoposto a idrolisi acida per rimuovere il gruppo MOM e quindi debenzilato tramite BCl_3 .

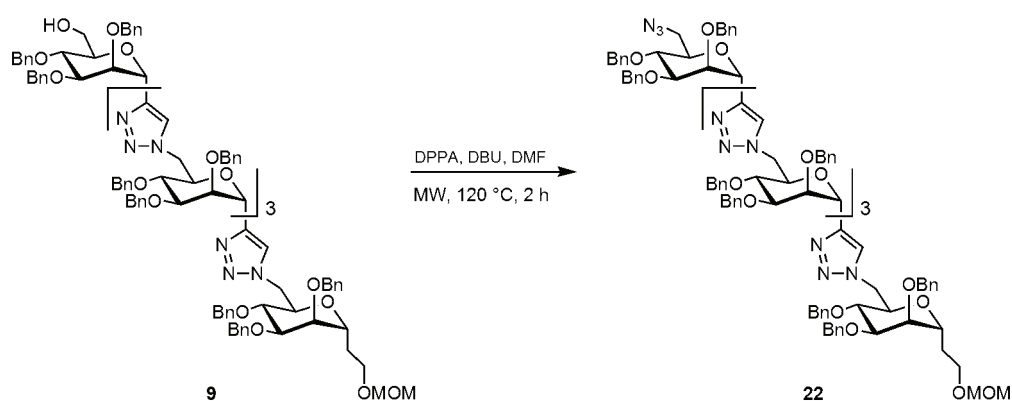
Il prodotto viene isolato e caratterizzato come acetil-derivato **21** (63% di resa su tre passaggi) per poi essere deprotetto per trattamento con una soluzione di ammoniaca in metanolo. L'esamannoside libero (**TOM6**) è quindi pronto per i saggi biologici che ne determineranno l'efficacia inibitoria.



Schema 12.

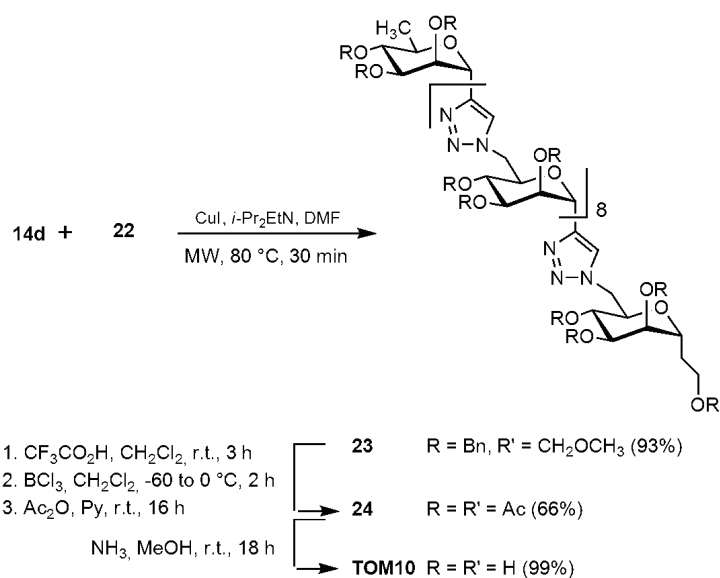
4.2.4 Sintesi del decasaccaride: un approccio convergente.

Considerando che i lipomannani presenti nella parete del *Mycobacterium tuberculosis* sono costituiti anche da 15-20 unità, la sintesi di analoghi triazol-oligomannosidici risulta troppo impegnativa per uno sviluppo lineare. Possiamo, infatti, facilmente notare come già alla quinta omologazione l'aumento in peso dovuto all'inserimento di una nuova unità di mannosio, possa essere uguale se non inferiore alla perdita in peso dovuta all'efficienza della reazione (in media ha una resa del 78%). La sola soluzione è rappresentata da una sintesi convergente. Essendo già stata sviluppata la sintesi del pentamannoside **9**, il primo e più immediato approccio è stato l'accoppiamento dei due pentasaccaridi ottenuti con approcci complementari (5+5).



Schema 13.

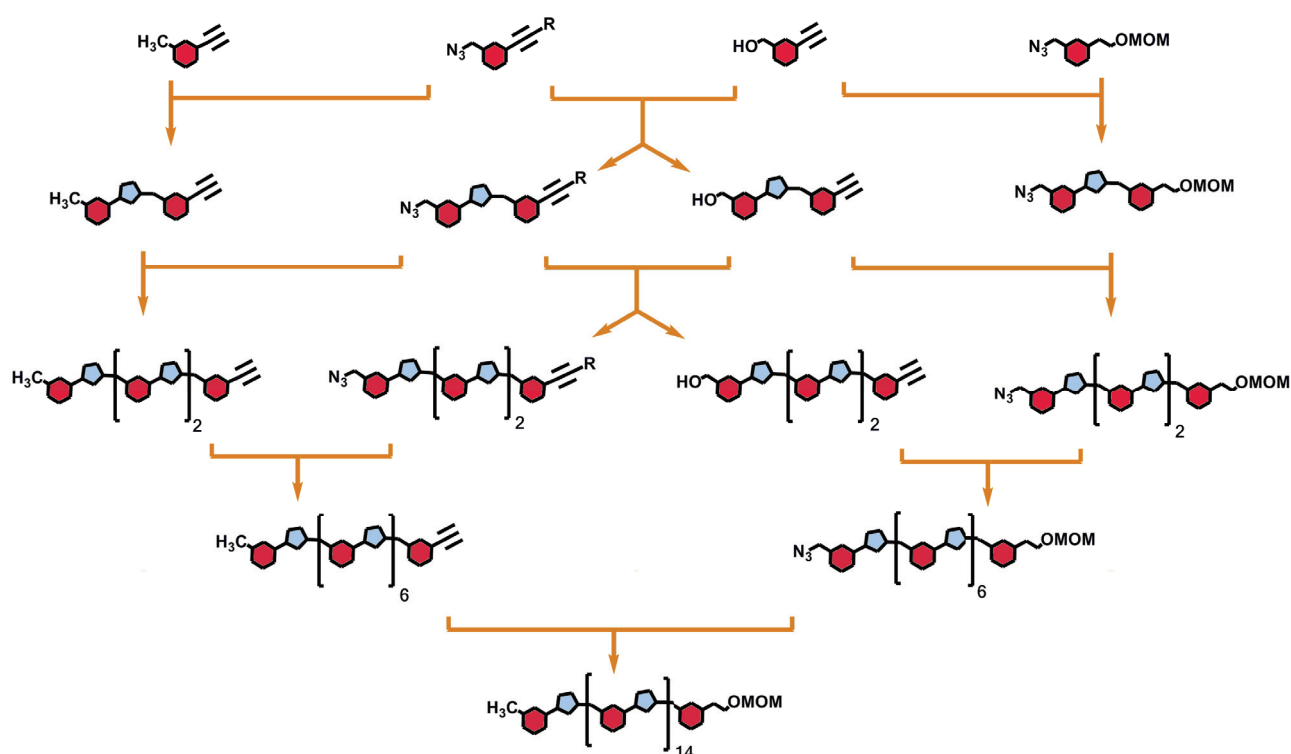
Questo è stato possibile tramite l'azidazione dell'alcool primario sul pentamannoside **9**, ottenendo il composto **22** (Schema 13), e successiva CuAAC con il pentamannoside **14d**. La cicloadizione (Schema 14) ha permesso l'ottenimento del decasaccaride **23** con ottime rese (92%). In questo caso la resa totale del decasaccaride **23** dai building block di partenza è di circa il 30%, risultando addirittura superiore a quella dell'esasaccaride **20** (27% di resa totale), a sostegno che la strategia convergente è l'unica via efficace per la sintesi di oligomeri molto lunghi.



Schema 14.

Il decamero è stato quindi sottoposto a trattamento acido per rimuovere il MOM, per poi essere debenzilato. L'acetilazione del grezzo di reazione con AcO₂ e Py ha portato all'isolamento del prodotto **24**, che, dopo caratterizzazione completa, è stato deacetilato con NH₃ con l'ottenimento del decamannoside libero **TOM10**.

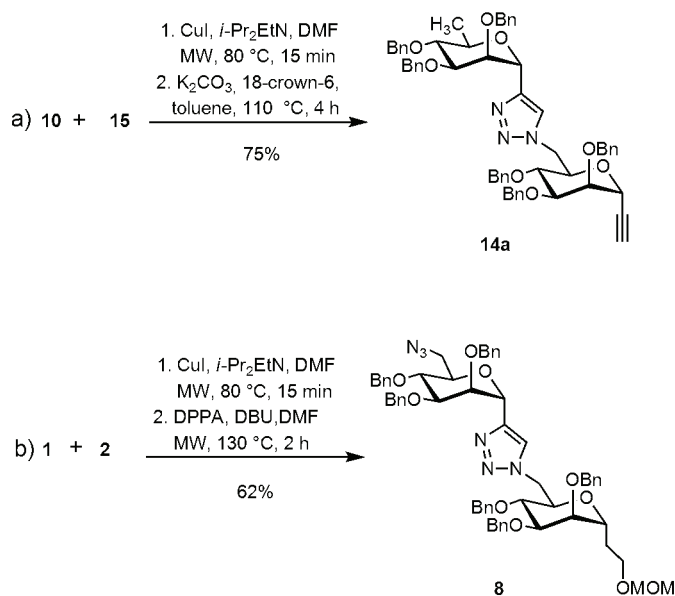
4.2.4 Sintesi convergente e modulare di triazol-oligomannosidi.



Schema 15.

E' chiaro che la metodologia appena evidenziata, pur dimostrandosi adatta alla sintesi del decasaccaride, mal si coniuga con la sintesi di omologhi molto più lunghi, giacché si sviluppa sempre linearmente per convergere solo alla fine. E' stato quindi elaborato uno schema sintetico completamente convergente (Schema 15), progettato per la sintesi dell'esadecasaccaride (16 unità mannosidiche), ma da cui si possono facilmente ottenere anche tutti gli altri oligomeri inferiori, tramite il coupling dei prodotti intermedi. Questo approccio prevede l'utilizzo delle due unità che fungono da testa e coda dell'oligomero e delle due unità ripetitive sviluppate precedentemente.

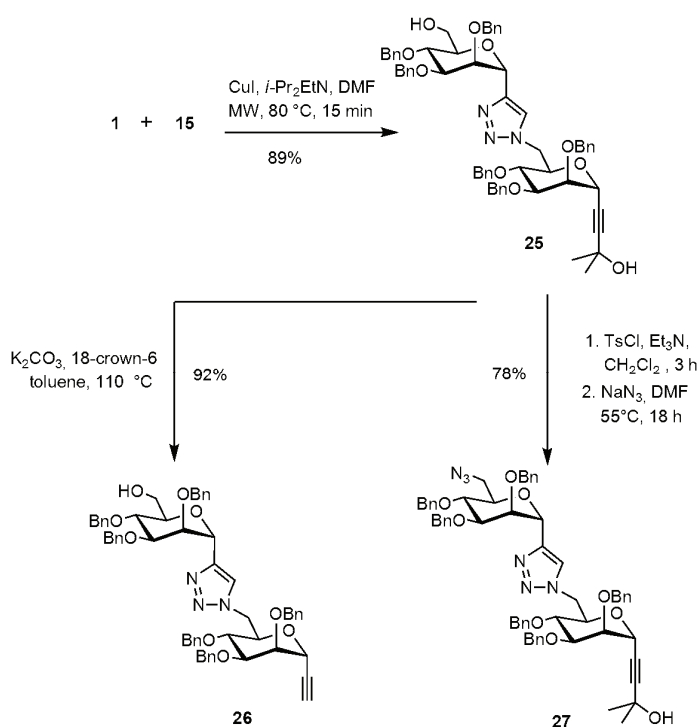
Qui di seguito viene illustrata la sintesi dell'esadecasaccaride che implica quattro cicli consecutivi, ognuno dei quali è costituito da delle reazioni di click seguite da azidazioni o da rimozioni del gruppo HMB. Tutte le cicloaddizioni sono state eseguite nelle condizioni già ottimizzate precedentemente (CuI 0.2 eq., DIPEA 2 eq., 80° alle MW per 15 minuti). La rimozione dell'HMB avviene con il 40 mol % di 18-C-6 e K₂CO₃ in toluene a refluxo, con tempi che si dilatano all'aumentare della lunghezza dell'oligomero. La conversione dell'alcool primario in azide può procedere in due modi. I derivati che presentano l'alchino sono stati prima convertiti in tosilati per dare poi sostituzione nucleofila con NaN₃. I derivati che presentano la catena idrossietilica protetta con il MOM sono stati azidati direttamente con DPPA.



Schema 16.

Il primo ciclo coinvolge l'accoppiamento catalizzato da Cu(I) de:

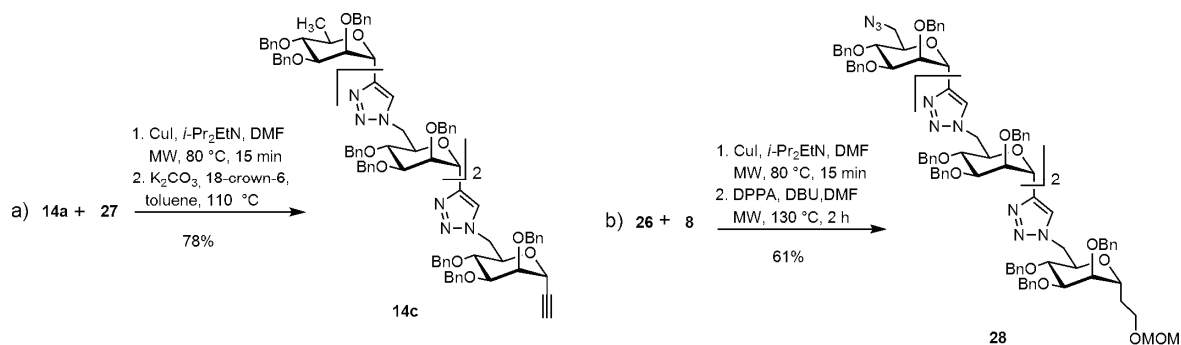
- l'alchino **10** con l'azide **15** e successiva rimozione dell'HMB ottenendo il dimannoside **14a** la cui sintesi è stata già descritta precedentemente (Schema 16, eq. a);
- l'alchino **1** con l'azide **2** e successiva azidazione per dare il composto noto **8** (Schema 16, eq. b);
- l'alchino **1** con l'azide **15**, da cui si ottiene l'intermedio **25** che, per successiva azidazione o deacetoneazione, porta alla formazione dei disaccaridi **26** e **27** (Schema 17).



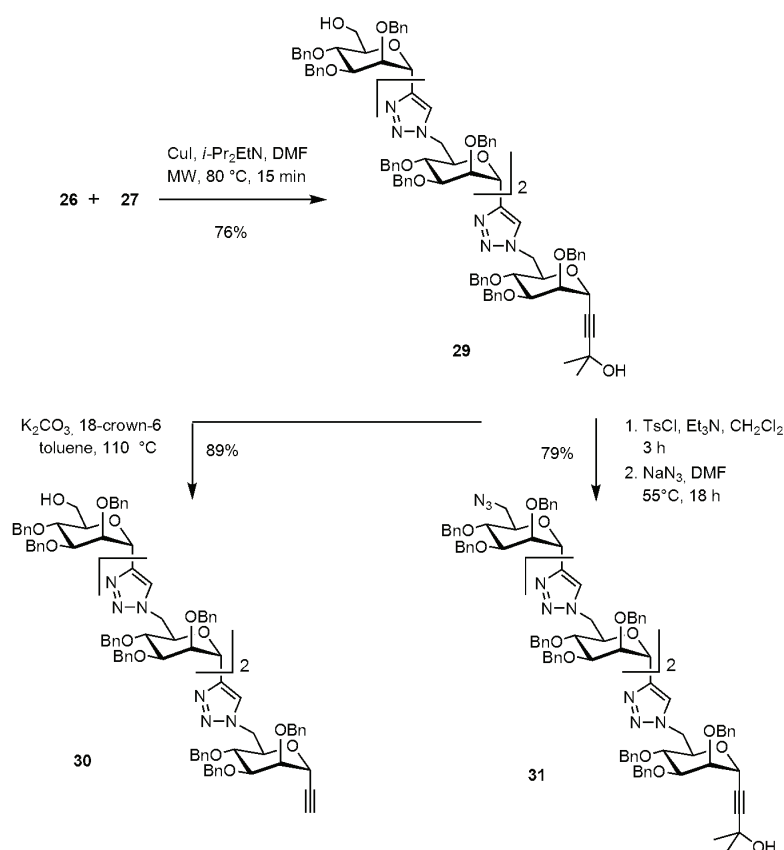
Schema 17.

Il secondo ciclo implica l'accoppiamento catalizzato da Cu(I) de:

- l'alchino **14a** con l'azide **27** e successiva rimozione dell'HMB ottenendo il tetramannoside **14c** (Schema 18, eq. a);
- l'alchino **26** con l'azide **8** e successiva azidazione per dare **28** (Schema 18, eq. b);
- l'alchino **26** con l'azide **27**, da cui si ottiene l'intermedio **29** che, per successiva azidazione o deacetonzazione, porta alla formazione dei disaccaridi **30** e **31** (Schema 19).



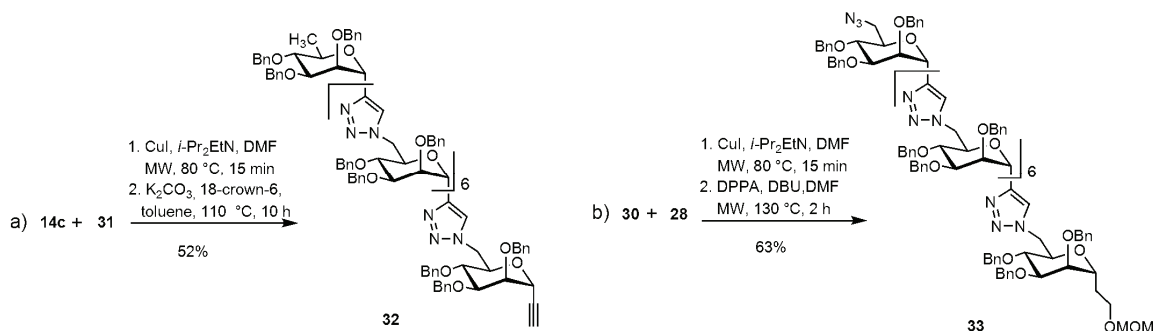
Schema 18.



Schema 19.

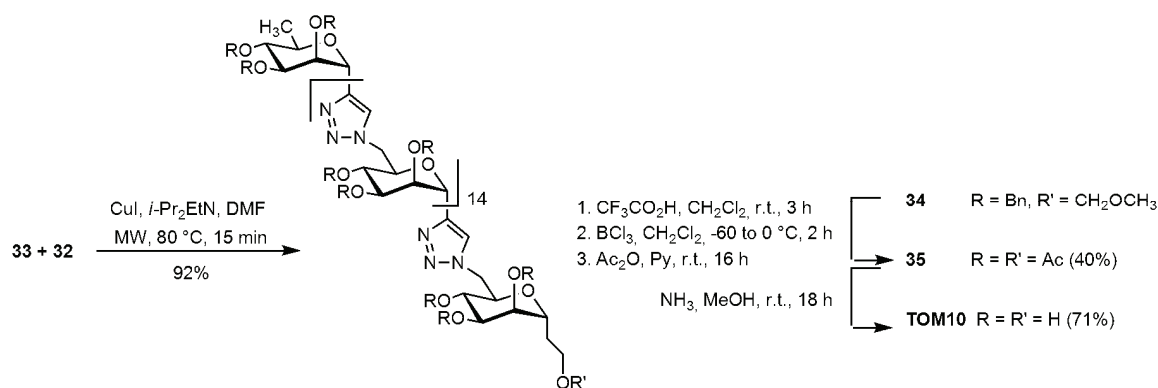
Nel terzo ciclo si ha l'accoppiamento catalizzato da Cu(I) de:

- l'alchino **14c** con l'azide **31** con successiva rimozione dell'HMB ottenuto l'ottamannoside **32** (Schema 20, eq. a) con solo il 52% di resa (a questo livello la rimozione dell'HMB risulta inefficiente per il probabile ripiegamento della molecola che rende poco disponibile il gruppo all'attacco idrolitico)
- l'alchino **30** con l'azide **28** con successiva azidazione per dare **33** (Schema 20, eq. b).



Schema 20

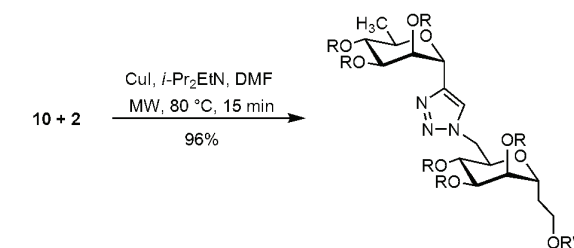
Il quarto e ultimo ciclo comporta il coupling dei due ottamannosidi, **32** e **33**, per dare l'esadecasaccaride finale (**34**) con una resa totale, partendo dai quattro building block, del 26%. Si tratta di un risultato più che soddisfacente, tenendo conto della complessità della molecola.



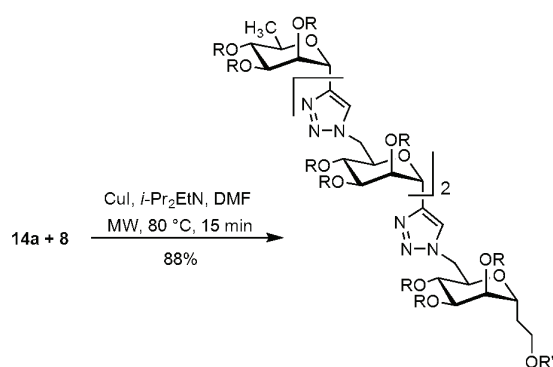
Schema 21.

Prima di chiudere questa sezione alcuni aspetti delle reazioni appena descritte meritano di essere presi in considerazione. Prima di tutto si può notare che tutte le reazioni intermolecolari CuAAC si siano svolte con grande efficacia, indipendentemente dalla complessità dei substrati per dare esclusivamente un cicloaddotto unico. Si può anche notare che le due trasformazioni del gruppo funzionale, (i processi di deacetone e azidazione) siano semplici ed efficienti e che avvengono senza alcun danno per i substrati.

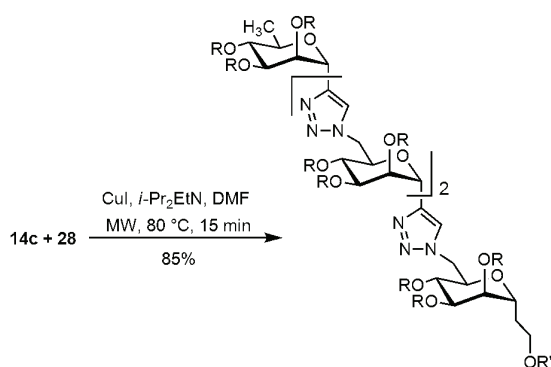
Possiamo facilmente vedere come, da questo approccio, siano state sintetizzate delle molecole intermedie che, fatte reagire tra loro, possano portare alla formazione di tutti gli oligomeri a catena più corta. Considerando l'obiettivo biologico, la sintesi è stata limitata alla sola serie di quattro oligomeri con n^2 (dove $n=1, 2, 3, 4$) residui di mannosio. Tali oligomeri dovrebbero permetterci di capire gli effetti della lunghezza della catena sull'attività inibitoria rispetto alle α -1,6-mannosiltransferasi. Così esattamente come l'esadecasaccaride è ottenuto dall'accoppiamento dei due ottasaccaridi intermedi, il dimannoside **36** è ottenuto dalla reazione di click tra l'alchino **10** e l'azide **2**. Lo stesso approccio è esteso per la sintesi del tetramannoside **38**, ottenuto dall'alchino **14a** e l'azide **8**, e dell'ottamannoside **40**, sintetizzato a partire dall'alchino **14c** e l'azide **28**.



1. $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H, CH}_2\text{Cl}_2$, r.t., 3 h
 2. $\text{BCl}_3, \text{CH}_2\text{Cl}_2$, -60 to 0 $^\circ\text{C}$, 2 h
 3. $\text{Ac}_2\text{O, Py}$, r.t., 16 h
 NH_3, MeOH , r.t., 18 h
- **36** R = Bn, R' = CH_2OCH_3
 → **37** R = R' = Ac (81%)
 → **TOM2** R = R' = H (92%)



1. $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H, CH}_2\text{Cl}_2$, r.t., 3 h
 2. $\text{BCl}_3, \text{CH}_2\text{Cl}_2$, -60 to 0 $^\circ\text{C}$, 2 h
 3. $\text{Ac}_2\text{O, Py}$, r.t., 16 h
 NH_3, MeOH , r.t., 18 h
- **38** R = Bn, R' = CH_2OCH_3
 → **39** R = R' = Ac (73%)
 → **TOM4** R = R' = H (99%)



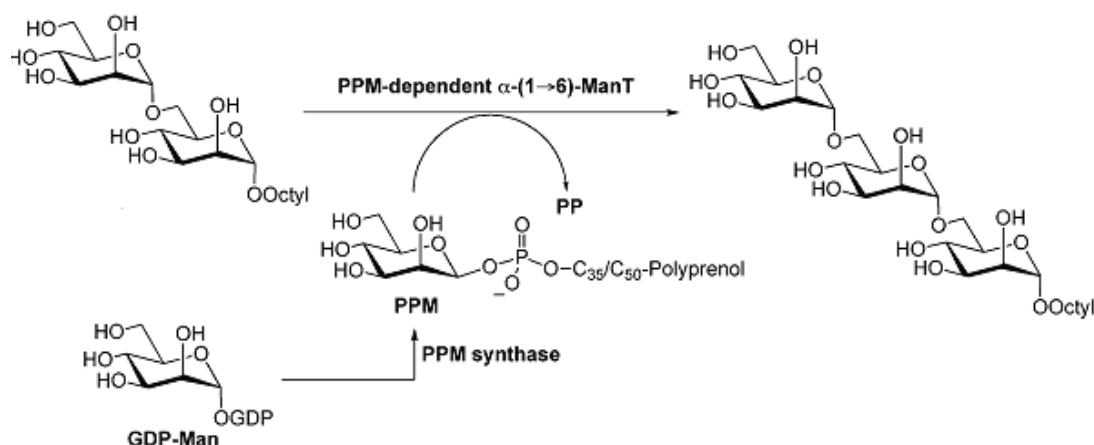
1. $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H, CH}_2\text{Cl}_2$, r.t., 3 h
 2. $\text{BCl}_3, \text{CH}_2\text{Cl}_2$, -60 to 0 $^\circ\text{C}$, 2 h
 3. $\text{Ac}_2\text{O, Py}$, r.t., 16 h
 NH_3, MeOH , r.t., 18 h
- **40** R = Bn, R' = CH_2OCH_3
 → **41** R = R' = Ac (78%)
 → **TOM8** R = R' = H (99%)

Schema 22.

Tutti gli oligomeri sono quindi deprotetti, come già visto in precedenza, per idrolisi acida seguita da debenzilazione con BCl_3 e successiva acetilazione. I corrispondenti prodotti acetilati (**37**, **39**, **41**) sono infine resi liberi per trattamento con una soluzione di NH_3 , ottenendo **TOM2**, **TOM4**, **TOM8**.

4.3 Screening degli analoghi come inibitori della ManT.

Una volta sintetizzati i composti **TOM 2-16**, grazie alla collaborazione con il laboratorio di G. S. Bresna, sono testati come potenziali inibitori della α -1,6-mannosiltrasferasi PPM-dipendente (ManT) presente nella membrana del *Micobacterium smegmatis*.¹⁴ Per misurarne l'attività si usa come substrato dell'enzima un disaccaride avente una catena ottilica in posizione anomeric (Schema 23).



Schema 23.

Ogni campione, alla concentrazione finale di 1 mM, è incubato con del $[U-^{14}\text{C}]\text{GDP}$ -mannosio (guanosil-difosforilmanosio marcato sul carbonio come ^{14}C), l'accettore artificiale è un estratto di membrana micobatterica ottenuto per centrifugazione. Il GDP-mannosio sarà convertito in loco nel poliprenolfosfo-mannosio (PPM), che rappresenta il donatore naturale di unità di mannosio utilizzato dalla mannosiltrasferasi. La miscela è incubata a 37 °C per un 30 minuti, quindi centrifugata. Il surnatante viene rimosso, eluito su una cartuccia a scambio ionico e il residuo recuperato è estratto con acqua satura di *t*-butanolo in modo da isolare il ottil Trisaccaride.

Tramite scintillatore è misurato il valore di radioattività del materiale recuperato e confrontato con il dato ottenuto dalla prova in bianco. I dati d'inibizione sono quindi relativi al grado di affinità del disaccaride utilizzato come accettore che è sempre alla concentrazione finale di 0.2 mM.

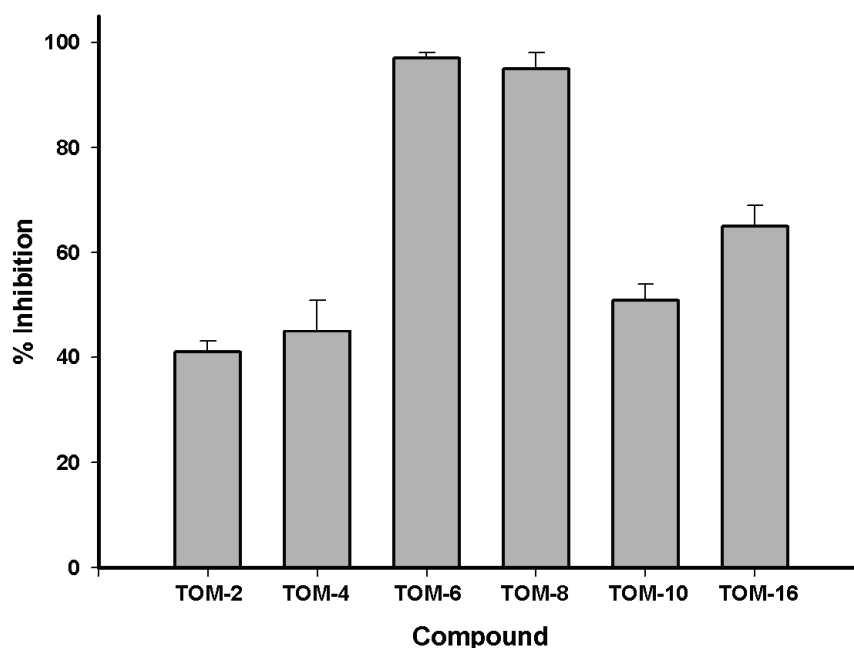


Figura 5.

I risultati mostrano un andamento gaussiano dell'attività inibitoria, con il picco coincidente con l'esamannoside (Figura 5).

Inibitore	cpm
assente	13627
TOM-2	8174
TOM-4	7498
TOM-6	401
TOM-8	656
TOM-10	6680
TOM-16	4739

L'esamannoside, TOM-6, e l'ottamannoside, TOM-8, mostrano un'alta attività (circa il 95% di inibizione). Da questi risultati si può dedurre che questi composti possiedono una lunghezza ottimale per interagire con le α -(1,6)-mannosiltransferasi PPM-dipendenti. Tenendo presente che l'enzima lavora con molecole naturali di circa 20 unità mannosidiche, i loro analoghi sono sostanzialmente più corti. E' molto probabile che i linker triazolici rendano la lunghezza totale della catena maggiore.

E' da notare come la sostituzione del legame naturale *O*-glicosidico e l'introduzione di un anello triazolico non perturbi il riconoscimento molecolare con le α -(1,6)-mannosiltransferasi del *mycobacterium*.

4.4 Conclusioni.

Con questo lavoro di ricerca si è tracciata la strada per la sintesi di una nuova famiglia di analoghi di oligomannosidi che possiede due caratteristiche principale. La prima è l'inserzione di un anello triazolico tra le unità glicosidiche formando un legame carbonio-carbonio per ogni residuo di mannosio. La seconda è la presenza di un'estremità desossigenata in 6. Queste caratteristiche sono state progettate per rendere gli oligomeri stabili alla degradazione enzimatica e in grado di inibire il processo di glicosilazione promosso dalle mannosiltransferasi, il processo chiave per la biosintesi della parete cellulare del *Mycobacterium tuberculosis*.

La loro sintesi è stata eseguita prima tramite un approccio liniare e poi convergente, che ha permesso il facile assemblaggio di oligomeri a 2, 4, 6, 8, 10 e 16 unità mannosidiche. E' stata infine valutata l'influenza della lunghezza dell'oligomero con il grado di affinità per l'enzima. Tutte le molecole sviluppate hanno un'attività inibitoria. In particolare i derivati con 6 e 8 unità mannosidiche hanno mostrato una maggior affinità per le mannosiltransferasi, risultando un buon punto di partenza per lo sviluppo di nuovi e più efficaci inibitori.

4.5 Bibliografia.

1. Watt, J. A.; Williams, S. J. *Org Biomol Chem* **2005**, 3, 1982–1992
2. Cheshev, P.; Marra A.; Dondoni, A. *Org Biomol. Chem.* **2006**, 4, 3225-3227.
3. Dondoni, A.; Mariotti, G.; Marra, A. *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 4475-4486.
4. Yang, G.; Ding, X.; Kong, F. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38, 6725-6728
5. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.
6. Gibson, S. E.; Stevenazzi, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, 42, 1800.
7. Hayashi, Y.; Yamaguchi, H.; Toyoshima, M.; Okado, K.; Toyo, T.; Shoji, M. *Org Lett.* **2008**, 10, 1405-1408.
8. Hitoshi Ban, S.; Masahiko Yamaguchi, M. *J. Org. Met. Chem* 1998, Vol. 554, 163-166
9. Aucagne, V. ; Leigh, D. A. *Org. Lett.*, 2006, 8, 4505–4507
10. Andreev, A. A.; Konshin, V. V.; Komarov, N. V.; Rubin, M.; Brouwer, C.; Gevorgyan, V. *Org. Lett.* **2004**, 6, 421-424.
11. Jiang, H.; Zhu, S. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 517-519.
12. Rahaim, Jr., R. J.; Shaw, J. T. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 2912–2915
13. Boyall, D.; López, F.; Sasaki, H.; Frantz, D.; Carreira, E. M. *Org. Lett.* **2000**, 2, 4233-4236
14. Besra, G. S.; Morehouse, C. B.; Rittner, C. M.; Waechter C. J.; Brennan, P. J. *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 18460–18466.

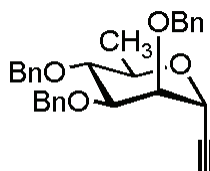
5.1 Informazioni generali

General Experimental Section. All moisture-sensitive reactions were performed under a nitrogen atmosphere using oven-dried glassware. Anhydrous solvents were dried over standard drying agents¹ and freshly distilled prior to use. Reactions were monitored by TLC on silica gel 60 F₂₅₄ with detection by charring with sulfuric acid. Flash column chromatography² was performed on silica gel 60 (40-63 μm). Melting points were determined with a capillary apparatus. Optical rotations were measured at 20 ± 2 °C in the stated solvent; $[\alpha]_{\text{D}}$ values are given in $\text{deg}\cdot\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dm}^{-1}$. ¹H NMR (300 and 400 MHz) and ¹³C NMR spectra (75 MHz) were recorded from CDCl₃ solutions at room temperature unless otherwise specified. Peak assignments were aided by ¹H-¹H COSY and gradient-HMQC experiments. In the ¹H NMR spectra reported below, the *n* and *m* values quoted in geminal or vicinal proton-proton coupling constants $J_{n,m}$ refer to the number of the corresponding sugar protons. The closed vessel MW experiments were performed using a Biotage Initiator apparatus; the reaction time was counted when the reaction mixture reached the preset temperature.

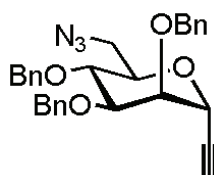
High Resolution MS Analysis. For accurate mass measurements the compounds were analyzed in positive ion mode by electrospray hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF) fitted with a Z-spray electrospray ion source (Waters, Manchester, UK). The capillary source voltage and the cone voltage were set at 3500 V and 35 V, respectively; the source temperature was kept at 80 °C; nitrogen was used as a drying gas at a flow rate of ca. 50 L/h. The time-of-flight analyzer was externally calibrated with NaI from *m/z* 300 to 2000 to yield an accuracy near to 5 ppm. When necessary an internal lock mass was used to further increase the mass accuracy. Accurate mass data were collected by directly infusing samples (10 pmol/ μL in 1:1 CH₃CN-H₂O containing 10 mM ammonium formate) into the system at a flow rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. spectrometer's sample target and dried at room temperature.

The acquisition and data processing were performed with the MassLynx 4.1 software (Waters, Manchester, UK). Compounds **20**, **21**, **TOM6**, **23**, **24**, **TOM10**, **34**, **35**, **TOM16**, **40**, **41** and **TOM8**, were analysed by MALDI TOF mass spectrometry using a MALDI-TOF micro MX (Waters Co., Manchester, UK), equipped with a pulsed nitrogen laser ($\lambda = 337$ nm). with 1 μ L of saturated α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix solution (10 mg/mL in 1:1 EtOH-H₂O, containing 0.1% of CF₃CO₂H). Ca. 1 μ L of the resulting mixture was placed onto the mass Each compound was dissolved in H₂O (**TOM6**, **TOM8**, **TOM10**, **TOM16**) or 1:1 CHCl₃-acetonitrile (**20**, **21**, **23**, **24**, **34**, **35**, **40**, **41**) and, prior to the acquisition of spectra, 1 μ L of this solution was diluted. Once the liquid was completely evaporated, the sample was loaded into the mass spectrometer and analyzed. The instrument was operated in positive ion reflectron mode with the source voltage set to 12 kV. The pulse voltage was optimized at 1999 V, the detector and reflectron voltages were set to 5200 V and 2350 V, respectively. Measurements were performed in the mass range m/z 800-5000 with a suppression mass gate set to m/z 500 to prevent detector saturation from matrix cluster peaks and an extraction delay of 600 ns. The instrument was externally calibrated using a polyethylene glycol mix (Waters, Milford, MA USA) as standard. A mass accuracy near to the nominal (50 ppm) was achieved for each standard. The protonated monoisotopic mass of ACTH peptide (m/z 2465.199) was used as internal lock mass to further improve the peptide mass accuracy near to 10-20 ppm. All spectra were processed and analyzed using the MassLynx 4.1 software. The monoisotopic masses were calculated according to the reported³ atomic weights of the elements.

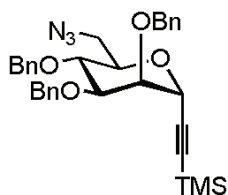
5.2 Sintesi e caratterizzazioni.

3,7-Anhydro-4,5,6-tri-*O*-benzyl-1,2,8-trideoxy-D-glycero-D-talo-oct-1-ynitol (**10**).

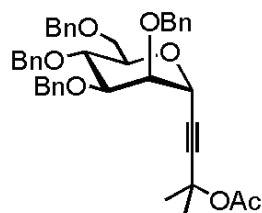
A mixture of known⁵ alcohol **1** (250 mg, 0.55 mmol), imidazole (112 mg, 1.65 mmol), triphenylphosphine (433 mg, 1.65 mmol), and iodine (279 mg, 1.10 mmol) in anhydrous toluene (10 mL) was stirred at 110 °C for 3 h, than cooled to room temperature, diluted with AcOEt (60 mL), washed with 1M aqueous Na₂S₂O₃ (15 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residue was filtered through a short column of silica gel with 14:1 cyclohexane-AcOEt to give the corresponding 8-iodo derivative slightly contaminated by triphenylphosphine (280 mg). ¹H NMR (300 MHz): δ 7.46-7.29 (m, 15H, Ar), 5.03 and 4.75 (2d, 2H, *J* = 11.0 Hz, PhCH₂), 4.84 (dd, 1H, *J*_{1,3} = 2.4, *J*_{3,4} = 2.2 Hz, H-3), 4.77 and 4.70 (2d, 2H, *J* = 12.5 Hz, PhCH₂), 4.64 (s, 2H, PhCH₂), 4.09 (dd, 1H, *J*_{4,5} = 3.0, *J*_{5,6} = 9.2 Hz, H-5), 3.87 (dd, 1H, *J*_{6,7} = 9.1 Hz, H-6), 3.86 (dd, 1H, H-4), 3.64 (ddd, 1H, *J*_{7,8a} = 2.8, *J*_{7,8b} = 5.8 Hz, H-7), 3.57 (dd, 1H, *J*_{8a,8b} = 10.5 Hz, H-8a), 3.46 (dd, 1H, H-8b), 2.56 (d, 1H, H-1). To a solution of this compound in anhydrous DMSO (5 mL), sodium borohydride (167 mg, 4.40 mmol) was added in small portions. The mixture was stirred at 80 °C for 2 h, then cooled to room temperature, diluted with AcOH (0.5 mL) and Et₂O (60 mL), washed with saturated aqueous NaHCO₃ (2 × 15 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 15:1 cyclohexane-AcOEt to give **10** (145 mg, 60%) as a syrup; [α]_D = +20.3 (*c* 0.8, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz): δ 7.43-7.28 (m, 15H, Ar), 4.96 and 4.65 (2d, 2H, *J* = 10.8 Hz, PhCH₂), 4.76 and 4.69 (2d, 2H, *J* = 12.5 Hz, PhCH₂), 4.71 (dd, 1H, *J*_{1,3} = *J*_{3,4} = 2.5 Hz, H-3), 4.63 and 4.59 (2d, 2H, *J* = 11.5 Hz, PhCH₂), 3.99 (dd, 1H, *J*_{4,5} = 3.0, *J*_{5,6} = 9.5 Hz, H-5), 3.89 (dq, 1H, *J*_{6,7} = 9.0, *J*_{7,8} = 6.0 Hz, H-7), 3.83 (dd, 1H, H-4), 3.60 (dd, 1H, H-6), 2.48 (d, 1H, H-1), 1.37 (d, 3H, 3H-8). ¹³C NMR: δ 138.5 (C), 138.3 (C), 137.9 (C), 128.4 (CH), 128.1 (CH), 127.9 (CH), 127.74 (CH), 127.66 (CH), 80.4 (CH), 80.1 (CH), 78.9 (C), 76.4 (CH), 75.5 (CH₂), 72.1 (CH₂), 71.1 (CH), 66.0 (CH), 18.1 (CH₃). HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z* calcd for C₂₉H₃₄NO₄ (M+NH₄)⁺ 460.2488, found 460.2508.

3,7-Anhydro-8-azido-4,5,6-tri-*O*-benzyl-1,2,8-trideoxy-D-glycero-D-talo-oct-1-ynitol (11).

A mixture of known⁵ alcohol **1** (960 mg, 2.09 mmol), freshly distilled Et₃N (0.75 mL, 5.23 mmol), and *p*-toluenesulfonyl chloride (997 mg, 5.23 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (7 mL) was stirred at room temperature for 3 h, then diluted with CH₂Cl₂ (60 mL), washed with 1M phosphate buffer at pH 7 (2 x 20 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residue was filtered through a short column of silica gel with 5:1 cyclohexane-AcOEt to give the 8-*O*-tosyl derivative as a white solid (1.27 g). ¹H NMR (300 MHz): δ 7.83-7.79 (m, 2H, Ar), 7.46-7.22 (m, 17H, Ar), 4.92 and 4.55 (2d, 2H, *J* = 10.5 Hz, PhCH₂), 4.72 and 4.65 (2d, 2H, *J* = 12.5 Hz, PhCH₂), 4.71 (dd, 1H, *J*_{1,3} = *J*_{3,4} = 2.5 Hz, H-3), 4.61 (s, 2H, PhCH₂), 4.32 (dd, 1H, *J*_{7,8a} = 4.0, *J*_{8a,8b} = 10.5 Hz, H-8a), 4.28 (dd, 1H, *J*_{7,8b} = 2.5 Hz, H-8b), 4.02 (dd, 1H, *J*_{4,5} = 3.0, *J*_{5,6} = 9.0 Hz, H-5), 3.96 (ddd, 1H, *J*_{6,7} = 9.5 Hz, H-7), 3.88 (dd, 1H, H-6), 3.81 (dd, 1H, H-4), 2.52 (d, 1H, H-1), 2.42 (s, 3H, CH₃). A mixture of this compound, sodium azide (543 mg, 8.46 mmol), and anhydrous DMF (5 mL) was stirred at 55 °C for 19 h, then cooled to room temperature, diluted with AcOEt (60 mL), washed with H₂O (2 x 20 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 8:1 cyclohexane-AcOEt to give **11** (870 mg, 86%) as a syrup; [α]_D = +48.4 (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz): δ 7.43-7.23 (m, 15H, Ar), 4.97 and 4.60 (2d, 2H, *J* = 10.8 Hz, PhCH₂), 4.78 (dd, 1H, *J*_{1,3} = *J*_{3,4} = 2.5 Hz, H-3), 4.74 and 4.68 (2d, 2H, *J* = 12.5 Hz, PhCH₂), 4.61 (s, 2H, PhCH₂), 4.04 (dd, 1H, *J*_{4,5} = 3.0, *J*_{5,6} = 8.8 Hz, H-5), 3.94 (ddd, 1H, *J*_{6,7} = 9.3, *J*_{7,8a} = 2.0, *J*_{7,8b} = 5.2 Hz, H-7), 3.90 (dd, 1H, H-6), 3.83 (dd, 1H, H-4), 3.55 (dd, 1H, *J*_{8a,8b} = 13.0 Hz, H-8a), 3.42 (dd, 1H, H-8b), 2.53 (d, 1H, H-1). ¹³C NMR: δ 138.1 (C), 138.0 (C), 137.7 (C), 128.4 (CH), 128.0 (CH), 127.8 (CH), 79.9 (CH), 78.2 (CH), 77.7 (C), 76.1 (CH), 75.4 (CH₂), 75.1 (CH), 74.2 (CH), 71.9 (CH₂), 65.9 (CH), 51.4 (CH₂). HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z* calcd for C₂₉H₃₃N₄O₄ (M+NH₄)⁺ 501.2502, found 501.2533.

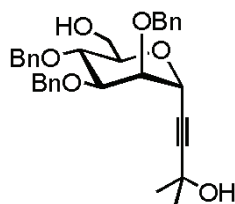
3,7-Anhydro-8-azido-4,5,6-tri-*O*-benzyl-1,2,8-trideoxy-1-*C*-(trimethylsilyl)-*D*-glycero-*D*-talo-oct-1-ynitol (13).

To a mixture of **11** (300 mg, 0.62 mmol) and freshly fused zinc chloride (169 mg, 1.24 mmol) were added anhydrous THF (2 mL), freshly distilled Et₃N (177 μL, 1.24 mmol), and trimethylsilyl triflate (225 μL, 1.24 mmol). The mixture was stirred under reflux for 2 h, then concentrated, diluted with AcOEt (30 mL), washed with aqueous saturated NH₄Cl (2 × 10 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 8:1 cyclohexane-AcOEt to give **13** (303 mg, 88%) as a syrup; [α]_D = +24.2 (*c* 1.1, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz): δ 7.41-7.28 (m, 15H, Ar), 4.97 and 4.61 (2d, 2H, *J* = 10.8 Hz, PhCH₂), 4.78 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 2.2 Hz, H-3), 4.74 and 4.67 (2d, 2H, *J* = 12.5 Hz, PhCH₂), 4.62 (s, 2H, PhCH₂), 4.02-3.96 (m, 1H, H-5), 3.95-3.88 (m, 2H, H-6, H-7), 3.81 (dd, 1H, *J*_{4,5} = 3.0 Hz, H-4), 3.57 (dd, 1H, *J*_{7,8a} = 1.8, *J*_{8a,8b} = 13.5 Hz, H-8a), 3.43-3.38 (m, 1H, H-8b), 0.12 (s, 9H, 3 CH₃). ¹³C NMR: δ 138.1 (C), 138.0 (C), 137.9 (C), 128.42 (CH), 128.35 (CH), 128.1 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 99.5 (C), 94.8 (C), 79.6 (CH), 76.6 (CH), 75.4 (CH₂), 75.2 (CH), 73.9 (CH), 71.8 (CH₂), 66.5 (CH), 51.3 (CH₂), -0.3 (CH₃). HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z* calcd for C₃₂H₄₁N₄O₄Si (M+NH₄)⁺ 573.2897, found 573.2827.

3,7-Anhydro-4,5,6,8-tetra-*O*-benzyl-1,2-dideoxy-1-*C*-[2-(2-acetoxy)propyl]-*D*-glycero-*D*-talo-oct-1-ynitol (17).

A mixture of acetate **16** (1.22 g, 2.10 mmol), known⁴ 1-tributylstannyl-3-methyl-3-trimethylsilyloxy-1-butyne (1.41 g, 3.15 mmol), activated 4-Å powdered molecular sieves (1.0 g), and anhydrous CH₂Cl₂ (20 mL) was stirred at room temperature for 15 min, then cooled to 0 °C. To the stirred mixture was added dropwise trimethylsilyl triflate (0.42 mL, 2.31 mmol). The dark brown mixture was stirred at 0 °C for 30 min, then warmed to room temperature, stirred for an additional 1.5 h, and then diluted with Et₃N (1 mL) and CH₂Cl₂ (30 mL), filtered through a pad of Celite, and concentrated. To a solution of the residue in anhydrous THF (10 mL) was added tetrabutylammonium fluoride trihydrate (2.00 g, 6.34 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h, then concentrated, diluted with AcOEt (150 mL), washed with H₂O (3 × 40 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated to give crude **16**. An analytical sample of **16** was obtained by column chromatography on silica gel (2:1 cyclohexane-AcOEt); [α]_D = +40.8 (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz): δ 7.43-7.16 (m, 20H, Ar), 4.90 and 4.54 (2d, 2H, *J* = 10.5 Hz, PhCH₂), 4.84 (d, 1H, *J*_{3,4} = 2.0 Hz, H-3), 4.77 and 4.68 (2d, 2H, *J* = 12.5 Hz, PhCH₂), 4.66 and 4.54 (2d, 2H, *J* = 12.0 Hz, PhCH₂), 4.63 (s, 2H, PhCH₂), 4.00 (dd, 1H, *J*_{5,6} = *J*_{6,7} = 9.2 Hz, H-6), 3.95 (dd, 1H, *J*_{4,5} = 2.8 Hz, H-5), 3.88 (ddd, 1H, *J*_{7,8a} = 4.8, *J*_{7,8b} = 2.0 Hz, H-7), 3.78 (dd, 1H, *J*_{8a,8b} = 11.0 Hz, H-8a), 3.77 (dd, 1H, H-4), 3.72 (dd, 1H, H-8b), 1.82 (bs, 1H, OH), 1.41 and 1.40 (2s, 6H, 2 CH₃). ¹³C NMR: δ 138.2 (C), 138.0 (C), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 127.9 (CH), 127.85 (CH), 127.78 (CH), 127.7 (CH), 127.5 (CH), 93.7 (C), 79.5 (CH), 76.7 (CH), 75.3 (CH₂), 74.9 (CH), 74.7 (CH), 73.4 (CH₂), 71.9 (CH₂), 71.8 (CH₂), 69.2 (CH₂), 66.0 (CH), 65.0 (C), 31.2 (CH₃). HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z* calcd for C₃₉H₄₃O₆ (M+H)⁺ 607.3060, found 607.3007.

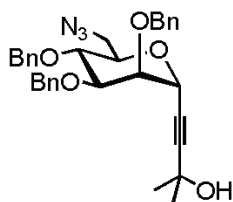
A solution of crude **16** in pyridine (4 mL) and acetic anhydride (3 mL) was kept at room temperature overnight, then concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with cyclohexane-AcOEt (from 8:1 to 6:1) to give syrupy **17** (983 mg, 72%) slightly contaminated by tin-containing byproducts. An analytical sample was obtained by a second column chromatography on silica gel (5:1 cyclohexane-AcOEt); $[\alpha]_D = +50.3$ (c 0.8, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz): δ 7.43-7.16 (m, 20H, Ar), 4.90 and 4.54 (2d, 2H, $J = 10.5$ Hz, PhCH_2), 4.85 (d, 1H, $J_{3,4} = 2.0$ Hz, H-3), 4.74 and 4.67 (2d, 2H, $J = 12.5$ Hz, PhCH_2), 4.67 and 4.53 (2d, 2H, $J = 12.5$ Hz, PhCH_2), 4.63 (s, 2H, PhCH_2), 4.02-3.96 (m, 2H, H-5, H-6), 3.92 (ddd, 1H, $J_{6,7} = 9.0$, $J_{7,8a} = 4.7$, $J_{7,8b} = 2.0$ Hz, H-7), 3.85 (dd, 1H, $J_{4,5} = 2.5$ Hz, H-4), 3.79 (dd, 1H, $J_{8a,8b} = 11.0$ Hz, H-8a), 3.72 (dd, 1H, H-8b), 1.96 (s, 3H, Ac), 1.58 (s, 6H, 2 CH_3). ^{13}C NMR: δ 169.1 (C), 138.6 (C), 138.5 (C), 138.4 (C), 138.2 (C), 128.3 (CH), 128.1 (CH), 127.84 (CH), 127.78 (CH), 127.65 (CH), 127.5 (CH), 127.4 (CH), 90.4 (C), 80.2 (CH), 79.0 (C), 76.8 (CH), 75.1 (CH_2), 74.8 (CH), 74.7 (CH), 73.3 (CH_2), 71.9 (CH_2), 71.5 (C), 69.2 (CH_2), 66.2 (CH), 28.8 (CH_3), 21.8 (CH_3). HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{48}\text{NO}_7$ ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺ 666.3431, found 666.3471.

3,7-Anhydro-4,5,6-tri-*O*-benzyl-1,2-dideoxy-1-*C*-[2-(2-hydroxy)propyl]-*D*-glycero-*D*-talooct-1-ynitol (19**).**

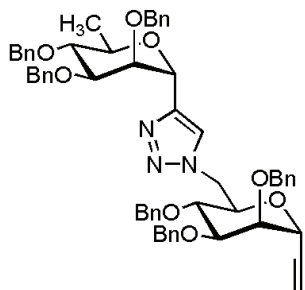
To a stirred solution of **17** (1.31 g, 2.02 mmol) in a 2:1 mixture of acetic anhydride and acetic acid (30 mL), freshly fused zinc chloride (2.75 g, 20.2 mmol) was added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 2.5 h, then diluted with AcOEt (150 mL), washed with H₂O (50 mL) and saturated aqueous NaHCO₃ (3 x 50 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated to give crude **18**. An analytical sample of **18** was obtained by column chromatography on silica gel (4:1 cyclohexane-AcOEt); $[\alpha]_D = +26.1$ (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz): δ 7.43-7.25 (m, 15H, Ar), 4.95 and 4.59 (2d, 2H, *J* = 10.5 Hz, PhCH₂), 4.82 (d, 1H, *J*_{3,4} = 2.2 Hz, H-3), 4.73 and 4.66 (2d, 2H, *J* = 12.5 Hz, PhCH₂), 4.64 (s, 2H, PhCH₂), 4.38 (dd, 1H, *J*_{7,8a} = 1.0, *J*_{8a,8b} = 12.0 Hz, H-8a), 4.33-4.28 (m, 1H, H-8b), 4.04-4.00 (m, 1H), 3.95-3.88 (m, 2H), 3.84 (dd, 1H, *J*_{4,5} = 2.5 Hz, H-4), 2.07 and 1.97 (2s, 6H, 2 Ac), 1.60 (s, 6H, 2 CH₃). ¹³C NMR: δ 170.9 (C), 169.1 (C), 138.2 (C), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 127.8 (CH), 127.6 (CH), 90.7 (C), 80.1 (CH), 78.6 (C), 76.6 (CH), 75.2 (CH₂), 74.2 (CH), 72.9 (CH), 71.9 (CH₂), 71.4 (C), 66.2 (CH), 63.5 (CH₂), 28.7 (CH₃), 21.8 (CH₃), 20.9 (CH₃). HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z* calcd for C₃₆H₄₄NO₈ (M+NH₄)⁺ 618.3067, found 618.3044.

To a solution of the crude acetate **18** in MeOH (10 mL) was added a 0.2 M solution of NaOMe in MeOH (10 mL, freshly prepared from Na and MeOH). The solution was kept at room temperature for 4 h, then neutralized with Amberlite IR-120 (H⁺ form, activated and washed with H₂O and MeOH immediately before the use). The resin was washed with MeOH and the solution was concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with cyclohexane-AcOEt-CH₂Cl₂ (from 2:1:1 to 1:1.5:1) to give syrupy **19** (0.86 mg, 83%); $[\alpha]_D = +42.8$ (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz): δ 7.45-7.24 (m, 15H, Ar), 4.99 and 4.69 (2d, 2H, *J* = 10.8 Hz, PhCH₂), 4.79 (d, 1H, *J*_{3,4} = 2.2 Hz, H-3), 4.74 (s, 2H, PhCH₂), 4.67 (s, 2H, PhCH₂), 4.01-3.93 (m, 2H), 3.90-3.74 (m, 4H), 2.00 and 1.90 (2bs, 2H, 2 OH), 1.65 and 1.64 (2s, 6H, 2 CH₃).

^{13}C NMR: δ 138.2 (C), 138.1 (C), 137.9 (C), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 127.9 (CH), 127.7 (CH), 94.2 (C), 79.5 (CH), 76.7 (CH), 76.2 (C), 75.4 (CH₂), 74.9 (CH), 74.8 (CH), 72.1 (CH₂), 72.0 (CH₂), 66.3 (CH), 64.8 (C), 62.2 (CH₂), 31.1 (CH₃). HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calcd for C₃₂H₄₀NO₆ (M+NH₄)⁺ 534.2856, found 534.2870.

3,7-Anhydro-8-azido-4,5,6-tri-*O*-benzyl-1,2,8-trideoxy-1-*C*-[2-(2-hydroxy)propyl]-*D*-glycero-*D*-talo-oct-1-ynitol (15**).**

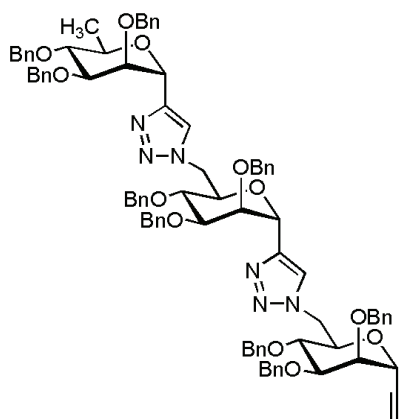
A mixture of alcohol **19** (650 mg, 1.26 mmol), anhydrous CH_2Cl_2 (5 mL), freshly distilled Et_3N (0.54 mL, 3.78 mmol), and *p*-toluenesulfonyl chloride (360 mg, 1.89 mmol) was stirred at room temperature for 17 h, then diluted with CH_2Cl_2 (80 mL), washed with 1M phosphate buffer at pH 7 (2 x 30 mL), dried (Na_2SO_4), and concentrated. The residue was filtered through a short column of silica gel with 2:1 cyclohexane-AcOEt to give the corresponding 6-*O*-tosyl derivative as a white solid (805 mg). ^1H NMR (300 MHz): δ 7.83-7.79 (m, 2H, Ar), 7.43-7.23 (m, 17H, Ar), 4.93 and 4.54 (2d, 2H, $J = 10.5$ Hz, PhCH_2), 4.72 and 4.65 (2d, 2H, $J = 12.5$ Hz, PhCH_2), 4.72 (dd, 1H, $J_{3,4} = 2.2$ Hz, H-3), 4.63 (s, 2H, PhCH_2), 4.32-4.24 (m, 2H, 2 H-8), 3.96-3.87 (m, 3H, H-5, H-6, H-7), 3.84 (dd, 1H, $J_{4,5} = 2.2$ Hz, H-4), 2.42 (s, 3H, CH_3), 1.44 and 1.43 (2s, 6H, 2 CH_3). A mixture of this compound, sodium azide (410 mg, 6.30 mmol), and anhydrous DMF (5 mL) was stirred at 55 °C for 18 h, then cooled to room temperature, diluted with AcOEt (90 mL), washed with H_2O (2 x 25 mL), dried (Na_2SO_4), and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 4:1 cyclohexane-AcOEt to give **15** (613 mg, 89%) as a syrup; $[\alpha]_{\text{D}} = +45.5$ (c 1.1, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz): δ 7.43-7.27 (m, 15H, Ar), 4.98 and 4.61 (2d, 2H, $J = 10.5$ Hz, PhCH_2), 4.79 (d, 1H, $J_{3,4} = 2.2$ Hz, H-3), 4.75 and 4.68 (2d, 2H, $J = 12.5$ Hz, PhCH_2), 4.65 and 4.61 (2d, 2H, $J = 12.0$ Hz, PhCH_2), 3.96-3.83 (m, 3H, H-5, H-6, H-7), 3.77 (dd, 1H, $J_{4,5} = 2.0$ Hz, H-4), 3.55 (dd, 1H, $J_{7,8a} = 2.0$, $J_{8a,8b} = 13.0$ Hz, H-8a), 3.38 (dd, 1H, $J_{7,8b} = 5.5$ Hz, H-8b), 1.45 and 1.44 (2s, 6H, 2 CH_3). ^{13}C NMR: δ 138.1 (C), 137.9 (C), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 128.0 (CH), 127.7 (CH), 94.1 (C), 79.3 (CH), 76.5 (CH), 76.2 (C), 75.5 (CH_2), 75.3 (CH), 74.0 (CH), 71.9 (CH_2), 71.8 (CH_2), 66.1 (CH), 65.0 (C), 51.3 (CH_2), 31.1 (CH_3). HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{NH}_4$) $^+$ 559.2920, found 559.2917.

8-[4-(2',3',4'-tri-*O*-benzyl-6-deoxy- α -D-mannopyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-3,7-anhydro-4,5,6-tri-*O*-benzyl-1,2,8-trideoxy-D-glycero-D-talo-oct-1-ynitol (14a**).**

Method a(TMS). A mixture of alkyne **10** (38 mg, 0.086 mmol), azide **13** (53 mg, 0.093 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (30 μ L, 0.172 mmol), CuI (3.3 mg, 0.017 mmol), and DMF (0.6 mL) in a vial sealed with a Teflon septum and aluminium crimp was subjected to microwave irradiation for 15 min at 80 $^{\circ}$ C, then concentrated. To a solution of the residue in 5:1 MeOH-CH₂Cl₂ (6 mL) was added a 2 M solution of NaOH in H₂O (60 μ L). The solution was kept at room temperature for 1 h, then neutralized with AcOH and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 3:1 cyclohexane-AcOEt to give **14a** (56 mg, 69%) as an amorphous solid.

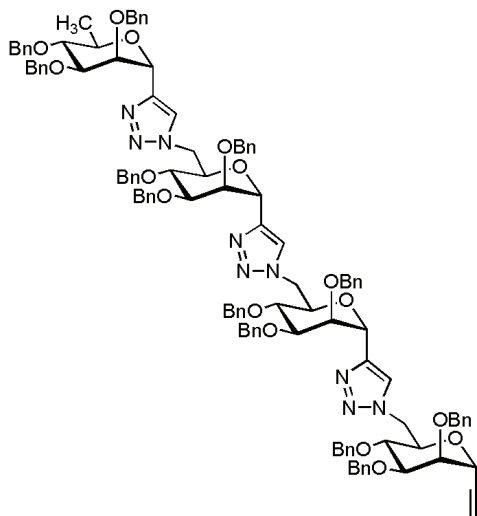
Method b(HMB). A mixture of alkyne **10** (90 mg, 0.20 mmol), azide **15** (108 mg, 0.20 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (70 μ L, 0.40 mmol), CuI (8 mg, 0.04 mmol), and DMF (1 mL) in a vial sealed with a Teflon septum and aluminium crimp was subjected to microwave irradiation for 15 min at 80 $^{\circ}$ C, then cooled to room temperature, diluted with AcOEt (40 mL), washed with 0.05 M aqueous solution of EDTA (3 x 10 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated. A mixture of the residue, anhydrous K₂CO₃ (30 mg, 0.08 mmol), 18-crown-6 ether (12 mg, 0.04 mmol), and toluene (1 mL) was stirred at 110 $^{\circ}$ C for 4 h, then concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 3:1 cyclohexane-AcOEt to give **14a** (140 mg, 76%) as an amorphous solid. $[\alpha]_D^{25} = +26.8$ (*c* 0.9, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz) selected data: δ 7.71 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.47-7.23 (m, 30H, Ar), 5.24 (d, 1H, $J_{1',2'} = 1.8$ Hz, H-1'), 4.95 and 4.63 (2d, 2H, $J = 11.0$ Hz, PhCH₂), 4.92 and 4.62 (2d, 2H, $J = 10.8$ Hz, PhCH₂), 4.10 (ddd, 1H, $J_{6,7} = 9.6$, $J_{7,8a} = 2.3$, $J_{7,8b} = 5.2$ Hz, H-7), 4.06 (dd, 1H, $J_{4,5} = 3.0$, $J_{5,6} = 9.2$ Hz, H-5), 3.89 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 3.0$, $J_{3',4'} = 9.3$ Hz, H-3'), 3.81 (dd, 1H, $J_{3,4} = 2.1$ Hz, H-4), 3.73 (dd, 1H, $J_{4',5'} = 9.0$ Hz, H-4'), 3.54 (dd, 1H, H-6), 3.53 (dq, 1H, $J_{5',6'} = 6.2$ Hz, H-5'),

2.50 (d, 1H, $J_{1,3} = 2.2$ Hz, H-1), 1.37 (d, 3H, 3 H-6'). ^{13}C NMR: δ 145.2 (C), 138.7 (C), 138.6 (C), 138.5 (C), 138.1 (C), 137.8 (C), 137.6 (C), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 127.4 (CH), 123.8 (CH), 80.4 (CH), 80.2 (CH), 80.0 (CH), 78.1 (C), 77.7 (CH), 76.2 (CH), 75.3 (CH₂), 75.1 (CH₂), 74.9 (CH), 74.2 (CH), 73.2 (CH), 72.5 (CH₂), 72.2 (CH₂), 72.1 (CH₂), 71.7 (CH₂), 71.1 (CH), 70.3 (CH), 66.2 (CH), 50.6 (CH₂), 18.3 (CH₃). HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calcd for C₅₈H₆₀N₃O₈ (M+H)⁺ 926.4380, found 926.4324.

Trimannoside 14b.

Method a (TMS). The coupling of azide **13** (36 mg, 0.065 mmol) with alkyne **14a** (55 mg, 0.059 mmol) was performed as described for the synthesis of **14a** (*Method a*) to give, after column chromatography on silica gel (from 3:1 to 2:1 cyclohexane-AcOEt), **14b** as an amorphous solid (76 mg, 85%, 90% pure by ^1H NMR analysis).

Method b (HMB). The coupling of azide **15** (70 mg, 0.13 mmol) with alkyne **14a** (120 mg, 0.13 mmol) was performed as described for the synthesis of **14a** (*Method b*) to give, after column chromatography on silica gel (from 3:1 to 2:1 cyclohexane-AcOEt), **14b** as an amorphous solid (146 mg, 79%); $[\alpha]_{\text{D}} = +9.4$ (c 0.9, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.71 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.42-7.19 (m, 46H, Ar, H-5 Tr.), 5.22 and 5.18 (2d, 2H, $J_{1',2'} = 1.8$ Hz, $J_{1'',2''} = 1.8$ Hz, H-1', H-1''), 4.89 (dd, 1H, $J_{1,3} = J_{3,4} = 2.3$ Hz, H-1), 3.96 (dd, 1H, $J_{4,5} = 3.0$, $J_{5,6} = 9.4$ Hz, H-5), 3.70 (dd, 1H, $J_{3'',4''} = J_{4'',5''} = 9.5$ Hz, H-4''), 3.64 (dd, 1H, $J_{3',4'} = J_{4',5'} = 9.2$ Hz, H-4'), 3.52 (dq, 1H, $J_{5'',6''} = 6.0$ Hz, H-5''), 3.41 (dd, 1H, $J_{5,6} = 9.5$ Hz, H-6), 2.34 (d, 1H, H-1), 1.31 (d, 3H, 3 H-6''). ^{13}C NMR: δ 145.1 (C), 143.9 (C), 138.6 (C), 138.3 (C), 138.1 (C), 137.9 (C), 137.7 (C), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 127.95 (CH), 127.89 (CH), 127.81 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 127.3 (CH), 124.1 (CH), 123.9 (CH), 80.5 (CH), 80.3 (CH), 80.0 (CH), 78.2 (C), 77.8 (CH), 76.1 (CH), 75.2 (CH₂), 74.9 (C), 74.7 (CH), 74.3 (CH), 73.4 (CH₂), 72.6 (CH₂), 72.5 (CH₂), 71.9 (CH₂), 71.6 (CH₂), 71.2 (CH), 71.0 (CH), 70.4 (CH), 66.1 (CH), 51.1 (CH₂), 50.6 (CH₂), 18.3 (CH₃). HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calcd for $\text{C}_{87}\text{H}_{89}\text{N}_6\text{O}_{12}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 1409.6538, found 1409.6442.

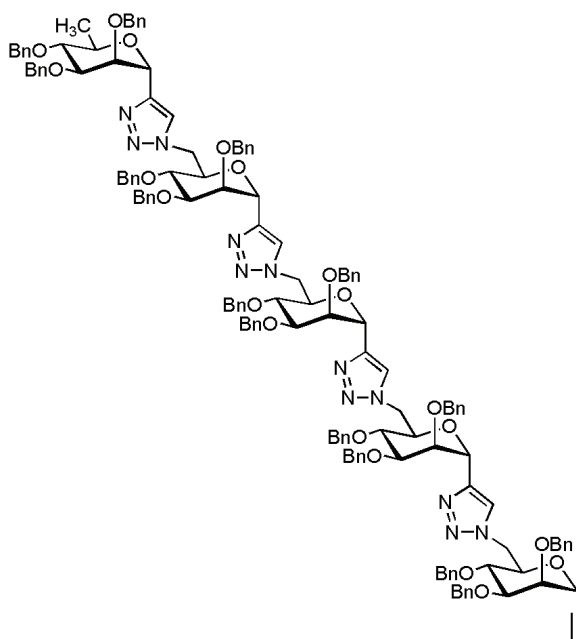
Tetramannoside 14c.

Method a (TMS). The coupling of azide **13** (20 mg, 0.036 mmol) with alkyne **14b** (46 mg, 0.033 mmol) was performed as described for the synthesis of **14a** (*Method a*) to give, after column chromatography on silica gel (2:1 cyclohexane-AcOEt), **14c** as an amorphous solid (55 mg, 88%, 80% pure by ^1H NMR analysis).

Method b (HMB). The coupling of azide **15** (46 mg, 0.085 mmol) with alkyne **14b** (120 mg, 0.085 mmol) was performed as described for the synthesis of **14a** (*Method b*) to give, after column chromatography on silica gel (2:1 cyclohexane-AcOEt), **14c** as an amorphous solid (130 mg, 81%);

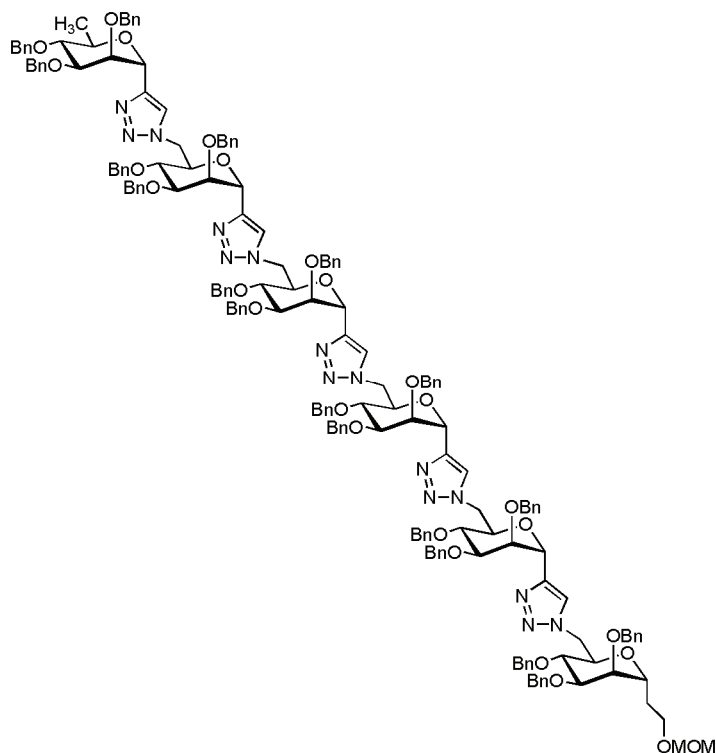
Method c (convergent route). A mixture of alkyne **14a** (110 mg, 0.12 mmol), of known⁷ azide **27** (122 mg, 0.12 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (42 μL , 0.24 mmol), CuI (5 mg, 24 μmol), and DMF (0.6 mL) in a vial sealed with a Teflon septum and aluminium crimp was subjected to microwave irradiation for 15 min at 80 $^\circ\text{C}$, then cooled to room temperature, diluted with AcOEt (50 mL), washed with 0.05 M aqueous solution of EDTA (3 x 10 mL), dried (Na_2SO_4), and concentrated. A mixture of this residue, anhydrous K_2CO_3 (7 mg, 50 μmol), 18-crown-6 ether (6 mg, 24 μmol), and toluene (1 mL) was stirred at 110 $^\circ\text{C}$ for 4 h, then concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 2:1 cyclohexane-AcOEt to give **14c** (308 mg, 92%) as an amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}} = -2.7$ (c 0.7, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz) selected data: δ 7.79 and 7.48 (2s, 2H, 2 H-5 Tr.), 7.45-7.20 (m, 61H, Ar, H-5 Tr.), 5.39, 5.26, and 5.23 (3d, 3H, $J_{1',2'} = 1.8$ Hz, $J_{1'',2''} = 1.8$ Hz, $J_{1''',2'''} = 1.8$ Hz, H-1', H-1'', H-1'''), 2.32 (d, 1H, $J_{1,3} = 2.3$ Hz, H-1), 1.36 (d, 3H, $J_{5''',6'''} = 6.0$ Hz, 3 H-6''').

^{13}C NMR: δ 145.1 (C), 143.9 (C), 143.7 (C), 138.8 (C), 138.6 (C), 138.33 (C), 138.27 (C), 138.1 (C), 137.9 (C), 137.8 (C), 128.9-127.3 (CH), 124.4 (CH), 124.0 (CH), 80.5 (CH), 80.4 (CH), 80.2 (CH), 80.0 (CH), 79.8 (CH), 78.2 (C), 77.7 (C), 76.2 (CH), 75.2 (CH₂), 74.9 (CH), 74.8 (CH), 74.5 (CH), 73.5 (CH), 72.5 (CH₂), 72.3 (CH), 72.0 (CH₂), 71.6 (CH₂), 71.1 (CH), 71.0 (CH), 70.3 (C), 66.2 (CH), 51.2 (CH₂), 50.8 (CH₂), 50.5 (CH₂), 18.4 (CH₃). HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calcd for (C₁₁₆H₁₁₉N₉O₁₆)/2 (M+2H)²⁺ 946.9387, found 946.9335.

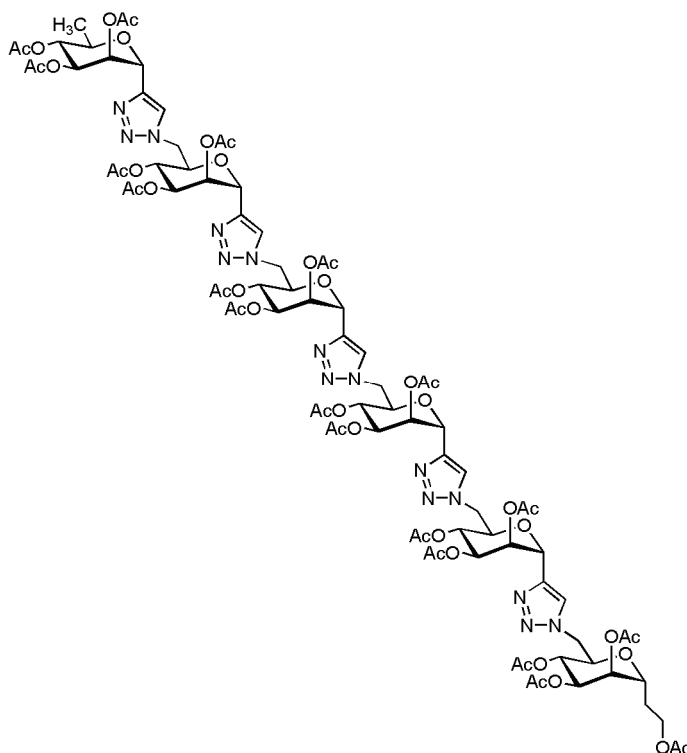
Pentamannoside 14d.

Method a. The coupling of azide **13** (9 mg, 0.017 mmol) with alkyne **14c** (29 mg, 0.015 mmol) was performed as described for the synthesis of **14a** (*Method a*) to give, after column chromatography on silica gel (2:1 cyclohexane-AcOEt), **14d** as a white solid (24 mg, 70%, 50% pure by ^1H NMR analysis).

Method b. The coupling of azide **15** (35 mg, 0.064 mmol) with alkyne **14c** (120 mg, 0.064 mmol) was performed as described for the synthesis of **14a** (*Method b*) to give, after column chromatography on silica gel (2:1 cyclohexane-AcOEt), **14d** as a white solid (115 mg, 76%); mp 130-132 °C (MeOH); $[\alpha]_{\text{D}} = -40.9$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.80 (s, H, H-5 Tr.), 7.42-6.95 (m, 78H, Ar, 3 H-5 Tr.), 5.54, 5.52, and 5.28 (3bs, 4H, H-1', H-1'', H-1''', H-1''''), 4.97 (dd, 1H, $J_{1,3} = J_{1,3} = 2.2$ Hz, H-3), 2.12 (d, 1H, H-1), 1.35 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, 3 H-6'''). ^{13}C NMR selected data: δ 145.0 (C), 143.6 (C), 143.54 (C), 143.50 (C), 124.7 (CH), 124.5 (CH), 124.0 (CH), 51.1 (CH_2), 51.0 (CH_2), 50.8 (CH_2), 50.3 (CH_2), 18.4 (CH_3). HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calcd for $(\text{C}_{145}\text{H}_{148}\text{N}_{12}\text{O}_{20})/2$ $(\text{M}+2\text{H})^{2+}$ 1188.5466, found 1188.5460.

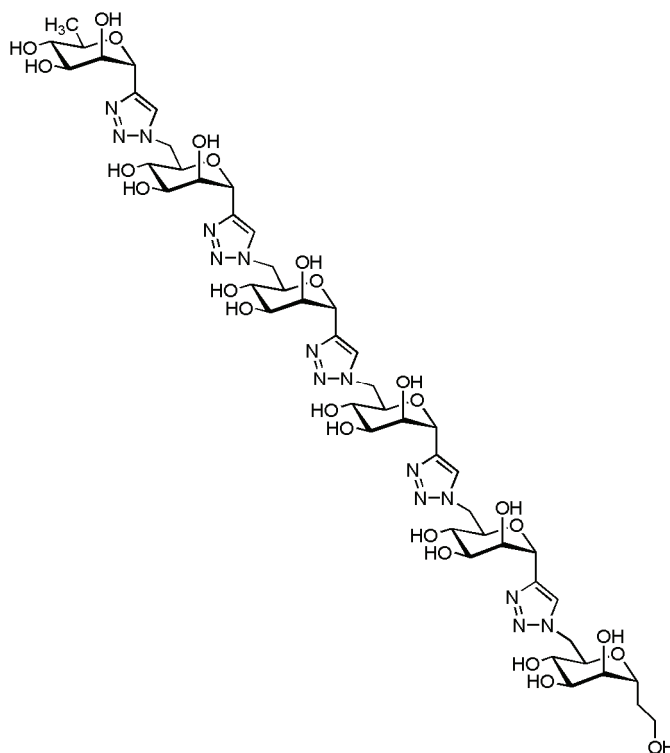
Hexamannoside 20.

A mixture of alkyne **14d** (29 mg, 0.013 mmol), azide **2** (7.6 mg, 0.014 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (5 μ L, 0.026 mmol), CuI (0.5 mg, 0.0026 mmol) and DMF (0.7 mL) in a vial sealed with a Teflon septum and aluminium crimp was subjected to microwave irradiation for 15 min at 80 $^{\circ}$ C, then cooled to room temperature, diluted with AcOEt (40 mL), washed with 0.05 M solution of EDTA in H₂O (10 mL) and H₂O (10 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated. The crude material was triturated with MeOH and the resulting solid was eluted from a column of silica gel with 8:1 CHCl₃-Et₂O (containing 0.5% of Et₃N) to afford **20** (28 mg, 72%) as an amorphous solid; $[\alpha]_D = -52.5$ (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.85 (s, H, H-5 Tr.), 7.52-6.80 (m, 94H, Ar, 4 H-5 Tr.), 5.64, 5.63, 5.52, and 5.32 (4bs, 5H, H-1', H-1'', H-1''', H-1''''', H-1'''''''), 3.15 (s, 3H, OCH₃), 1.39 (d, 3H, *J* = 6.0 Hz, 3 H-6'''''). ¹³C NMR selected data: δ 145.1 (C-4 Tr.), 143.6-143.4 (C-4 Tr.), 124.6-124.1 (C-5 Tr.), 96.2 (CH₃OCH₂), 55.0 (CH₃OCH₂), 29.7 (CH₂), 18.4 (CH₃). HRMS (MALDI-TOF): average mass calcd for C₁₇₆H₁₈₄N₁₅O₂₆ (M+H)⁺ 2925.4825, found 2925.4722.

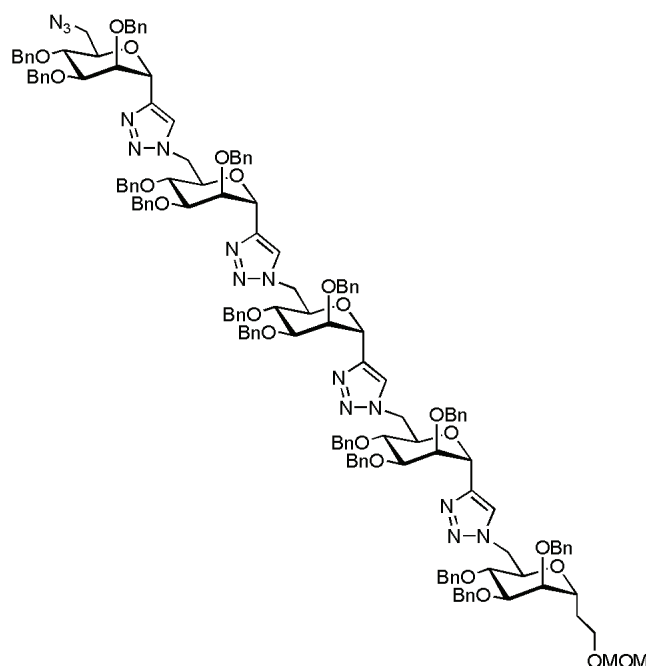
Peracetylated hexamannoside 21.

To a solution of **20** (22 mg, 7.5 μmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (5 mL) was added trifluoroacetic acid (200 μL). The solution was kept at room temperature for 3 h, then concentrated. The ^{13}C NMR analysis of the crude product proved the absence of the methoxymethyl protecting group. To a stirred, cooled ($-60\text{ }^\circ\text{C}$) solution of the residue in anhydrous CH_2Cl_2 (2 mL) was added a 1 M solution of BCl_3 in CH_2Cl_2 (370 μL , 0.37 mmol). The solution was stirred at $-60\text{ }^\circ\text{C}$ for 1 h and, after an additional 1 h stirring at $0\text{ }^\circ\text{C}$, diluted with MeOH (0.5 mL), stirred at $0\text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min, diluted with Et_3N (0.5 mL), concentrated, and dried under high vacuum to give a white solid. A suspension of the residue in pyridine (2 mL) and acetic anhydride (1 mL) was stirred at room temperature for 24 h, then diluted with MeOH (1 mL) and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with AcOEt to give **21** (10 mg, 63%) as a white solid; $[\alpha]_{\text{D}} = +7.3$ (c 0.6, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.96, 7.75, 7.72, 7.71, and 7.65 (5s, 5H, 5 H-5 Tr.), 5.84, 5.82, 5.78, and 5.72 (4dd, 6H, $J = 2.5, 2.5$ Hz, H-2, H-4', H-4'', H-4''', H-4''''), 5.62-5.46 (6dd, 6H, $J = 2.5, 9.6$ Hz, H-3, H-5', H-5'', H-5''', H-5''''), 1.39 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, 3 H-6''''').

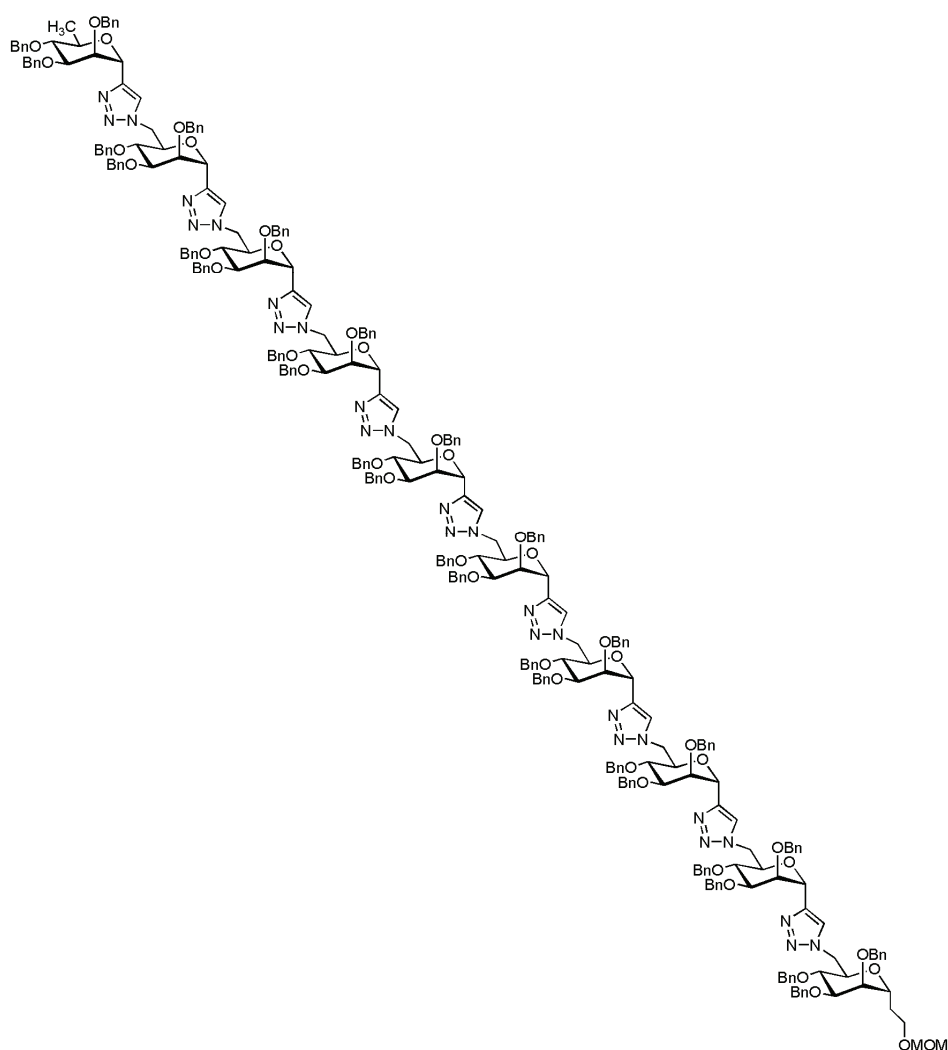
^{13}C NMR selected data: δ 170.8-169.8 (C), 143.1 (C-4 Tr.), 142.2-141.8 (C-4 Tr.), 124.5-123.9 (C-5 Tr.), 29.7 (CH_2), 20.9-20.7 (CH_3), 17.6 (CH_3). HRMS (MALDI-TOF): monoisotopic mass calcd for $\text{C}_{86}\text{H}_{109}\text{N}_{15}\text{O}_{44}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 2056.6831, found 2056.6470.

Free hydroxy hexamannoside TOM6.

To a solution of **21** (10 mg, 4.8 μmol) in MeOH (2 mL) was added a 2 M solution of ammonia in MeOH (2 mL). The solution was kept at room temperature overnight, then concentrated to give **TOM6** (6 mg, quantitative) as an amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}} = +1.4$ (c 0.4, D_2O). ^1H NMR (400 MHz, D_2O) selected data: δ 7.96, 7.50, 7.44, 7.17, and 7.09 (5s, 5H, 5 H-5 Tr.), 5.10, 5.05, 5.03, and 4.97 (4bs, 5H, H-1', H-1'', H-1''', H-1''''', H-1'''''), 1.11 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, 3 H-6'''''). ^{13}C NMR (D_2O) selected data: δ 144.0 and 143.7 (C-4 Tr.), 125.4 and 125.1 (C-5 Tr.), 51.4 (CH_2), 17.1 (CH_3). HRMS (MALDI-TOF): monoisotopic mass calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{71}\text{NaN}_{15}\text{O}_{25}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 1280.4643, found 1280.4520.

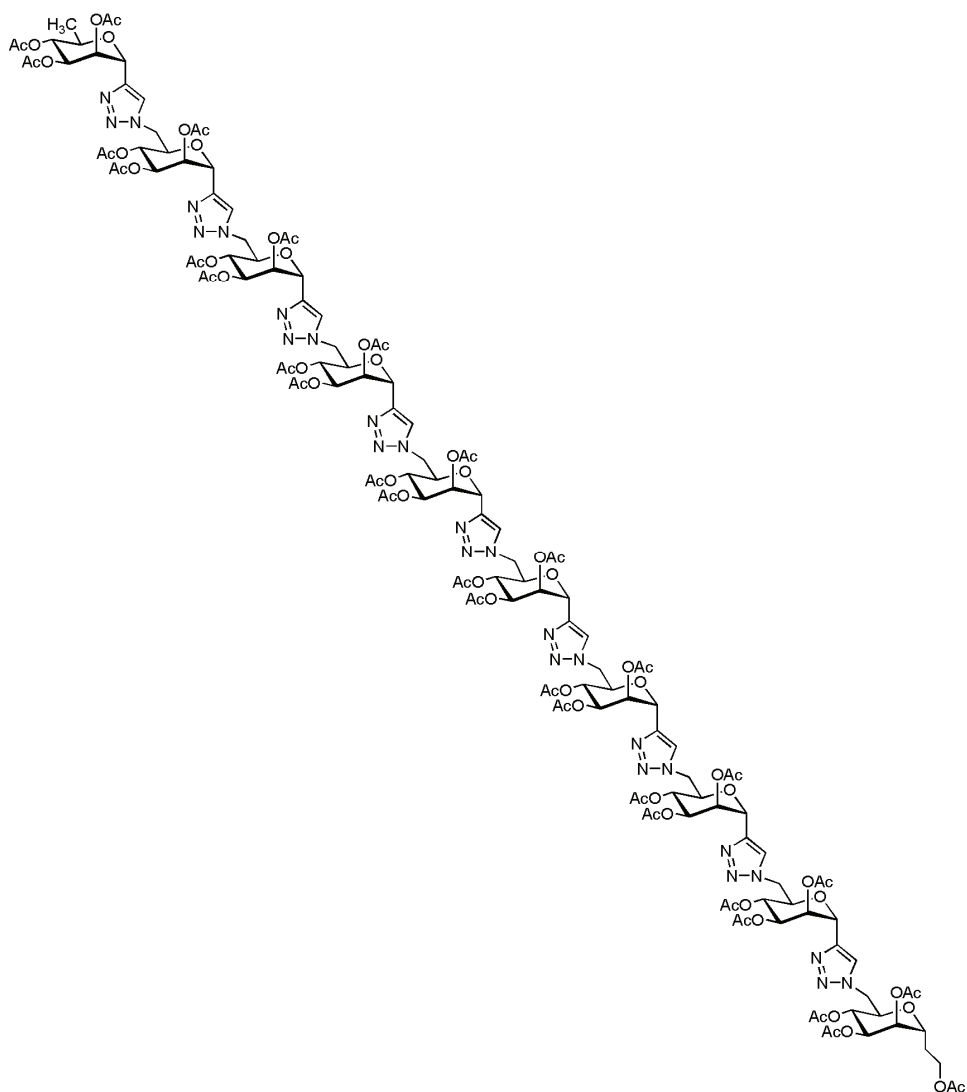
Pentamannoside azide 22.

A mixture of alcohol **9** (93 mg, 0.038 mmol), diphenyl phosphoryl azide (24 μ L, 0.114 mmol), 1,8-diazabicyclo[5.4.0.]undec-7-ene (11 μ L, 0.076 mmol) and anhydrous DMF (0.6 mL) in a vial sealed with a Teflon septum and aluminium crimp was subjected to microwave irradiation for 2 h at 120 $^{\circ}$ C, then cooled to room temperature, diluted with AcOEt (50 mL), washed with saturated aqueous Na_2CO_3 (20 mL), dried (Na_2SO_4), and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel (from 3:1 to 2:1 cyclohexane-AcOEt containing 0.5% of Et_3N), to afford **22** (93 mg, 78%) as an amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}} = -4.2$ (c 0.5, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz) selected data: δ 7.94, 7.63, 7.57, and 7.45 (4s, 4H, 4 H-5 Tr.), 7.42-7.15 (m, 75H, Ar), 5.43, 5.38, and 5.30 (3bs, 4H, H-1', H-1'', H-1''', H-1''''), 3.22 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR selected data: δ 144.5 (C), 143.7 (C), 138.5-137.9 (C), 128.9-127.4 (CH), 124.7 (CH), 124.5 (CH), 123.9 (CH), 96.3 (CH_2), 63.8 (CH_2), 55.1 (CH_3), 51.7 (CH_2), 50.9 (CH_2), 29.6 (CH_2). HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calcd for $(\text{C}_{147}\text{H}_{155}\text{N}_{15}\text{O}_{22})/2$ ($\text{M}+2\text{H}$) $^{2+}$ 1241.0736, found 1241.0675.

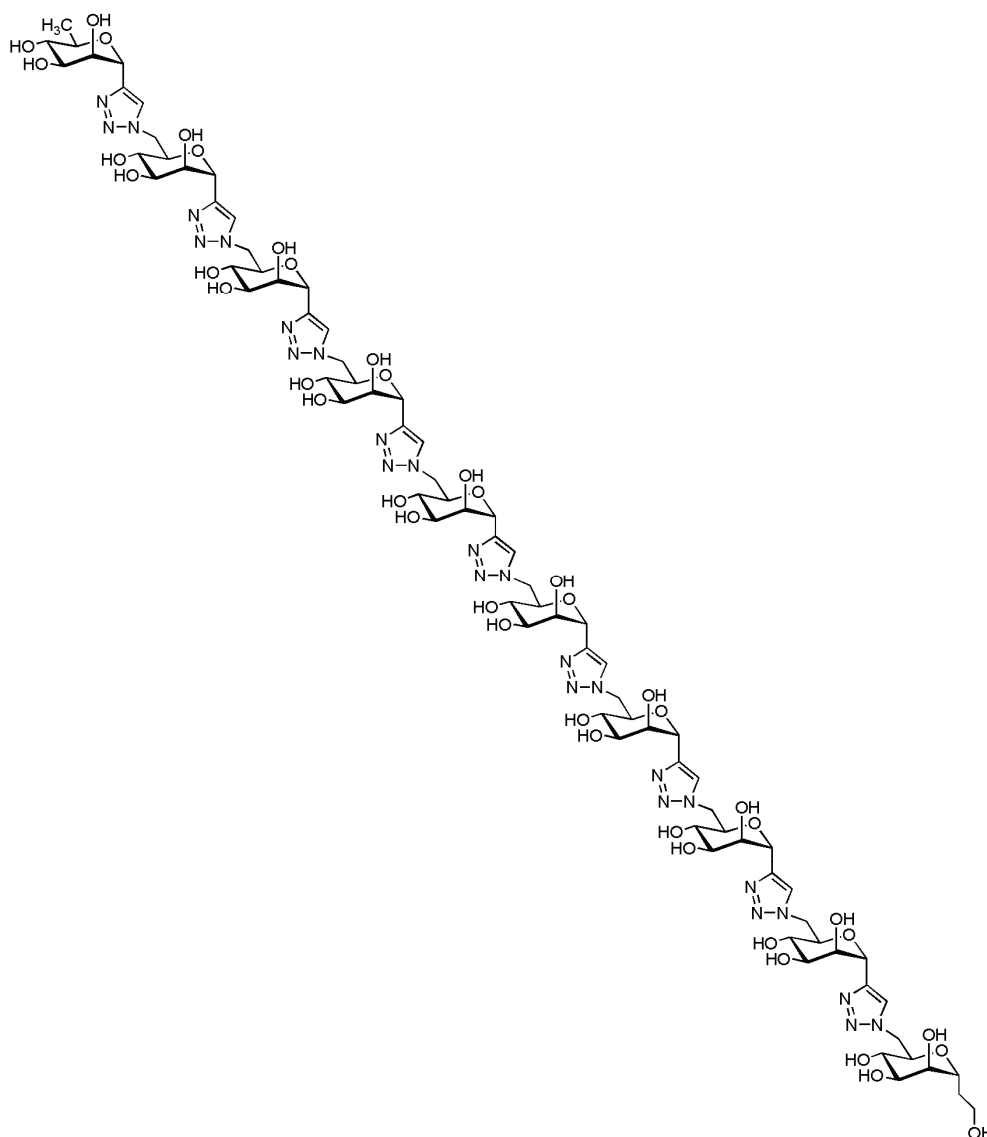
Decamannoside **23**.

A mixture of alkyne **14d** (60.6 mg, 25.5 μmol), azide **22** (63.2 mg, 25.5 μmol), *N,N*-diisopropylethylamine (9 μL , 51 μmol), CuI (1 mg, 5 μmol) and DMF (0.6 mL) in a vial sealed with a Teflon septum and aluminium crimp was subjected to microwave irradiation for 30 min at 80 $^{\circ}\text{C}$, then cooled to room temperature, diluted with CH_2Cl_2 (60 mL), washed with a 0.05 M solution of EDTA in H_2O (15 mL) and H_2O (15 mL), dried (Na_2SO_4), and concentrated. The crude material was triturated with CH_3CN to give **23** (115 mg, 93%) as a white solid; mp 210-213 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}} = +19.2$ (*c* 0.8, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.88, 6.98, 6.64, 6.45, 6.35, 6.30, 6.26, 6.25, and 6.15 (9s, 9H, 9 H-5 Tr.), 6.07, 6.06, 6.02, 5.98, 5.94, 5.87, 5.73, 5.49, 5.42, and 5.17 (10bs, 10H, 10 anom. H), 3.08 (s, 3H, CH_3OCH_2), 1.40 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR selected data: δ 145.0 (C-4 Tr.), 143.3-143.0 (C-4 Tr.), 139.7-137.5 (C), 128.4-126.7 (CH), 125.3-124.0 (C-5 Tr.), 96.0 (CH_2), 54.8 (CH_3), 29.7 (CH_2), 29.4 (CH_2), 18.5 (CH_3). HRMS (MALDI-TOF): average mass calcd for $\text{C}_{292}\text{H}_{300}\text{N}_{27}\text{O}_{42}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 4859.7508, found 4859.8052.

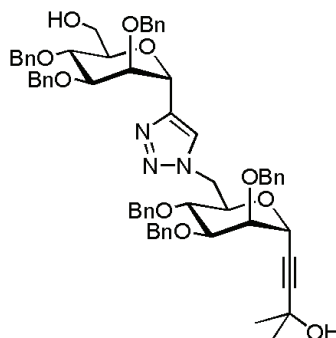
Peracetylated decamannoside 24.

The deprotection of **23** (22 mg, 7.5 μmol) was performed as described for the synthesis of **7e** to give, after column chromatography on silica gel (AcOEt), **24** as an amorphous solid (14 mg, 66%); $[\alpha]_{\text{D}} = +6.6$ (c 0.7, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.96, 7.70, 7.69, 7.67, and 7.61 (5s, 9H, 9 H-5 Tr.), 5.85-5.72 (10dd, 10H, $J_{1,2} = 2.2$, $J_{2,3} = 3.3$ Hz, 10 H-2 mannose), 5.62-5.44 (10dd, 10H, $J_{3,4} = 9.8$ Hz, 10 H-3 mannose), 1.18 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR selected data: δ 170.1-169.9 (C=O), 142.0-141.8 (C-4 Tr.), 124.8-124.0 (C-5 Tr.), 50.8 (CH_3), 26.9 (CH_2), 17.5 (CH_3). HRMS (MALDI-TOF): average mass calcd for $\text{C}_{142}\text{H}_{177}\text{KNaN}_{27}\text{O}_{72}$ ($\text{M}+\text{Na}+\text{K}$) $^{2+}$ 3476.1942, found 3476.3250.

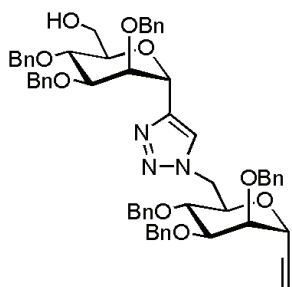
Free hydroxy decamannoside TOM10.

The debenzoylation of **24** (13 mg, 3.8 μmol) was performed as described for the synthesis of **TOM6** to give **TOM10** as an amorphous solid (8 mg, quantitative); $[\alpha]_{\text{D}} = +3.5$ (*c* 0.2, DMF). ^1H NMR (300 MHz, D_2O) selected data: δ 7.96, 7.80, 7.68, and 7.53 (4bs, 9H, 9 H-5 Tr.), 1.28 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, CH_3). Due to the small amount of product, a clean ^{13}C NMR spectrum could not be registered from this compound. HRMS (MALDI-TOF): monoisotopic mass calcd for $\text{C}_{80}\text{H}_{115}\text{NaN}_{27}\text{O}_{41}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 2132.7641, found 2132.8328.

8-[4-(2',3',4'-tri-*O*-benzyl-6-hydroxy- α -D-mannopyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-3,7-anhydro-4,5,6-tri-*O*-benzyl-1,2,8-trideoxy-1-*C*-[2-(2-hydroxy)propyl]-D-glycero-D-talo-oct-1-ynitol (25**).**

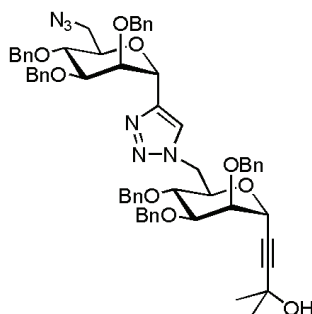


A mixture of alkyne **1** (420 mg, 0.92 mmol), azide **15** (497 mg, 0.92 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (320 μ L, 1.84 mmol), CuI (34 mg, 0.18 mmol), and DMF (4 mL) in a vial sealed with a Teflon septum and aluminium crimp was subjected to microwave irradiation for 15 min at 80 $^{\circ}$ C, then cooled to room temperature, diluted with AcOEt (150 mL), washed with 0.05 M aqueous solution of EDTA (3 x 30 mL), dried (Na_2SO_4), and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 3:2 cyclohexane-AcOEt to give **25** (818 mg, 89%) as an amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}} = -13.6$ (*c* 0.9, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.72 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.46-7.26 (m, 30H, Ar), 5.23 (d, 1H, $J_{1',2'} = 2.0$ Hz, H-1'), 4.96 and 4.89 (2d, 2H, $J = 11.0$ Hz, PhCH_2), 4.82 and 4.71 (2d, 2H, $J = 12.5$ Hz, PhCH_2), 4.77 and 4.59 (2d, 2H, $J = 12.5$ Hz, PhCH_2), 4.77 (dd, 1H, $J_{1',2'} = 2.0$, $J_{2',3'} = 3.0$ Hz, H-2'), 4.74 (d, 1H, $J_{1',2'} = 2.2$ Hz, H-3), 4.72 and 4.61 (2d, 2H, $J = 11.5$ Hz, PhCH_2), 4.52 (dd, 1H, $J_{7,8b} = 7.0$, $J_{8a,8b} = 14.2$ Hz, H-8b), 3.72 (dd, 1H, $J_{3,4} = 2.0$, $J_{4,5} = 3.0$ Hz, H-4), 3.62 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 9.0$, $J_{4',5'} = 9.0$ Hz, H-4'), 3.43 (m, 1H, H-5'), 1.31 (s, 6H, 2 CH_3). ^{13}C NMR: δ 144.6 (C), 138.4 (C), 138.0 (C), 137.9 (C), 137.7 (C), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 127.6 (CH), 127.4 (CH), 123.7 (CH), 95.1 (C), 80.4 (CH), 79.4 (CH), 76.4 (CH), 75.3 (CH_2), 75.1 (CH_2), 75.0 (CH), 74.8 (CH), 74.7 (CH), 74.3 (CH), 73.2 (CH), 72.8 (CH_2), 72.1 (CH_2), 71.9 (CH_2), 71.5 (CH), 66.4 (CH), 64.4 (C), 62.9 (CH_2), 50.8 (CH_2), 31.2 (CH_3), 30.9 (CH_3). HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calcd for $\text{C}_{58}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_9$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 942.4330, found 926.4366.

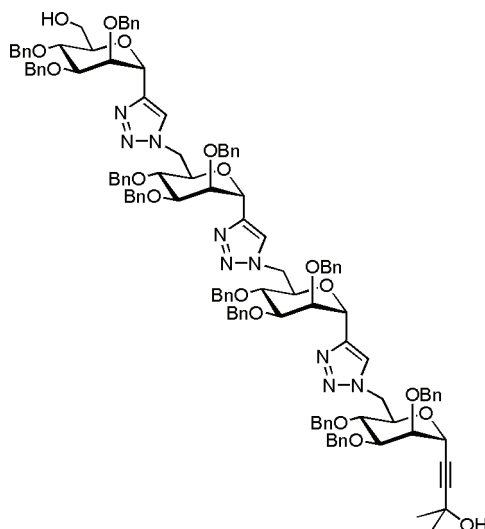
8-[4-(2',3',4'-tri-*O*-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-3,7-anhydro-4,5,6-tri-*O*-benzyl-1,2,8-trideoxy-D-glycero-D-talo-oct-1-ynitol (26**).**

A mixture of **25** (355 mg, 0.36 mmol), anhydrous K_2CO_3 (20 mg, 0.15 mmol), 18-crown-6 ether (19 mg, 0.07 mmol), and toluene (3 mL) was stirred at 110 °C for 4 h, then concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 2:1 cyclohexane-AcOEt to give **26** (308 mg, 92%) as an amorphous solid; $[\alpha]_D^{25} = +28.9$ (c 1.1, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.68 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.43-7.21 (m, 30H, Ar), 5.25 (d, 1H, $J_{1',2'} = 2.0$ Hz, H-1'), 4.00 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 9.0$, $J_{3',4'} = 9.5$ Hz, H-3'), 3.91 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 9.0$, $J_{4',5'} = 3.0$ Hz, H-4'), 2.49 (d, 1H, $J_{1,3} = 2.2$, H-1), 2.07 (m, 1H, OH). ^{13}C NMR: δ 144.6 (C), 138.4 (C), 138.0 (C), 137.8 (C), 137.5 (C), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 123.9 (CH), 95.1 (C), 80.2 (CH), 80.0 (CH), 78.2 (C), 77.6 (C), 76.1 (CH), 75.3 (CH₂), 75.2 (CH), 75.0 (CH₂), 74.8 (CH), 74.2 (CH), 74.1 (CH), 73.2 (CH₂), 72.7 (CH₂), 72.1 (CH₂), 72.0 (CH₂), 71.8 (CH₂), 71.3 (CH), 66.1 (CH), 62.7 (CH₂), 50.6 (CH₂), 31.2 (CH₃), 30.9 (CH₃). HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calcd for $C_{61}H_{65}N_3O_{10}$ (M+H)⁺ 1000.47140, found 1000.4748.

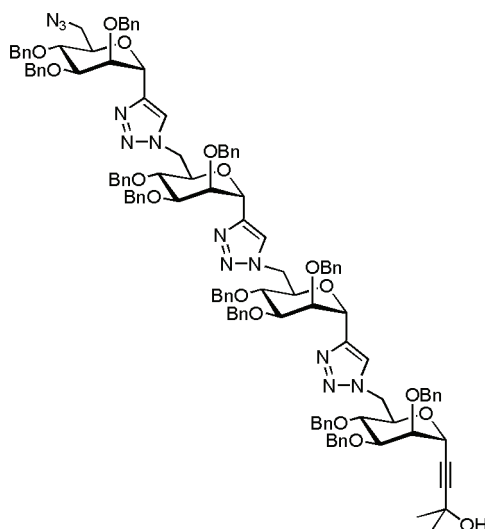
8-[6'-azido-(2',3',4'-tri-*O*-benzyl-6'-deoxy- α -D-mannopyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-3,7-Anhydro-8-azido-4,5,6-tri-*O*-benzyl-1,2,8-trideoxy-1-*C*-[2-(2-hydroxy)propyl]-D-glycero-D-talo-oct-1-ynitol (27**).**



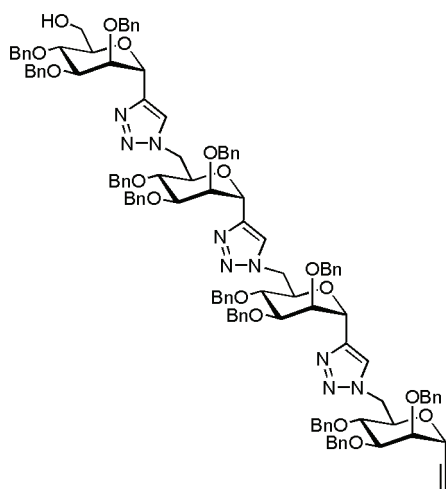
A mixture of alcohol **25** (440 mg, 0.44 mmol), freshly distilled Et₃N (0.19 mL, 1.32 mmol), and *p*-toluenesulfonyl chloride (126 mg, 0.66 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (4 mL) was stirred at room temperature for 3 h, then diluted with CH₂Cl₂ (40 mL), washed with 1M phosphate buffer at pH 7 (2 x 15 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residue was filtered through a short column of silica gel with 2:1 cyclohexane-AcOEt to give the 8'-*O*-tosyl derivative as a white solid (545 mg). A mixture of this compound, sodium azide (143 mg, 2.20 mmol), and anhydrous DMF (3 mL) was stirred at 55 °C for 19 h, then cooled to room temperature, diluted with AcOEt (40 mL), washed with H₂O (2 x 15 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 3:1 cyclohexane-AcOEt to give **27** (352 mg, 78%) as a syrup; [α]_D = +32.1 (*c* 0.8, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.81 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.44-7.20 (m, 30H, Ar), 5.24 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 1.5 Hz, H-1'), 4.96 and 4.72 (2d, 2H, *J* = 10.5 Hz, PhCH₂), 4.89 and 4.57 (2d, 2H, *J* = 10.8 Hz, PhCH₂), 4.81 (dd, 1H, *J*_{1',2'} = 1.5, *J*_{2',3'} = 3.0 Hz, H-2'), 4.77 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 2.0 Hz, H-3), 3.72 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 2.0, *J*_{4,5} = 3.5 Hz, H-4), 3,38 (dd, 1H, *J*_{5',6a'} = 7.2, *J*_{6a',6b'} = 13.0 Hz, H-6a), 3,38 (dd, 1H, *J*_{5',6b'} = 2.5, *J*_{6a',6b'} = 13.0 Hz, H-6b), 1.32 and 1.31 (2 s, 6 H, 2 CH₃). ¹³C NMR: δ 144.3 (C), 138.2 (C), 137.9 (C), 137.7 (C), 137.6 (C), 137.5 (C), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 127.9 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 127.4 (CH), 124.3 (CH), 94.9 (C), 80.3 (CH), 79.3 (CH), 76.4 (CH), 75.2 (CH), 75.2 (CH₂), 74.9 (CH₂), 74.4 (CH), 74.3 (CH), 73.9 (CH), 73.1 (CH₂), 72.5 (CH₂), 71.9 (CH₂), 71.7 (CH₂), 71.6 (CH₂), 71.1 (CH), 66.1 (CH), 64.4 (C), 51.5 (CH₂), 50.6 (CH₂), 31.1 (CH₃), 30.8 (CH₃). HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z* calcd for C₆₁H₆₄N₆O₉ (M+H)⁺ 1025.4813, found 1025.4748.

Tetramannoside alkyne-HMB (29).

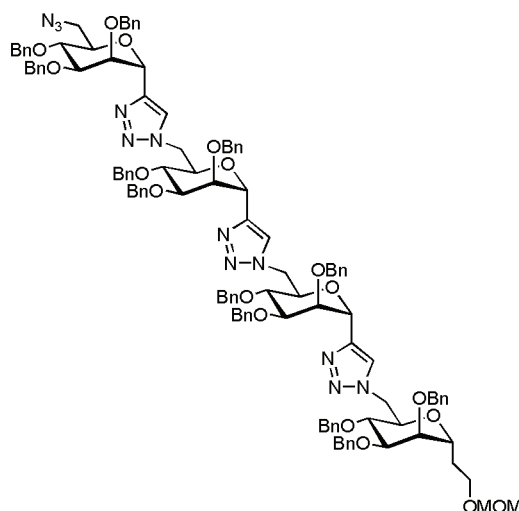
The coupling of azide **27** (178 mg, 0.17 mmol) with alkyne **26** (165 mg, 0.14 mmol) was performed as described for the synthesis of **25** to give, after column chromatography on silica gel (from 2:1 to 1:1 cyclohexane-AcOEt), **29** as an amorphous solid (259 mg, 76%). $[\alpha]_D = +6.8$ (c 0.8, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz) selected data: δ 7.79 (1s, 1H, H-5 Tr.), 7.39-7.12 (m, 62H, Ar, 2 H-5 Tr.), 5.39, 5.26, and 5.23 (3d, 3H, $J_{1',2'} = 1.5$ Hz, $J_{1'',2''} = 1.5$ Hz, $J_{1''',2'''} = 1.5$ Hz, H-1', H-1'', H-1'''), 4.96 (d, 1H, $J_{3,4} = 1.5$ Hz, H-3), 2.40 (m, 1H, OH), 1.24 and 1.22 (2 s, 6 H, 2 CH_3). $^{13}\text{C NMR}$: δ 144.5 (C), 143.4 (C), 138.5 (C), 138.3 (C), 138.1 (C), 138.0 (C), 137.9 (C), 137.6 (C), 128.7-127.5 (CH), 124.3 (CH), 124.0 (CH), 95.0 (C), 80.0 (CH), 79.5 (CH), 76.5 (CH), 75.3 (CH), 75.1 (CH_2), 74.9 (CH_2), 74.6 (CH), 73.1 (CH), 72.6 (CH_2), 72.5 (CH_2), 72.3 (CH), 71.8 (CH_2), 71.6 (CH_2), 71.4 (CH_2), 71.1 (CH), 66.1 (CH), 64.2 (C), 62.7 (CH_2), 51.1 (CH_2), 50.5 (CH_2), 31.1 (CH_3), 30.9 (CH_3). HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calcd for $(\text{C}_{119}\text{H}_{123}\text{N}_9\text{O}_{18})/2$ ($\text{M}+2\text{H}$) $^{2+}$ 983.9571, found 983.9586.

Tetramannoside azide (31).

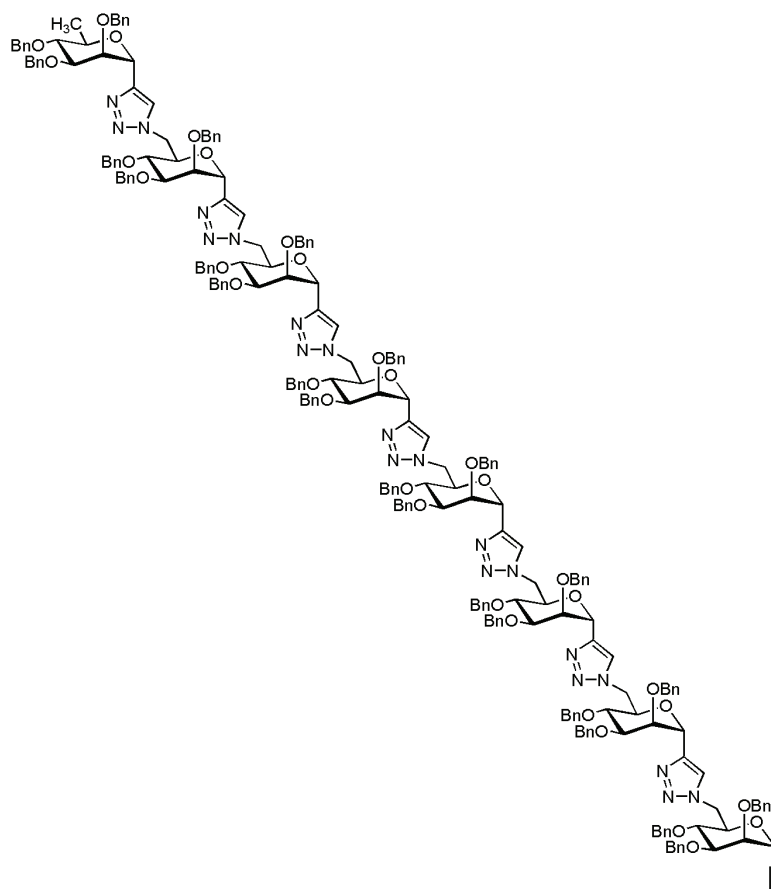
A mixture of alcohol **29** (150 mg, 0.08 mmol), freshly distilled Et₃N (42 μL, 0.30 mmol), and *p*-toluensulfonyl chloride (29 mg, 0.15 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (4 mL) was stirred at room temperature for 3 h, then diluted with CH₂Cl₂ (30 mL), washed with 1M phosphate buffer at pH 7 (2 x 10 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residue was filtered through a short column of silica gel with 2:1 cyclohexane-AcOEt to give the 8'''-*O*-tosyl derivative as a white solid (165 mg). A mixture of this compound, sodium azide (26 mg, 0.40 mmol), and anhydrous DMF (3 mL) was stirred at 55 °C for 19 h, then cooled to room temperature, diluted with AcOEt (30 mL), washed with H₂O (2 x 10 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 2:1 cyclohexane-AcOEt to give **31** (118 mg, 79%) as a syrup; [α]_D = +4.3 (*c* 1.1, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.91 (1s, 1H, H-5 Tr.), 7.41-7.06 (m, 62H, Ar, 2 H-5 Tr.), 5.41-5.25 m, 3H, H-1', H-1'', H-1'''), 4.99 (d, 1H, *J*_{3,4} = 2.0 Hz, H-3), 3.68-3.65 (m, 1H, H-4), 1.23 and 1.19 (2 s, 6 H, 2 CH₃). ¹³C NMR: δ HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z* calcd for (C₁₁₉H₁₂₂N₁₂O₁₇)/2 (M+2H)²⁺ 996.4604, found 996.9620.

Tetramannoside alkyne(30).

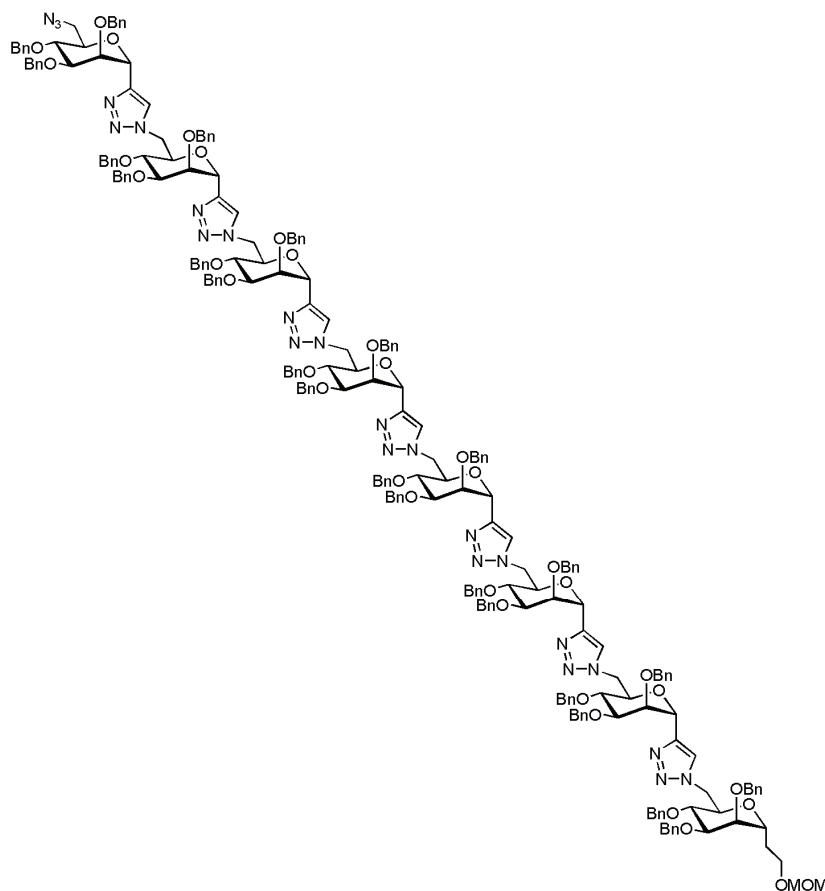
The cleavage of alkyne group of tetramannoside **29** (75 mg, 0.04 mmol) was performed as described for the synthesis of **26**, to give, after column chromatography, on silica gel (2:1 cyclohexane-AcOEt), **30** (65 mg, 76%) as an amorphous solid; $[\alpha]_D = +2.8$ (*c* 1.1, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.79 and 7.47 (2s, 2H, 2 H-5 Tr.), 7.42-7.00 (m, 61H, Ar, 1 H-5 Tr.), 5.35, 5.26, and 5.23 (3d, 3H, $J_{1',2'} = 2.0$ Hz, $J_{1'',2''} = 2.0$ Hz, $J_{1''',2'''} = 2.0$ Hz, H-1', H-1'', H-1'''), 2.32 (d, 1H, $J_{1,3} = 2.2$ Hz, H-1). ¹³C NMR selected data: δ 144.6 (C), 143.8 (C), 143.6 (C), 138.5-137.5 (C), 128.9-127.6 (CH), 124.4 (CH), 124.2 (CH), 124.0 (CH), 95.0 (C), 80.0 (CH), 79.8 (CH), 79.2 (CH), 67.8 (CH), 62.8 (CH₂), 51.1 (CH₂), 50.9 (CH₂), 50.5. HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z* calcd for (C₁₁₆H₁₁₇N₉O₁₇)/2 (M+2H)²⁺ 954.9362, found 954.9412.

Tetramannoside azide (28).

A mixture of alkyne **26** (68 mg, 65 μmol), azide **8** (62 mg, 65 μmol), *N,N*-diisopropylethylamine (23 μL , 0.13 mmol), CuI (2.5 mg, 13 μmol), and DMF (1 mL) in a vial sealed with a Teflon septum and aluminium crimp was subjected to microwave irradiation for 15 min at 80 $^{\circ}\text{C}$, then cooled to room temperature, diluted with AcOEt (50 mL), washed with 0.05 M aqueous solution of EDTA (2 x 15 mL), dried (Na_2SO_4), and concentrated. A mixture of this residue, diphenyl phosphoryl azide (43 μL , 0.20 mmol), 1,8-diazabicyclo[5.4.0.]undec-7-ene (19 μL , 0.13 mmol), sodium azide (22 mg, 0.33) and anhydrous DMF (1 mL) in a vial sealed with a Teflon septum and aluminium crimp was subjected to microwave irradiation for 2 h at 130 $^{\circ}\text{C}$, then cooled to room temperature, diluted with AcOEt (50 mL), washed with saturated aqueous Na_2CO_3 (20 mL), dried (Na_2SO_4), and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 3:1 cyclohexane-AcOEt to give **28** (81 mg, 61%) as an amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}} = -21.6$ (*c* 1.1, CHCl_3). For NMR data see supporting info of Chechev, P.; Marra, A.; Dondoni, A. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 3225-3227

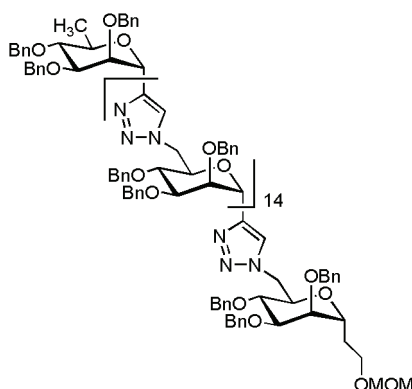
Octamannoside alkyne (32).

A mixture of alkyne **14c** (97 mg, 0.05 mmol), azide **31** (102 mg, 0.05 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (17 μ L, 0.10 mmol), CuI (2 mg, 10 μ mol), and DMF (1 mL) in a vial sealed with a Teflon septum and aluminium crimp was subjected to microwave irradiation for 15 min at 80 $^{\circ}$ C, then cooled to room temperature, diluted with AcOEt (20 mL), washed with 0.05 M aqueous solution of EDTA (2 x 5 mL), dried (Na_2SO_4), and concentrated. A mixture of the residue, anhydrous K_2CO_3 (2.7 mg, 20 μ mol), 18-crown-6 ether (2.6 mg, 10 μ mol), and toluene (1 mL) was stirred at 110 $^{\circ}$ C for 10 h, then concentrated. The crude material was triturated with CH_3OH to give **32** (101 mg, 52%) as an amorphous solid, $[\alpha]_{\text{D}} = -172.3$ (*c* 0.7, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.84 (1s, 1H, H-5 Tr.), 5.47 and 5.4 (2 bs, 2H, 2 anom H) 1.80 (bs, 1H, H-1), 1.40 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR selected data: δ 145.0 (C-4 Tr.), 143.3 (C-4 Tr.), 139.6-137.5 (C), 128.5-126.7 (CH), 124.9-123.9 (C-5 Tr.), 18.5 (CH_3). HRMS (MALDI-TOF): average mass calcd for $\text{C}_{232}\text{H}_{233}\text{N}_{21}\text{O}_{32}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 3828.5323, found 3828.4102.

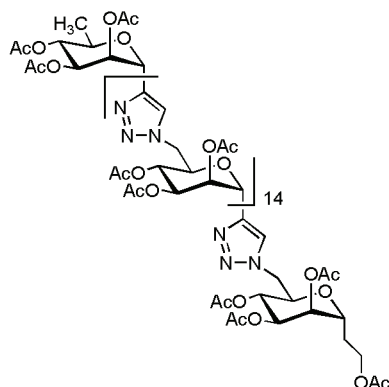
Octamannoside azide (33).

A mixture of alkyne **30** (55 mg, 0.03 mmol), azide **28** (58 mg, 0.03 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (10 μ L, 0.06 mmol), CuI (1 mg, 6 μ mol), and DMF (1 mL) in a vial sealed with a Teflon septum and aluminium crimp was subjected to microwave irradiation for 15 min at 80 $^{\circ}$ C, then cooled to room temperature, diluted with AcOEt (40 mL), washed with 0.05 M aqueous solution of EDTA (3 x 10 mL), dried (Na_2SO_4), and concentrated. A mixture of this residue, diphenyl phosphoryl azide (32 μ L, 0.09 mmol), 1,8-diazabicyclo[5.4.0.]undec-7-ene (9 μ L, 0.06 mmol), sodium azide (10 mg, 0.15) and anhydrous DMF (0.6 mL) in a vial sealed with a Teflon septum and aluminium crimp was subjected to microwave irradiation for 2 h at 130 $^{\circ}$ C, then cooled to room temperature, diluted with AcOEt (30 mL), washed with saturated aqueous Na_2CO_3 (15 mL), dried (Na_2SO_4), and concentrated. The crude material was triturated with CH_3OH to give to afford **33** (71 mg, 63%) as an amorphous solid; $[\alpha]_D = -138.6$ (*c* 1.1, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.92 (1s, 1H, H-5 Tr.), 7.60-6.63 (m, 122 H, Ar, 2 H-5 Tr), 5.97, 5.94, 5.86, 5.72, 5.50, 5.45 (6bs, 6H, 6 anom H), 3.10 (s, 3H, CH_3).

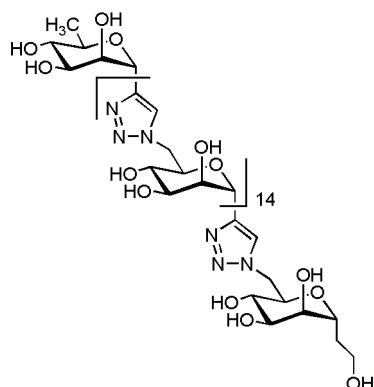
^{13}C NMR selected data: δ 144.5-143,1 (C-4 Tr.), 139.5-137.6 (C), 128.3-126.7 (CH), 125.5-123.9 (C-5 Tr.), 29.7 (CH₃). HRMS (MALDI-TOF): average mass calcd for C₂₃₄H₂₄₀N₂₄O₃₄ (M+H)⁺ 3933.6289, found 3933.4001.

Hexadecamannoside (34).

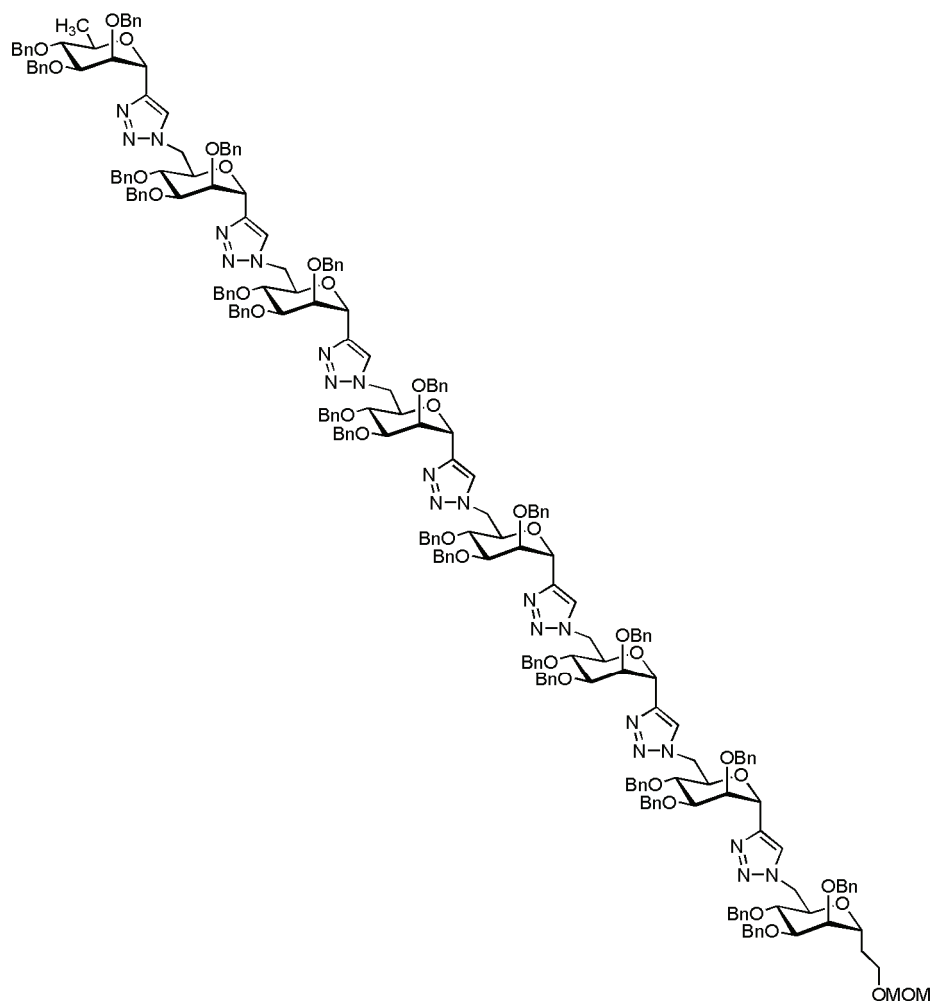
A mixture of alkyne **32** (50.6 mg, 13 μmol), azide **33** (52 mg, 13 μmol), *N,N*-diisopropylethylamine (7 μL , 39 μmol), CuI (0.5 mg, 2.6 μmol) and DMF (0.6 mL) in a vial sealed with a Teflon septum and aluminium crimp was subjected to microwave irradiation for 15 min at 80 $^{\circ}\text{C}$, then cooled to room temperature, diluted with CH_2Cl_2 (40 mL), washed with a 0.05 M solution of EDTA in H_2O (15 mL) and H_2O (15 mL), dried (Na_2SO_4), and concentrated. The crude material was triturated with CH_3CN to give **34** (93 mg, 92%) as a white solid; $[\alpha]_{\text{D}} = -3.2$ (*c* 0.5, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.88 (1s, 1H, H-5 Tr.), 3.17 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR selected data: δ 143.4 (C-4 Tr.), 139.8-137.5 (C), 128.2-126.7 (CH), 124.7 (C-5 Tr.), 18.5 (CH_3). HRMS (MALDI-TOF): average mass calcd for $\text{C}_{466}\text{H}_{3473}\text{N}_{45}\text{O}_{66}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 7761.1533, found 7761.4028.

Peracetylated Hexadecamannoside (35).

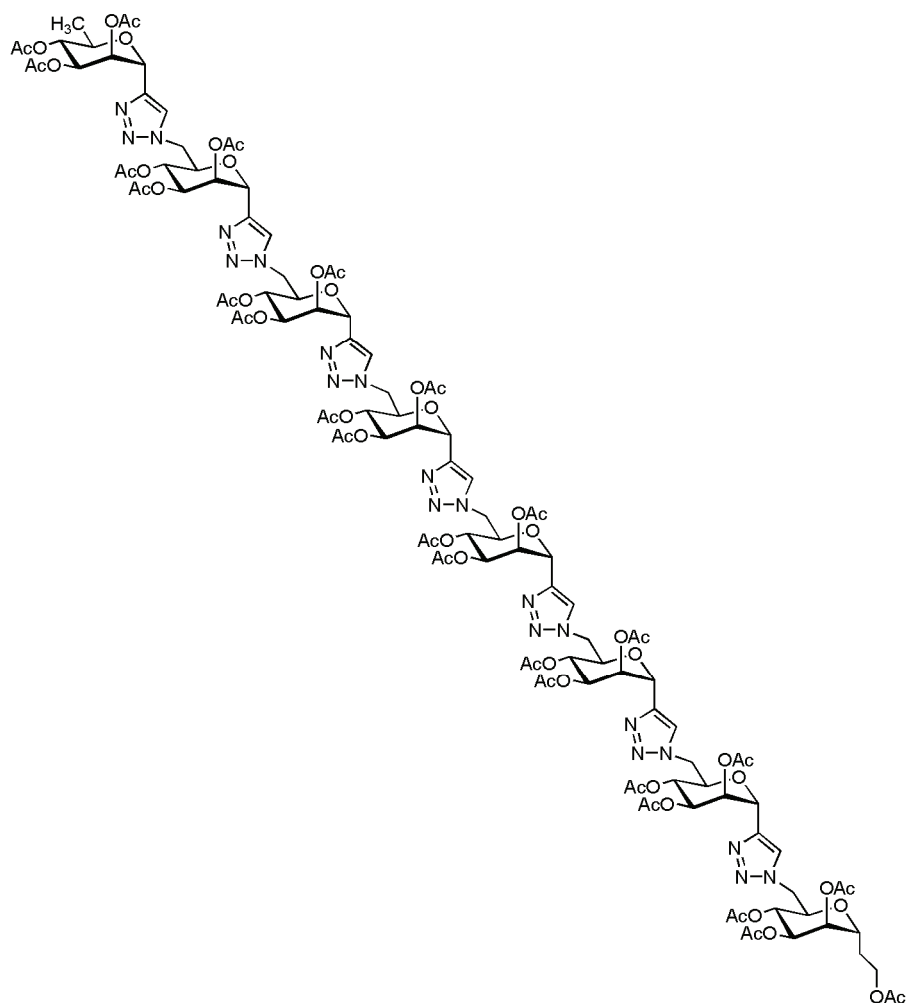
To a solution of **34** (75 mg, 9.7 μmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (5 mL) was added trifluoroacetic acid (200 μL). The solution was kept at room temperature for 3 h, then concentrated. To a stirred, cooled ($-60\text{ }^\circ\text{C}$) solution of the residue in anhydrous CH_2Cl_2 (2 mL) was added a 1 M solution of BCl_3 in CH_2Cl_2 (930 μL , 0.93 mmol). The solution was stirred at $-60\text{ }^\circ\text{C}$ for 1 h and, after an additional 1 h stirring at $0\text{ }^\circ\text{C}$, diluted with MeOH (0.5 mL), stirred at $0\text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min, diluted with Et_3N (0.5 mL), concentrated, and dried under high vacuum to give a white solid. A suspension of the residue in pyridine (2 mL) and acetic anhydride (1 mL) was stirred at room temperature for 24 h, then diluted with MeOH (1 mL) and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with AcOEt to give **35** (18 mg, 40%) as a white solid; $[\alpha]_{\text{D}} = +32.9$ (c 0.4, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz) selected data: δ 8,15-7,40 (m, 15H, 15 H-5 Tr.), 2,29-1,95 (m, 147H, 49 CH_3). ^{13}C NMR selected data: δ 170.3-170.0 (C=O), 142.0-141.7 (C-4 Tr.), 125.1-124.1 (C-5 Tr.), 50.7 (CH_3), 18.0 (CH_3).

Free hydroxyl haxadecamannoside (TOM16)

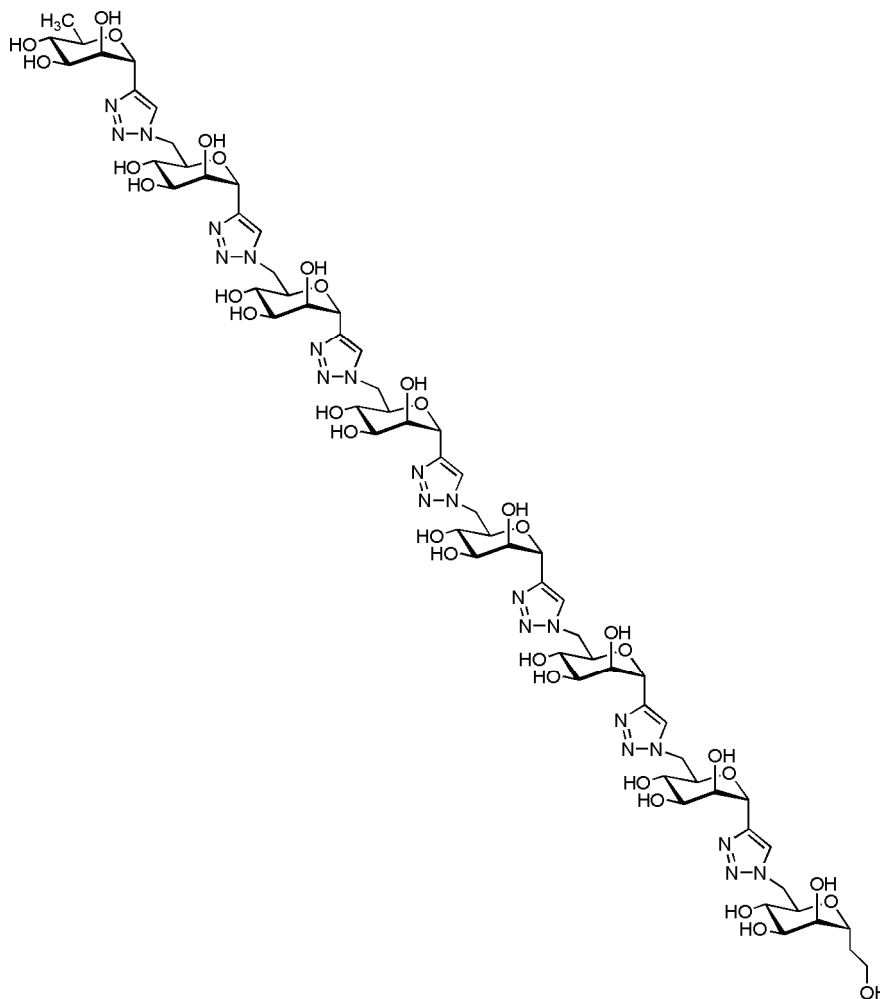
To a solution of **35** (18 mg, 3.8 μmol) in MeOH (2 mL) was added a 2 M solution of ammonia in MeOH (2 mL). The solution was kept at room temperature overnight, then concentrated to give **TOM16** (10 mg, quantitative) as an amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}} = +4.7$ (c 0.3, DMSO). ^1H NMR (300 MHz, D_2O) selected data: δ 7.80-736 (m, 16H, 16 H-5 Tr.),

Octanannoside (**40**).

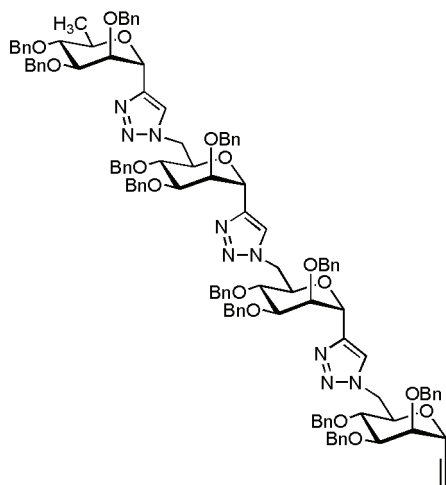
The coupling of azide **28** (21 mg, 10.6 μmol) with alkyne **14c** (20 mg, 10.6 μmol) was performed as described for the synthesis of **34** to give, after trituration with CH_3OH , **40** as a white solid (35 mg, 85%); $[\alpha]_{\text{D}} = -150.4$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.88, 6.50, 6.38, 6.36 and 6.24 (5bs, 5H, H-5 Tr.), 6.00, 5.94, 5.87 and 5.72 (4 bs, 4H, 4 anom H), 3.09 (s, 3H, CH_3), 1.39 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR selected data: δ 145.0-137.5 (C), 128.4-126.7 (CH), 124.9 (C-5 Tr.), 96.0 (C), 64.2 (CH_2), 29.7 (CH_3), 18.5 (CH_3). HRMS (MALDI-TOF): average mass calcd for $\text{C}_{234}\text{H}_{241}\text{N}_{21}\text{O}_{34}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 3892.6166, found 3892.5688.

Peracetylated octamannoside (41).

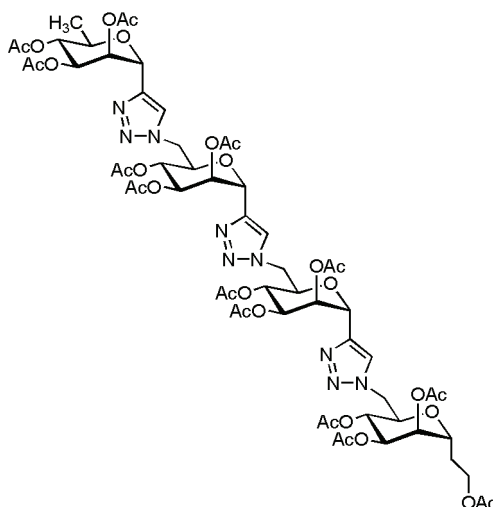
The deprotection of **40** (34 mg, 8.7 μmol) was performed as described for the synthesis of **35** to give, after column chromatography on silica gel (AcOEt), **41** as an amorphous solid (19 mg, 78%); $[\alpha]_{\text{D}} = -52,1$ (*c* 0.5, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz) selected data: δ 7,98-7,42 (m, 7H, 7 H-5 Tr.), 1,20 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, CH_3). HRMS (MALDI-TOF): average mass calcd for $\text{C}_{114}\text{H}_{143}\text{N}_{21}\text{O}_{58}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 2758.4859, found 3758.4763

Free hydroxyl Octamannoside (TOM8).

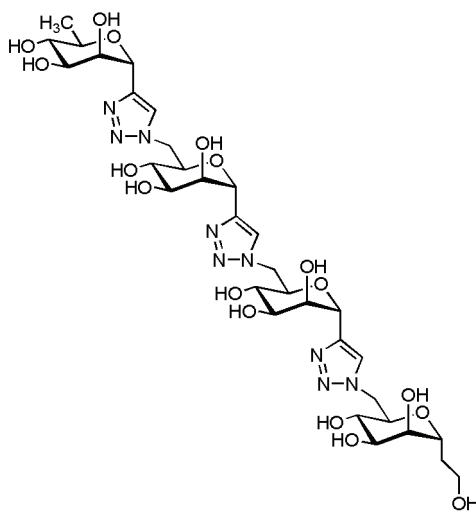
The deprotection of **41** (9 mg, 3.4 μmol) was performed as described for the synthesis of **TOM16** to give **TOM8** as an amorphous solid (6 mg, quantitative). HRMS (MALDI-TOF): average mass calcd for $\text{C}_{64}\text{H}_{93}\text{N}_{21}\text{O}_{33}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 1684.6323, found 1684.5648

Tetramannoside (38).

The coupling of azide **8** (15 mg, 0.015 mmol) with alkyne **14a** (13.8 mg, 0.015 mmol) was performed as described for the synthesis of **34**, to give, after column chromatography on silica gel (2:1 cyclohexane-AcOEt), **38** as a white solid (26 mg, 88%); $[\alpha]_D = 34.5$ (c 0.7, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.80, 7.69 and 7.43 (3s, 3H, 3 H-5 Tr.), 7.42-7.14 (m, 60H, Ar) 5.29, 5.23, and 5.21 (3d, 3H, $J_{1',2'} = 2.0$ Hz, $J_{1'',2''} = 2.0$ Hz, $J_{1''',2'''} = 2.0$ Hz, H-1', H-1'', H-1'''), 3.22 (s, 3H, CH_3). 1.34 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR selected data: δ 145.2 (C-4 Tr.), 143.9 (C-4 Tr.), 143.8 (C-4 Tr.), 138.7-137.9 (C), 128.5-127.3 (CH), 124.4 (CH), 124.6 (CH), 123.9 (CH), 96.4 (C), 50.9 (CH_2), 50.7 (CH_2), 29.7(CH_3), 18.4(CH_3).

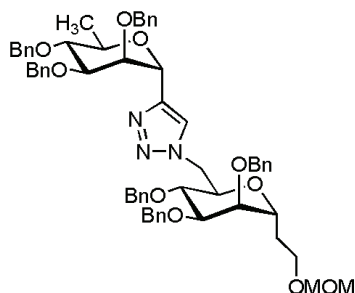
Peracetylated tetramannoside (39).

The deprotection of **38** (20 mg, 10 μ mol) was performed as described for the synthesis of **35** to give, after column chromatography on silica gel (AcOEt), **39** as an amorphous solid (10 mg, 73%); $[\alpha]_D = +3.9$ (*c* 0.7, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz) selected data: δ 8.15, 7.77 and 7.68 (3s, 3H, 3 H-5 Tr.), ¹³C NMR selected data: δ 170,0 (C=O), 29,7 (CH₃), 17,6 (CH₃). HRMS (ESI/Q-TOF): average mass calcd for C₅₈H₇₅N₉O₃₀ (M+H)⁺ 1378.4698, found 1378.4749

Free hydroxyl tetramannoside (TOM4).

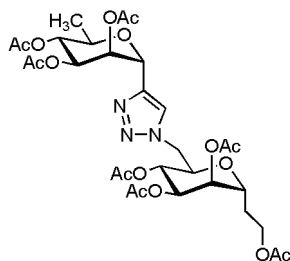
The deprotection of **39** (9 mg, 6.5 μmol) was performed as described for the synthesis of **TOM16** to give **TOM4** as an amorphous solid (5 mg, quantitative). HRMS (MALDI-TOF): average mass calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{N}_9\text{O}_{17}$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ 854.3144, found 854.3214.

8-[4-(2',3',4'-tri-*O*-benzyl-6'-deoxy- α -D-mannopyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-3,7-anhydro-4,5,6-tri-*O*-benzyl-1,2-dideoxy-1-methoxymethyl-D-glycero-D-talo-octitol (36).



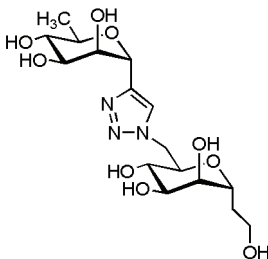
The coupling of azide **2** (12 mg, 0.023 mmol) with alkyne **10** (10 mg, 0.023 mmol) was performed as described for the synthesis of **34** to give, after column chromatography on silica gel (3:1 cyclohexane-AcOEt), **36** as a amorphous solid (21 mg, 96%); $[\alpha]_D = +21.7$ (*c* 1.1, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.65 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.43-7.22 (m, 30H, Ar), 5.18 (d, 1H, $J_{1',2'} = 2.0$ Hz, H-1'), 4.23-4.17 (m, 2H, CH₂-CH₂OH), 3.28 (s, 3H, CH₃), 1.80-1.70 (m, 2H, CH₂-CH₂OH) 1.33 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, CH₃). ¹³C NMR: δ 145.1 (C), 138.7 (C), 138.6 (C), 138.0 (C), 137.8 (C), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 128.1 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.5 (CH), 127.4 (CH), 123.8 (CH), 96.4 (C), 80.4 (CH), 80.2 (CH), 77.2 (CH), 75.8 (CH), 75.2 (CH₂), 74.9 (CH), 74.0 (CH₂), 72.6 (CH), 72.5 (CH₂), 72.4 (CH₂), 71.8 (CH₂), 71.0 (CH), 70.3 (CH), 70.1 (CH), 63.6 (CH₂), 55.2 (CH), 50.5 (CH₂), 29.8 (CH₂), 27.9 (CH₂), 18.3 (CH₃). HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z* calcd for C₆₀H₆₇N₃O₁₀ (M+Na)⁺ 1012.4724, found 1012.4786.

8-[4-(2',3',4'-tri-*O*-acetyl-6'-deoxy- α -D-mannopyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-3,7-anhydro-1,4,5,6-tetra-*O*-acetyl-2,8-dideoxy- -D-glycero-D-talo-octitol (**37**).



The deprotection of **36** (18 mg, 18 μ mol) was performed as described for the synthesis of **35** to give, after column chromatography on silica gel (AcOEt), **37** as an amorphous solid (10 mg, 81%); $[\alpha]_{\text{D}} = +118.7$ (*c* 0.6, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz) selected data: δ 7.83 (1s, 1H, H-5 Tr.), ¹³C NMR selected data: δ 170.1 (C=O), 141.8 (C-4 Tr), 124.3 (CH C-5 Tr), 50.5 (CH₂), 29.8 (CH₂), 27.9 (CH₂), 17.6 (CH₃). HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z* calcd for C₃₀H₄₁N₃O₁₆ (M+H)⁺ 700.2565, found 700.2619.

8-[4-(6'-deoxy- α -D-mannopyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-3,7-anhydro-2,8-dideoxy- -D-glycero-D-talo-octitol (TOM2).



The deprotection of **37** (8 mg, 11 μ mol) was performed as described for the synthesis of **TOM16** to give **TOM2** as an amorphous solid (4.6 mg, quantitative). ¹H NMR (300 MHz, D₂O) selected data: δ 7.96 (s, 1H, H-5 Tr.), 5.10 (bs, 1H, H-1'). HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calcd for C₁₆H₂₇N₃O₉ (M+H)⁺ 406.1826, found 406.1815.

5.3 Bibliografia

1. Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. *Purification of Laboratory Chemicals*, 5th ed., Butterworth-Heinemann, Amsterdam, 2003.
2. Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
3. *Pure & Appl. Chem.* **1991**, *63*, 975-990.
4. Granja, J. R.; Castedo, L.; Mouriño, A. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 124-131.
5. Chechev, P.; Marra, A.; Dondoni, A. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3225-3227