

# UNIVERSITÀ DI PISA

---

Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale



Corso di Laurea Magistrale in Chimica

*Curriculum Organico*

Classe LM-54

## **Sintesi di nuovi glicoconiugati inibitori del metabolismo glucidico**

### **Relatori:**

Prof.ssa Valeria Di Bussolo  
Dott.ssa Felicia D'Andrea

### **Controrelatore:**

Dott.ssa Antonella Petri

**Candidato:**  
Giulia Vagelli

# Indice

|  |    |
|--|----|
| <b>Tavola degli acronimi</b> .....   | V  |
| <b>1 - Introduzione</b> .....  | 1  |
| 1.1 – La produzione di ATP.....  | 1  |
| 1.2 – Il metabolismo glicolitico delle cellule tumorali.....   | 4  |
| 1.3 – Generalità e meccanismo di azione dell'enzima LDH .....  | 6  |
| 1.4 – Lo “ <i>shuttle del lattato</i> ”.....   | 8  |
| 1.5 – L'isoforma <i>hLDH-5</i> come nuovo <i>target</i> antiglicolitico.....   | 9  |
| 1.5.1 – Inibitori dell'enzima <i>hLDH-5</i> .....  | 10 |
| 1.5.2 – Interazioni tra l'isoforma <i>hLDH-5</i> e gli agenti citotossici <b>24</b> e <b>25</b> .....  | 18 |
| 1.6 – La glicoconiugazione .....   | 20 |
| 1.6.1 – Saccaridi portanti strutture <i>N</i> -idrossiindoliche come aglicone .....  | 20 |
| 1.7 – Scopo della tesi.....  | 23 |
| <b>2 - Risultati e discussione</b> .....   | 27 |
| 2.1 – Sintesi del derivato <i>N</i> -idrossiindolico <b>25</b> .....   | 27 |
| 2.2 – Sintesi di glicoconiugati in posizione anomeric.....   | 30 |
| 2.2.1 – Caratteristiche generali delle reazioni di glicosilazione .....  | 31 |
| 2.2.2 – Glicosilazioni: meccanismo e aspetti stereochimici .....   | 32 |
| 2.2.3 – Caratteristiche dei glicosil donatori.....   | 37 |
| 2.2.4 – Sintesi dei glicosil donatori galattosidico <b>88<math>\alpha</math></b> e lattosidico <b>89<math>\alpha</math></b> .....  | 38 |
| 2.2.5 – Sintesi dei glicoconiugati <b>58<math>\alpha</math></b> , <b>58<math>\beta</math></b> e <b>59<math>\beta</math></b> .....  | 41 |
| 2.3 – Sintesi di glicoconiugati in posizione C-6 .....   | 46 |
| 2.3.1 – Sintesi di glicoconiugati a partire da 6- <i>O</i> -tosil derivati.....  | 47 |
| 2.3.1.1 – Preparazione dei 6- <i>O</i> -tosil derivati <b>103</b> , <b>105</b> e <b>107</b> .....  | 48 |
| 2.3.1.2 – Reazione S <sub>N</sub> 2 tra i 6- <i>O</i> -tosil derivati e il nucleofilo NHI <b>25</b> .....  | 51 |
| 2.3.2 – Sintesi dei glicoconiugati <b>110</b> , <b>111</b> , <b>112</b> e <b>113</b> mediante reazione di Mitsunobu .....  | 54 |
| 2.3.2.1 – Reazione di Mitsunobu: generalità e meccanismo .....   | 55 |
| 2.3.2.2 – Sintesi di mono- e disaccaridi selettivamente deprotetti sulla posizione primaria (C-6).....   | 57 |
| 2.3.2.3 – Reazione di Mitsunobu .....  | 62 |
| 2.3.3 – Sintesi di un glicoconiugato della serie D-talo .....  | 64 |
| 2.3.3.1 – Sintesi del derivato disaccaridico <b>146</b> .....  | 65 |
| 2.3.3.2 – Tentativo di sintesi del glicoconiugato <b>145</b> , precursore di <b>144</b> .....  | 72 |
| 2.4 – Preparazione dei <i>target</i> finali <b>33<math>\alpha</math></b> , <b>33<math>\beta</math></b> , <b>34<math>\beta</math></b> , <b>37</b> , <b>38</b> , <b>39</b> , <b>40</b> , <b>41<math>\beta</math></b> e <b>42<math>\beta</math></b> ..... | 73 |
| 2.5 – Saggi enzimatici .....   | 78 |
| 2.6 – Conclusioni.....   | 82 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>3 - Parte sperimentale</b> .....  | 84  |
| 3.1 – Metodiche generali: reattivi, solventi e strumentazione .....  | 84  |
| 3.2 – Preparazione del derivato <i>N</i> -idrossiindolico (NHI, <b>25</b> ) .....  | 86  |
| 3.2.1 – Preparazione del 5-iodo-2-metil-1-nitro-3-(trifluorometil)benzene ( <b>44</b> )  | 86  |
| 3.2.2 – Preparazione del 4-metil-3-nitro-5-(trifluorometil)bifenile ( <b>45</b> ).....   | 86  |
| 3.2.3 – Preparazione del 3-nitro-5-(trifluorometil)bifenile-4-il)-2-oxo-3-<br>propanoato di metile ( <b>46</b> ).....  | 87  |
| 3.2.4 – Preparazione dell'1-idrossi-6-fenil-4-(trifluorometil)-1H-indolo-2-<br>carbossilato di metile ( <b>25</b> ).....   | 88  |
| 3.3 – Preparazione di glicoconjugati anomerici.....  | 89  |
| 3.3.1 – Preparazione del 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha,\beta$ -D-galattopiranosio ( <b>92</b> ).....  | 89  |
| 3.3.2 – Preparazione del 4- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-galattopiranosil)-2,3,6-<br>tri- <i>O</i> -acetil- $\alpha,\beta$ -D-glucopiranosio ( <b>95</b> ) .....   | 90  |
| 3.3.3 – Preparazione del 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-galattopiranosil-tricloro-<br>acetimidato ( <b>88a</b> ) .....   | 91  |
| 3.3.4 – Preparazione del 4- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-galattopiranosil)-2,3,6-<br>tri- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosil tricloroacetimidato ( <b>89a</b> ).....   | 92  |
| 3.3.5 – Procedure generali per la reazione di glicosilazione .....   | 93  |
| 3.3.5.1 – Preparazione dell'1-idrossi-6-fenil-4-(trifluorometil)-1H-indolo-2-<br>metilcarbossilato-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-galattopiranoside ( <b>58b</b> ) e<br>dell'1-idrossi-6-fenil-4-(trifluorometil)-1H-indolo-2-metilcarbos-<br>silato-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-galattopiranoside ( <b>58a</b> )..... | 94  |
| 3.3.5.2 – Preparazione dell'1-idrossi-6-fenil-4-(trifluorometil)-1H-indolo-2-<br>metilcarbossilato-4- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-galattopiranosil)-<br>2,3,6-tri- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranoside ( <b>59b</b> ).....   | 96  |
| 3.4 – Preparazione dei 6- <i>O</i> -tosil derivati saccaridici <b>103</b> , <b>105</b> e <b>107</b> .....  | 97  |
| 3.4.1 – Preparazione del 4- <i>O</i> -(3',4'- <i>O</i> -isopropilidene- $\beta$ -D-galattopiranosil)-<br>2,3:5,6-di- <i>O</i> -isopropilidene- <i>aldeido</i> -D-glucosio dimetile acetale ( <b>106</b> )  | 97  |
| 3.4.2 – Procedura generale di tosilazione al C-6 di derivati saccaridici .....   | 98  |
| 3.4.2.1 – Preparazione del metil 6- <i>O</i> - <i>p</i> -toluensolfonile- $\beta$ -D-glucopiranoside<br>( <b>103</b> ) .....   | 99  |
| 3.4.2.2 – Preparazione del metil 6- <i>O</i> - <i>p</i> -toluensolfonile- $\beta$ -D-galattopiranoside<br>( <b>105</b> ) .....   | 100 |
| 3.4.2.3 – Preparazione del 4- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> - <i>p</i> -toluensolfonile-3',4'- <i>O</i> -isopropilidene-<br>$\beta$ -D-galattopiranosil)-2,3:5,6-di- <i>O</i> -isopropilidene- <i>aldeido</i> -D-glucosio<br>dimetile acetale ( <b>107</b> ) .....   | 100 |
| 3.5 – Preparazione di mono- e disaccaridi selettivamente deprotetti al C-6<br><b>128-131</b> .....   | 101 |
| 3.5.1 – Preparazione del metil 2,3,4-tri- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-mannopiranoside ( <b>128</b> ). 101  |     |
| 3.5.2 – Preparazione del metil 2,3,4-tri- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glucopiranoside ( <b>129</b> )... 103   |     |

|  |     |
|--|-----|
| 3.5.3 – Preparazione del metil 2,3,4-tri- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-galattopiranoside ( <b>130</b> ). 105   | 105 |
| 3.5.4 – Preparazione del 4- <i>O</i> -[2'- <i>O</i> -acetil-3',4'- <i>O</i> -isopropilidene- $\beta$ -D-galattopiranosil]-2,3:5,6-di- <i>O</i> -isopropilidene- <i>aldeido</i> -D-glucosio dimetile acetale ( <b>131</b> ) ..... 107   | 107 |
| 3.6 – Preparazione del disaccaride $\beta$ -D-talosaminico selettivamente deprotetto al C-6' ( <b>146</b> ) ..... 110  | 110 |
| 3.6.1 – Preparazione del 4- <i>O</i> -[3',4'- <i>O</i> -isopropilidene-6'- <i>O</i> -(1-metossi-1-metiletil)- $\beta$ -D-galattopiranosil]-2,3:5,6-di- <i>O</i> -isopropilidene- <i>aldeido</i> -D-glucosio dimetile acetale ( <b>108</b> ) ..... 110                                  | 110 |
| 3.6.2 – Preparazione del 4- <i>O</i> -[3',4'- <i>O</i> -isopropilidene-6'- <i>O</i> -(1-metossi-1-metiletil)- $\beta$ -D- <i>lixo</i> -esopiranosil-2'-ulosio]-2,3:5,6-di- <i>O</i> -isopropilidene- <i>aldeido</i> -D-glucosio dimetile acetale ( <b>147</b> ) ..... 112              | 112 |
| 3.6.3 – Preparazione del 4- <i>O</i> -[2'-desossi-3',4'- <i>O</i> -isopropilidene-2'-idrossimmino- $\beta$ -D- <i>lixo</i> -esopiranosil]-2,3:5,6-di- <i>O</i> -isopropilidene- <i>aldeido</i> -D-glucosio dimetile acetale [( <i>E</i> )- <b>149</b> ] ..... 113                      | 113 |
| 3.6.4 – Preparazione del 4- <i>O</i> -[2'-benzilossima-6'- <i>O</i> -benzil 2'-desossi-3',4'- <i>O</i> -isopropilidene- $\beta$ -D- <i>lixo</i> -esopiranosil]-2,3:5,6-di- <i>O</i> -isopropilidene- <i>aldeido</i> -D-glucosio dimetile acetale [( <i>E</i> )- <b>150</b> ] ..... 114 | 114 |
| 3.6.5 – Preparazione 4- <i>O</i> -[2'-acetammido-6'- <i>O</i> -benzil-2'-desossi-3',4'- <i>O</i> -isopropilidene- $\beta$ -D-talopiranosil]-2,3:5,6-di- <i>O</i> -isopropilidene- <i>aldeido</i> -D-glucosio dimetile acetale ( <b>151</b> ) ..... 116                                 | 116 |
| 3.6.6 – Preparazione del 4- <i>O</i> -[2'-acetammido-2'-desossi-3',4'- <i>O</i> -isopropilidene- $\beta$ -D-talopiranosil]-2,3:5,6-di- <i>O</i> -isopropilidene- <i>aldeido</i> -D-glucosio dimetile acetale ( <b>146</b> ) ..... 117  | 117 |
| 3.7 – Preparazione dei glicoconiugati mono- e disaccaridici protetti <b>110-113</b> ... 118  | 118 |
| 3.7.1 – Procedura generale per la reazione di <i>Mitsunobu</i> ..... 118   | 118 |
| 3.7.2 – Preparazione del mannoconiugato protetto <b>110</b> ..... 118  | 118 |
| 3.7.3 – Preparazione del glucoconiugato protetto <b>111</b> ..... 119  | 119 |
| 3.7.4 – Preparazione del galattoconiugato protetto <b>112</b> ..... 120  | 120 |
| 3.7.5 – Preparazione del glicoconiugato disaccaridico protetto <b>113</b> ..... 121  | 121 |
| 3.8 – Tentativo di preparazione del glicoconiugato disaccaridico $\beta$ -D-talosaminico protetto <b>145</b> ..... 122   | 122 |
| 3.9 – Preparazione dei glicoconiugati ammidici deprotetti <b>41<math>\beta</math></b> e <b>42<math>\beta</math></b> ..... 123  | 123 |
| 3.9.1 – Preparazione del glicoconiugato ammidico monosaccaridico <b>41<math>\beta</math></b> ..... 123   | 123 |
| 3.9.2 – Preparazione del glicoconiugato ammidico disaccaridico <b>42<math>\beta</math></b> ..... 124   | 124 |
| 3.10 – Preparazione dei glicoconiugati deprotetti <b>33<math>\alpha</math></b> , <b>33<math>\beta</math></b> , <b>34<math>\beta</math></b> , <b>37-40</b> ..... 124  | 124 |
| 3.10.1 – Procedura generale di desacetilazione ..... 124   | 124 |
| 3.10.2 – Preparazione del galattoconiugato anomero <b>33<math>\alpha</math></b> ..... 125  | 125 |
| 3.10.3 – Preparazione del galattoconiugato anomero <b>33<math>\beta</math></b> ..... 126   | 126 |
| 3.10.4 – Preparazione del glicoconiugato anomero disaccaridico <b>34<math>\beta</math></b> ..... 126   | 126 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.10.5 – Preparazione del mannoconiugato deprotetto <b>37</b> .....               | 127 |
| 3.10.6 – Preparazione del glucoconiugato deprotetto <b>38</b> .....               | 128 |
| 3.10.7 – Preparazione del galattoconiugato deprotetto <b>39</b> .....             | 130 |
| 3.10.8 – Preparazione del glicoconiugato disaccaridico protetto <b>109</b> .....  | 131 |
| 3.10.9 – Preparazione del glicoconiugato disaccaridico deprotetto <b>40</b> ..... | 134 |
| <b><i>Bibliografia</i></b> .....  | 136 |

## Tavola degli acronimi

|                   |  |
|-------------------|--|
| $[\alpha]_D^{25}$ | Potere ottico rotatorio misurato a $\lambda=589$ nm e 25°C |
| Ac                | Acetile  |
| Ala               | Alanina  |
| Asn               | Asparagina   |
| Asp               | Acido aspartico  |
| Arg               | Arginina   |
| ATP               | <i>Adenosine triphosphate</i>                              |
| Bn                | Benzile  |
| Bu                | Butile   |
| CoA               | Coenzima A   |
| COSY              | <i>Correlations spectroscopy</i>                           |
| DBU               | 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene                       |
| DEAD              | Dietil azodicarbossilato                                   |
| DEPT              | <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i> |
| DIAD              | Diisopropil azodicarbossilato                              |
| DME               | 1,2-dimetossietano   |
| DMEAD             | Di-2-metossietil azodicarbossilato                         |
| DMF               | <i>N,N</i> -dimetilformammide                              |
| DMP               | 2,2-dimetossipropano                                       |
| DMSO              | Dimetilsolfossido  |
| DMTST             | Dimetil-(metiltio)-solfoniotriflato                        |
| DNA               | <i>Deoxyribonucleic acid</i>                               |
| Et                | Etile  |
| GA                | <i>Glycolic acid</i>                                       |
| Gly               | Glicina  |
| Gln               | Glutammina   |
| GLUT              | <i>Glucose transporter</i>                                 |
| HETCOR            | <i>Heteronuclear correlation</i>                           |
| HIF-1             | <i>Hipoxia inducible factor-1</i>                          |
| His               | Istidina   |
| Hldh              | <i>Human LDH</i>   |
| HSQC              | <i>Heteronuclear single quantum coherence</i>              |
| IC <sub>50</sub>  | <i>Half maximal inhibitory concentration</i>               |
| IDCP              | Iodonio dicollidina perclorato                             |
| Ile               | Isoleucina   |
| K <sub>i</sub>    | <i>Constant of inhibition</i>                              |
| LDH               | <i>Lactate dehydrogenase</i>                               |

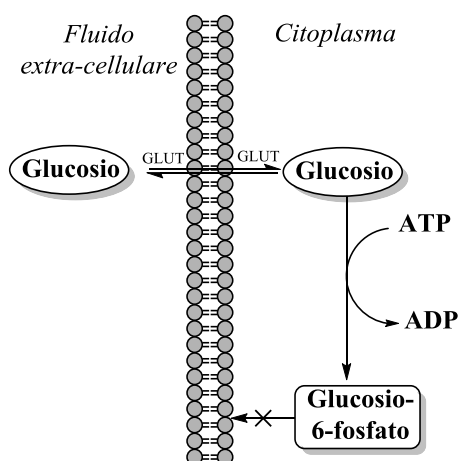
---

|                  |   |
|------------------|---|
| MCT              | <i>Monocarboxylate transporter</i>                        |
| Me               | Metile  |
| ME               | <i>Malic enzyme</i>                                       |
| MIP              | 2-Metossiisopropile                                       |
| <i>N</i>         | <i>Normal</i>   |
| NAD <sup>+</sup> | <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> (forma ossidata) |
| NADH             | <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> (forma ridotta)  |
| NBS              | <i>N</i> -bromosuccinimide                                |
| NHI              | <i>N</i> -idrossiindolo                                   |
| NIS              | <i>N</i> -iodosuccinimide                                 |
| NMO              | 4-metilmorfolina <i>N</i> -ossido                         |
| NMR              | <i>Nuclear magnetic resonance</i>                         |
| p.f.             | Punto di fusione  |
| Pd/C             | Palladio supportato su carbone                            |
| <i>Pf</i> LDH    | <i>Plasmodium falciparum</i> LDH                          |
| Ph               | Fenile  |
| Piv              | Pivaloile   |
| R <sub>f</sub>   | Fattore di ritenzione                                     |
| S <sub>N</sub>   | Sostituzione nucleofila                                   |
| <i>t</i>         | <i>tert</i>   |
| t.a.             | Temperatura ambiente                                      |
| TBA              | Tetrabuttilammonio  |
| TBDMS            | <i>tert</i> -Butildimetilsilile                           |
| TCA              | Tricloroacetimidato                                       |
| THF              | Tetraidrofurano   |
| Thr              | Treonina  |
| TLC              | <i>Thin-layer chromatography</i>                          |
| TMS              | Trimetilsilile  |
| Ts               | <i>p</i> -Toluensolfonile (Tosile)                        |
| Tf               | Triflile  |
| TPAP             | Tetrapropilammonio perrutenato                            |
| Trt              | Tritile   |
| Tyr              | Tirosina  |
| Val              | Valina  |
| VEGF             | <i>Vascular endothelial growth factor</i>                 |

# 1 - Introduzione

## 1.1 – La produzione di ATP

I carboidrati sono trasformati, una volta ingeriti con la dieta, in molecole biologicamente utili come il D-glucosio (**1**) che rappresenta il principale saccaride presente nei sistemi viventi. La glicolisi è una via metabolica, presente in tutti gli organismi viventi, che converte il D-glucosio (**1**) in due molecole di piruvato generando energia metabolica sotto forma di ATP, utile per sostenere tutte le funzioni fisiologiche. Negli organismi aerobi, la glicolisi prelude al ciclo di Krebs e alla catena di trasporto degli elettroni (fosforilazione ossidativa) con cui si ottiene l'ossidazione completa del D-glucosio (**1**) a H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub>. Questo monosaccaride entra nelle cellule mediante un gradiente di concentrazione grazie a specifici trasportatori proteici di membrana (GLUT) e, all'interno delle cellule, subisce fosforilazione sull'ossidrile primario ad opera dell'ATP, trasformandosi in glucosio-6-fosfato (*Figura 1.1.*), primo intermedio della glicolisi. È da sottolineare che il glucosio-6-fosfato non rappresentando il substrato dei trasportatori di glucosio non può attraversare la membrana plasmatica e tornare nel fluido *extra-cellulare*.

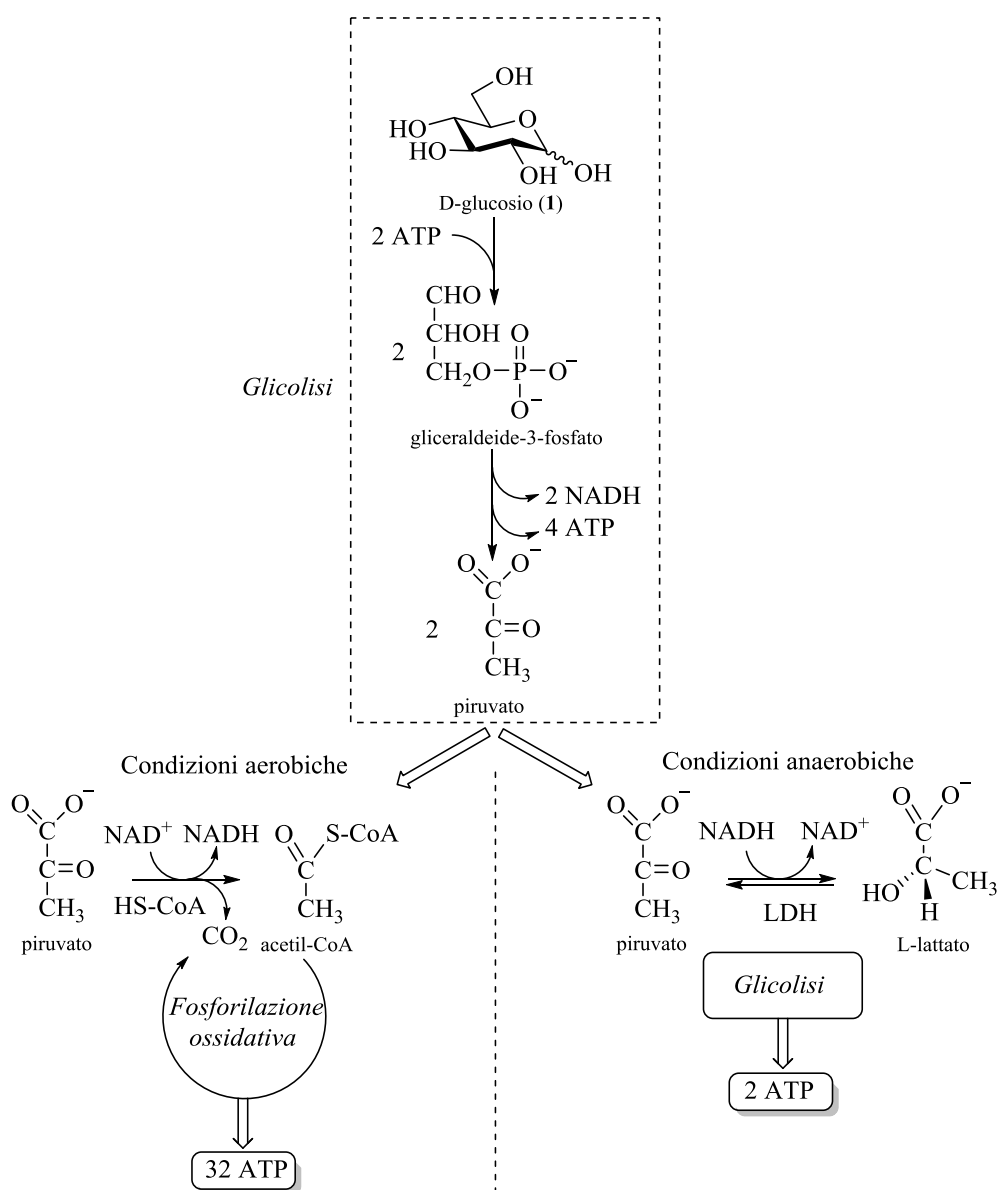


**Figura 1.1** – Trasporto del D-glucosio nel citoplasma cellulare.



La glicolisi avviene nel citoplasma cellulare ed inizia con una scissione ossidativa del D-glucosio (1) in due molecole di piruvato con produzione di energia sotto forma di ATP e NADH (Figura 1.2).<sup>1</sup>

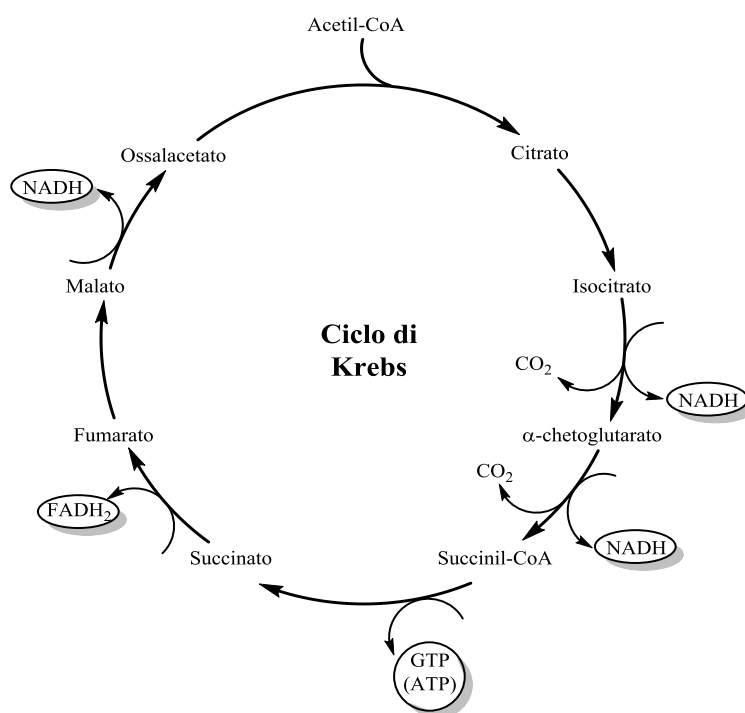
In particolare la glicolisi consiste in dieci reazioni consecutive ognuna delle quali è catalizzata da un enzima diverso. Essa prevede una fase detta di investimento energetico (cinque reazioni) dove il D-glucosio, utilizzando due molecole di ATP, viene fosforilato a glucosio-6-fosfato e scisso in due molecole di gliceraldeide-3-fosfato.



**Figura 1.2** - Produzione di ATP tramite glicolisi e fosforilazione ossidativa.<sup>2</sup>

Nella seconda fase detta di recupero energetico (cinque reazioni), le due molecole di gliceraldeide-3-fosfato vengono trasformate in due molecole di piruvato con conseguente produzione di quattro molecole di ATP e due di NADH (*Figura 1.2*). Poiché nella prima fase si consumano due molecole di ATP, la glicolisi ha una resa netta di due molecole di ATP per molecola di glucosio. Le due molecole di piruvato, prodotto finale della glicolisi, contengono ancora la maggior parte dell'energia e possono avere un destino diverso che è dipendente dalla presenza (aerobiosi) o meno (anaerobiosi) di ossigeno.

In condizioni di aerobiosi le molecole di piruvato sono trasportate dal citosol alla matrice mitocondriale dove sono decarbossilate, ossidate ad opera dell'enzima piruvato decarbossilasi e convertite in Acetil-CoA, un metabolita chiave prodotto dal catabolismo ossidativo dei carboidrati, dei lipidi e di vari amminoacidi, che innesca la completa ossidazione mitocondriale nel ciclo di Krebs o ciclo dell'acido citrico (*Figura 1.3*).



**Figura 1.3** – Ciclo di Krebs.<sup>1</sup>

Questa via metabolica è circolare ed è costituita da otto reazioni dove, alla fine di ogni ciclo, viene rigenerato il composto di partenza, l'ossalacetato. Con questo processo le molecole di piruvato sono degradate ad anidride carbonica ed acqua (fosforilazione ossidativa), grazie alle condizioni aerobiche che permettono, attraverso la catena di trasporto degli elettroni, il trasferimento di NADH nel mitocondrio che, insieme all'ossigeno, partecipa al processo ossido-riduttivo. La fosforilazione ossidativa permette di ottenere trentadue molecole di ATP per ogni molecola di D-glucosio (1).<sup>1,2</sup>

In alcuni microorganismi anaerobi oppure in cellule di organismi superiori dove la quantità di ossigeno disponibile è limitata o assente (anaerobiosi) e dove il NADH non può essere riossidato nella catena respiratoria alla stessa velocità alla quale è prodotto nella glicolisi, le due molecole di piruvato possono essere degradate a etanolo (fermentazione alcolica) o ad acido lattico (fermentazione lattica). Le fermentazioni rappresentano processi metabolici che generano ATP mediante l'uso di composti organici che agiscono da donatori e da accettori di elettroni. In particolare nella fermentazione lattica le due molecole di piruvato, derivanti dalla glicolisi, sono ridotte ad acido lattico dal NADH, che si ossida a  $\text{NAD}^+$ , in una reazione catalizzata dall'enzima lattato deidrogenasi (LDH). La rigenerazione del  $\text{NAD}^+$  che si verifica nella riduzione del piruvato a lattato sostiene la continuità del processo glicolitico in condizioni anaerobiche. Infatti il NADH formato nell'ossidazione della gliceraldeide-3-fosfato viene consumato nella riduzione del piruvato e il processo globale permette di ottenere un guadagno netto in termini energetici di due molecole di ATP per molecola di D-glucosio (1).<sup>1</sup>

## **1.2 – Il metabolismo glicolitico delle cellule tumorali**

Lo scienziato tedesco Otto Warburg fu il primo a descrivere come la maggior parte delle cellule tumorali si basassero quasi esclusivamente sulla glicolisi per soddisfare il loro fabbisogno energetico, osservando un'anormale produzione di lattato anche in presenza di normali livelli di ossigeno. Infatti mentre le cellule sane sfruttavano la fosforilazione ossidativa per produrre energia, le cellule tumorali preferivano la

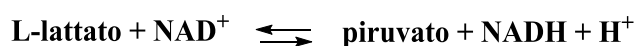
fermentazione lattica, anche in condizioni di normossia. Oggi questo effetto è noto come *effetto Warburg*.<sup>3</sup>

Inizialmente si pensava che questo fenomeno fosse dovuto ad una disfunzione respiratoria mitocondriale. Recenti studi hanno invece dimostrato che questo metabolismo è adottato per soddisfare la crescente richiesta di energia e di anaboliti da parte della cellula tumorale. Infatti nonostante la via glicolitica sia molto meno efficiente della fosforilazione ossidativa, la più rapida produzione di ATP rappresenta un notevole vantaggio per la proliferazione del tumore. In generale la proliferazione delle masse tumorali solide avviene in maniera rapida e incontrollata portando a possibili compressioni e ostruzioni dei vasi sanguigni da cui traggono il nutrimento e ciò porta ad una condizione di ipossia dovuta ad una diminuzione del flusso sanguigno e quindi dell'apporto di ossigeno. In queste condizioni le cellule neoplastiche per compensare la diminuzione dell'attività della fosforilazione ossidativa e l'accumulo dei cofattori ridotti sono costrette, per continuare a sfruttare la glicolisi come fonte di energia, ad aumentare la fermentazione lattica che diventa sia la fonte primaria di energia (ATP) che il modo per ripristinare i cofattori ossidati. Ne consegue un incremento nell'*uptake* di glucosio, un incremento della produzione di acido lattico che acidificando l'ambiente *extra*-cellulare aumenta il carattere invasivo della massa neoplastica ed un aumento del potenziale di membrana mitocondriale. In questo contesto diventa cruciale l'attivazione del fattore di trascrizione sensibile all'ipossia HIF-1 (*Hipoxia Inducible Factor-1*), una proteina legante il DNA che rende più efficiente la glicolisi anaerobica. Il Fattore HIF-1 promuove la sintesi di numerose proteine che favoriscono la crescita del tumore come: la sovraespressione del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), responsabile dell'incremento della vascolarizzazione, l'*“up-regulation”* dei trasportatori di membrana del glucosio GLUT-1, GLUT-2 (*Glucose Transporter*), l'aumento dei trasportatori di membrana MCT-1 e MCT-2 responsabili dell'acidificazione dell'ambiente extracellulare e la sovraespressione dell'enzima LDH (*L-Lactate Dehydrogenase*).<sup>2,4,5,6</sup> Mentre i trasportatori del glucosio, GLUT-1 e GLUT-2, incrementano la captazione dello zucchero all'interno della cellula, l'enzima LDH catalizza la fermentazione lattica, processo necessario per garantire la continuità della via glicolitica in condizioni

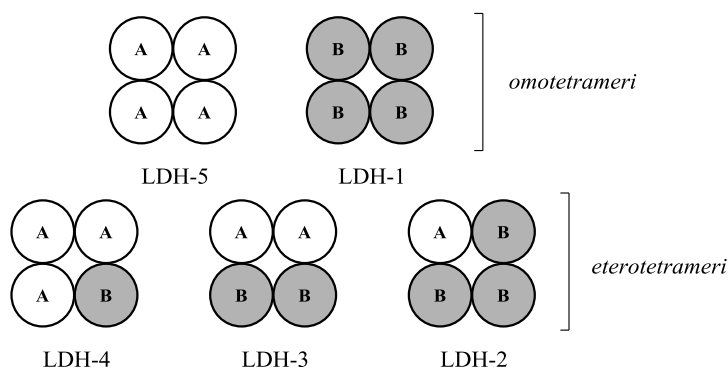
anaerobiche: viene infatti rigenerato  $\text{NAD}^+$  dal  $\text{NADH}$  per mezzo della riduzione del piruvato a lattato (*Figura 1.1*).<sup>2,5,7</sup> L'enzima LDH ricopre dunque un ruolo chiave nelle patologie tumorali più invasive dove la condizione di ipossia determina un cambiamento metabolico della cellula che predilige la via glicolitica sfruttando la fermentazione lattica. Tale enzima può essere dunque un interessante *target* per il trattamento di alcuni tipi di neoplasie poiché la sua inibizione porterebbe al mancato rifornimento di energia necessario per la sopravvivenza della cellula tumorale.<sup>5</sup>

### 1.3 – Generalità e meccanismo di azione dell'enzima LDH

L'enzima LDH (*L-Lactate Dehydrogenase*) appartiene alla classe delle ossidoreduttasi e, come già detto, catalizza la seguente reazione:



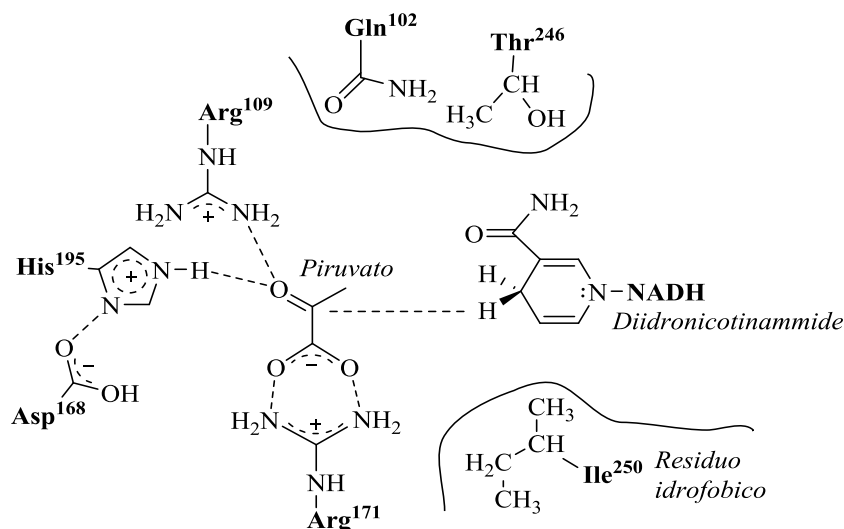
Tale enzima è una proteina tetramericata costituita da due diverse subunità: il monomero M (presente principalmente nei muscoli scheletrici e nel fegato, tessuti con metabolismo anaerobico) e il monomero H (presente maggiormente nei tessuti con metabolismo aerobico, come il muscolo cardiaco). Dalla diversa composizione monomerica, si hanno cinque possibili isoforme (*Figura 1.4*): LDH-1 ( $\text{H}_4$ ) e LDH-5 ( $\text{M}_4$ ), anche chiamate LDH-H e LDH-M, omotetrameri, mentre LDH-2 ( $\text{M}_1\text{H}_3$ ), LDH-3 ( $\text{M}_2\text{H}_2$ ) e LDH-4 ( $\text{M}_3\text{H}_1$ ), eterotetrameri. Le subunità M e H sono codificate rispettivamente da due specifici geni, LDH-A e LDH-B; per questo motivo le cinque isoforme sono anche chiamate: LDH-B ( $\text{H}_4$ ), LDH-A<sub>1</sub>B<sub>3</sub> ( $\text{M}_1\text{H}_3$ ), LDH-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> ( $\text{M}_2\text{H}_2$ ), LDH-A<sub>3</sub>B<sub>1</sub> ( $\text{M}_3\text{H}_1$ ) e LDH-A ( $\text{M}_4$ ).<sup>4,5,8</sup>



**Figura 1.4** - Le cinque possibili isoforme dell'enzima LDH.<sup>8</sup>

Il sito attivo della L-lattato deidrogenasi (LDH) è il medesimo in tutte le sue isoforme enzimatiche ed è costituito fondamentalmente da quattro residui amminoacidici<sup>8,9</sup>: Arg<sup>109</sup>, Asp<sup>168</sup>, Arg<sup>171</sup> e His<sup>195</sup>.

Il meccanismo di azione (*Figura 1.5*) prevede l'iniziale interazione del NADH con l'enzima che a sua volta interagisce con il piruvato. In seguito alla formazione di tale complesso ternario LDH-piruvato-NADH, il residuo amminoacidico Arg<sup>109</sup> polarizza il carbonile del substrato in modo tale da facilitare il trasferimento dello ione idruro e il residuo amminoacidico His<sup>195</sup> funziona da donatore/accettore di protoni durante l'ossidoriduzione. L'anello imidazolico del residuo His<sup>195</sup> interagisce, infatti, sia con il piruvato che con lo stesso Asp<sup>168</sup> attraverso un legame a idrogeno che ne stabilizza la forma protonata.<sup>8,9</sup>



**Figura 1.5** - Residui amminoacidici coinvolti nel meccanismo d'azione dell'enzima LDH.<sup>8,9</sup>

Il meccanismo d'azione prevede dunque il trasferimento diretto e altamente stereospecifico di uno ione idruro proveniente dal carbonio C-4 dell'anello diidronicotinamidico al carbonio carbonilico del piruvato associato alla donazione di un protone all'ossigeno chetonico del substrato ad opera della coppia catalitica Asp<sup>168</sup>/His<sup>195</sup>. Altri residui amminoacidici coinvolti sono: Gln<sup>102</sup> e Thr<sup>246</sup> che giocano un ruolo chiave nel riconoscimento del substrato, Ile<sup>250</sup> che presenta tasca idrofobica in grado di interagire con l'anello nicotinamidico e Arg<sup>171</sup> che stabilizza il carbossilato del substrato mediante una duplice interazione.<sup>8,9</sup>

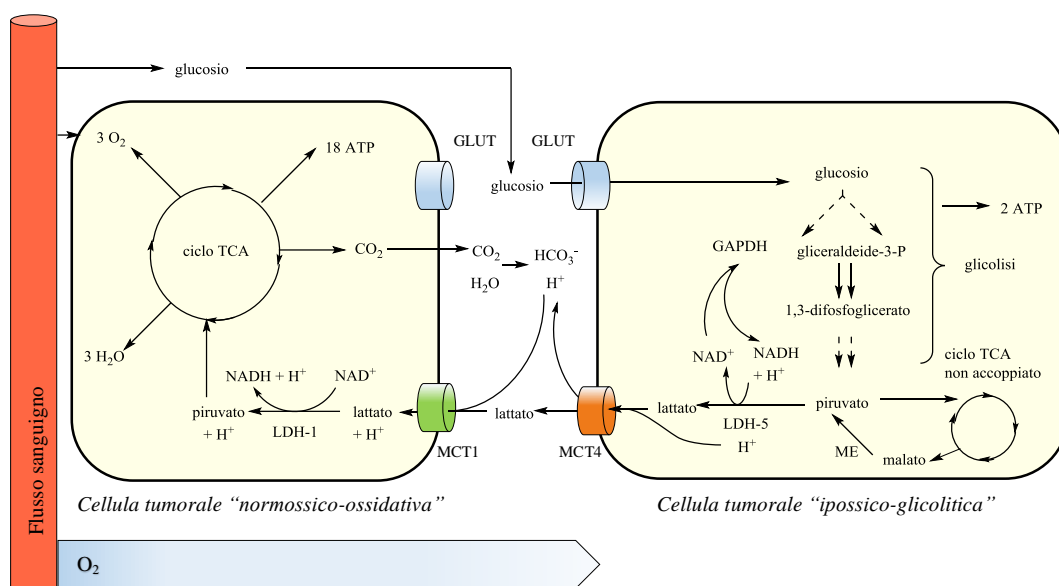
## 1.4 – Lo “*shuttle del lattato*”

Come già detto, la glicolisi nelle cellule tumorali produce L-lattato in largo eccesso che non rappresenta solamente un prodotto di scarto ma contribuisce a promuovere l’invasività, la proliferazione e la sopravvivenza del tumore.

In generale le cellule tumorali, che hanno un contenuto di ossigeno e di lattato variabile, possono essere classificate in due categorie: “normossico/ossidative”, in prossimità dei vasi sanguigni e “ipossico/glicolitiche”, più lontane dai distretti vascolari. Questi due tipi di cellule stabiliscono un sistema simbiotico, che si definisce “*shuttle del lattato*” (Figura 1.6) in cui il lattato prodotto dalle cellule “ipossico/glicolitiche” viene impiegato dalle cellule “normossico/ossidative” per produrre energia. Infatti, grazie alla sovraespressione dei trasportatori GLUT, le cellule “ipossico/glicolitiche” assorbono consistenti quantità di glucosio; il piruvato, prodotto dalla glicolisi o generato dal malato mediante reazione catalizzata dall’enzima malato deidrogenasi (ME), è convertito in lattato grazie all’isoforma 5 dell’enzima LDH e successivamente estruso nell’ambiente extracellulare dal trasportatore per gli acidi monocarbossilici MCT4.

Il trasporto del lattato e dei protoni verso l’ambiente extracellulare evita l’acidificazione e la morte della cellula “ipossico/glicolitica” che si caratterizza per un pH intracellulare neutro o lievemente alcalino che stimola la glicolisi. Una volta all’esterno della cellula, il lattato viene captato dal trasportatore MCT1 della cellula “normossico/ossidativa” e successivamente ossidato a piruvato tramite l’isoforma 1 dell’enzima LDH. In tal modo, con la conversione in Acetil-CoA, entra nel mitocondrio ed è sottoposto al ciclo dell’acido citrico, producendo diciotto molecole di ATP. La preferenza di lattato da parte delle cellule “normossico/ossidative” permette inoltre di risparmiare molecole di glucosio, impiegato dalle cellule “ipossico/glicolitiche” nella via glicolitica.<sup>10,11,12</sup>

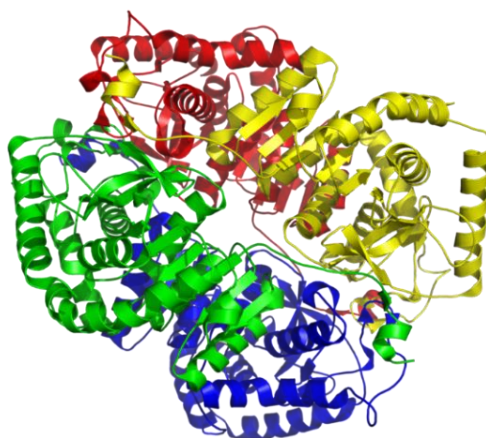
Lo “*shuttle del lattato*” evidenzia dunque l’importanza e il ruolo chiave del lattato nello sviluppo del tumore. Bloccando la produzione di tale molecola è possibile indurre il consumo di glucosio, anziché di piruvato, nelle cellule “normossico/ossidative”. In questo modo si priva le cellule “ipossico/glicolitiche” del giusto apporto di glucosio.<sup>12</sup>



**Figura 1.6** - Modello "shuttle del lattato" presente nelle cellule tumorali.<sup>11</sup>

## 1.5 – L'isoforma *hLDH-5* come nuovo *target* antitumorale

Per i motivi suddetti, l'attenzione è stata rivolta all'enzima umano LDH-5 (*hLDH-5*) come *target* promettente per poter inibire il particolare metabolismo glucidico presente nei tumori. Tra tutte le isoforme, l'enzima *hLDH-5* (Figura 1.7) possiede la maggior velocità di conversione del piruvato in lattato in condizioni di ipossia, grazie alla presenza di quattro subunità di tipo M, le quali vengono sovraesprese nelle cellule tumorali ipossiche.<sup>5</sup>



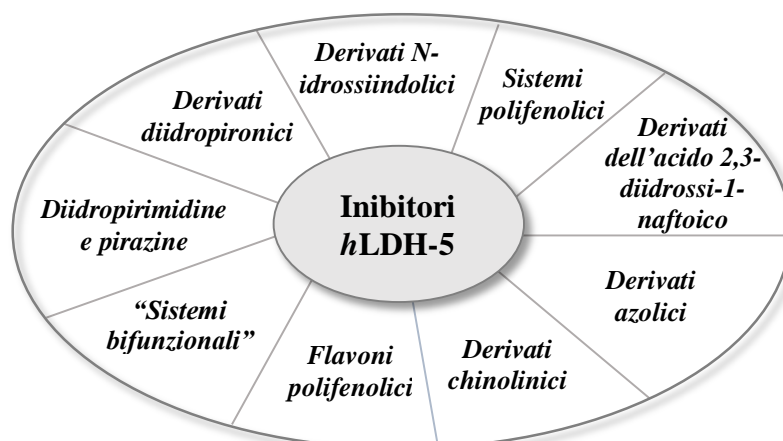
**Figura 1.7** - Struttura tridimensionale dell'enzima *hLDH-5* (M<sub>4</sub>) presente nel muscolo scheletrico.<sup>13</sup>



Ad oggi, pochi esempi di inibitori selettivi verso l'enzima *h*LDH-5 sono riportati in letteratura.

### 1.5.1 – Inibitori dell'enzima *h*LDH-5

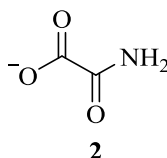
Gli inibitori più comuni dell'enzima LDH sono quelli sviluppati per l'isoforma presente nel *Plasmodium falciparum* (*pf*LDH), enzima indispensabile per la sopravvivenza del parassita della malaria. Molti di questi inibitori, data la scarsa selettività, si sono mostrati attivi anche per le isoforme umane dell'enzima LDH, inclusa l'isoforma 5 e sono stati impiegati come base per lo sviluppo di nuovi agenti antitumorali.<sup>5,8,10,14</sup> Questi tipi di inibitori possono essere suddivisi nelle seguenti classi (Figura 1.8): sistemi polifenolici, derivati dell'acido 2,3-diidrossi-1-naftoico, derivati azolici, derivati chinolinici, flavoni polifenolici, “sistemi bifunzionali”, diidropirimidine, derivati diidropironici e derivati *N*-idrossiindolici.<sup>5,8,10,14</sup>



**Figura 1.8** - Le varie classi di inibitori dell'enzima *h*LDH-5.<sup>14</sup>

L'ossammato (**2**, Figura 1.9), competitivo con il piruvato, rappresenta il composto di riferimento per gli inibitori dell'enzima *h*LDH-5 ed evidenzia un valore di  $IC_{50} = 130.6 \pm 1.2 \mu\text{M}$  e  $K_i = 136 \mu\text{M}$  verso l'isoforma *h*LDH-5 e  $94.4 \mu\text{M}$  verso l'isoforma *h*LDH-1.<sup>5,10,14</sup> Tale composto, isostero strutturale del piruvato, compete con quest'ultimo nel legarsi all'enzima, inibendo tutte le isoforme umane dell'enzima LDH. L'ossammato (**2**) presenta tuttavia una migliore capacità inibitoria nei confronti dell'enzima *pf*LDH piuttosto che dell'enzima LDH umano. La semplice struttura fa sì che l'azione antiglicolitica dell'ossammato sia poco selettiva verso l'isoforma 5

dell'enzima *h*LDH. Inoltre la scarsa permeabilità verso la membrana cellulare rende necessario l'impiego di alte concentrazioni di ossammato per ottenere buoni valori di IC<sub>50</sub>. Tutti questi fattori sfavorevoli precludono sviluppi futuri di questa molecola come agente terapeutico.<sup>5,8,10,14,15,16</sup>



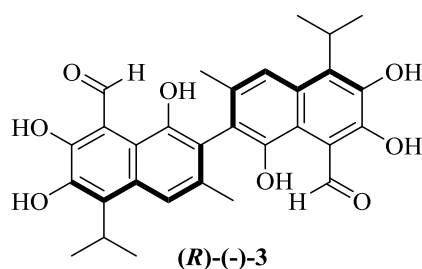
**Figura 1.9** - Struttura dell'ossammato (2).

Questi motivi hanno spinto gli studi verso la ricerca di nuove molecole in grado di inibire selettivamente l'enzima *h*LDH-5.

Tra gli inibitori non selettivi verso l'enzima LDH umano vi è il sistema polifenolico dell'(*R*)-(-)-gossipolo [(*R*)-(-)-**3**, *Figura 1.10*]. Il gossipolo, presente in due forme atropoisomeriche, è una molecola di origine naturale presente in alte concentrazioni nell'olio di semi di cotone, dove svolge il ruolo di insetticida naturale. L'iniziale interesse farmacologico per questa molecola era dovuto alla sua azione antispermatogena, oltre all'impiego come agente antiparassitario.

Successivamente studi citotossici su alcune culture di cellule tumorali hanno dimostrato che l'(*R*)-(-)-gossipolo (**3**) induce un effetto citotossico dose-dipendente con un valore di IC<sub>50</sub> pari a 20 μM. Saggi effettuati sulla miscela atropoisomerica hanno mostrato valori di *K<sub>i</sub>* pari a 1.9 μM verso *h*LDH-5 e 1.4 μM verso *h*LDH-1 [decisamente più potente rispetto all'altro atropoisomero, (*S*)-(+)-gossipolo].

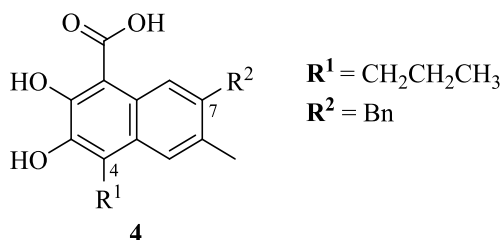
Tale inibitore agisce andando a competere con il NADH e non è selettivo né tra le isoforme dell'enzima LDH né per l'enzima stesso. Uno dei motivi per cui il gossipolo possiede una tossicità aspecifica sui tessuti biologici è la presenza di due gruppi aldeidici che possono legare qualsiasi ammino gruppo presente nelle molecole biologiche.



**Figura 1.10** - Struttura dell'(*R*)-(-)-gossipolo [(*R*)-(-)-**3**].

Quindi, la presenza di una tossicità aspecifica sui tessuti biologici attribuibile alla sua struttura altamente reattiva e la capacità di chelare ioni metallici non permettono di considerare l'(*R*)-(-)-gossipolo (**3**) un valido inibitore dell'enzima LDH.<sup>5,8,10,17</sup>

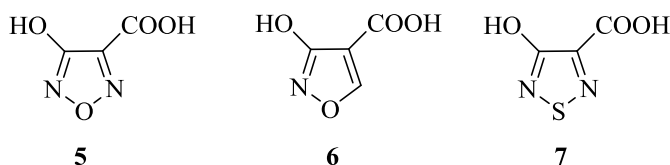
Nonostante questi risultati poco incoraggianti, sono stati sintetizzati vari composti, analoghi del gossipolo (**3**), con lo scopo di diminuire o eliminare i suoi effetti collaterali, pur mantenendo la sua attività biologica. Tra questi vi sono i derivati dell'acido 2,3-diidrossi-1-naftoico, aventi struttura generale mostrata in *Figura 1.11* e sostituiti in posizione 4 con vari gruppi alchilici come metile, *n*-propile o isopropile ed in posizione 7 con idrogeno, metile o gruppi benzilici sostituiti. In particolare il composto FX-11 (**4**, *Figura 1.11*) è un potenziale agente antitumorale in quanto è in grado di inibire preferenzialmente l'isoforma *h*LDH-5, competendo con il NADH. Inizialmente impiegato per combattere la malaria, ha mostrato  $K_i$  pari a 8  $\mu\text{M}$  verso *h*LDH-5 e circa 10 volte superiore verso *h*LDH-1.<sup>2</sup> Tuttavia, nonostante i risultati sperimentali incoraggianti esso, presentando una porzione catecolica reattiva, causa numerosi effetti *off-target* che lo rendono inutilizzabile in terapia.<sup>5,8,10,18</sup>



**Figura 1.11** - Derivati dell'acido 2,3-diidrossi-1-naftoico, in particolare FX-11 (**4**).

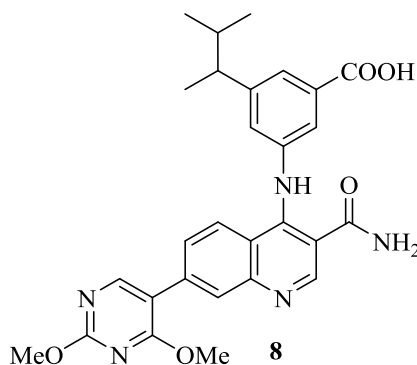
Un'altra importante classe di inibitori, inizialmente studiata come classe di agenti antimalarici, è rappresentata dai sistemi azolici che si sono dimostrati buoni inibitori

anche dell'enzima LDH umano. I composti **5** (1,2,5-ossadiazolo), **6** (1,2-isossazolo) e **7** (1,2,5-tiodiazolo) riportati nella *Figura 1.12* sono gli unici esempi di questa classe di composti che mostrano un valore di  $IC_{50}$ , relativo all'enzima *hLDH-1*, nell'ordine del micromolare.<sup>5,19</sup> Nel 2011, studi sul composto **7** effettuati da AstraZeneca (Macclesfield, UK), hanno evidenziato l'inibizione di tale molecola verso l'isoforma *hLDH-1* ( $IC_{50} = 7.8 \mu M$ ) e rivelato una modesta inibizione su *hLDH-5* ( $IC_{50} = 450 \mu M$ ).<sup>5,20</sup>



**Figura 1.12** - Derivati azolici **5**, **6**, **7**.

Dal 1972 anche i derivati chinolinici sono stati impiegati come sistemi eterociclici in grado di inibire molte deidrogenasi. Tra questi, il composto **8** (*Figura 1.13*) è il più rappresentativo in quanto manifesta eccellenti livelli di inibizione dell'isoforma *hLDH-5*, con un valore di  $IC_{50} = 63.1 \text{ nM}$ . La presenza dell'anello piridinico, simile alla porzione nicotinammidica del cofattore e del gruppo carbossilico che mima il piruvato/lattato permettono a tale molecola di legarsi all'enzima nel sito di *binding* per il substrato.<sup>5,14,21</sup>

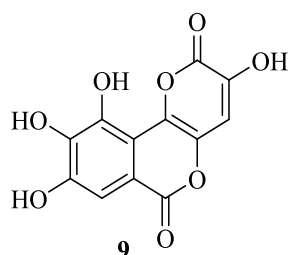


**Figura 1.13** - Un derivato chinolinico **8**.

La galloflavina (**9**, *Figura 1.14*), un flavone polifenolico derivante dall'ossidazione dell'acido gallico, è stata recentemente identificata come nuovo inibitore delle isoforme umane *hLDH-1* ( $K_i$  pari a  $5.46 \mu M$  vs piruvato e  $56.0 \mu M$  vs NADH) e

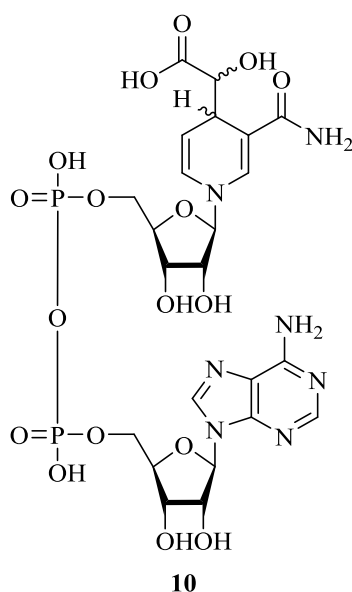
*h*LDH-5 ( $K_i$  pari a 15.1  $\mu\text{M}$  vs piruvato e 23.2  $\mu\text{M}$  vs NADH) perché in grado di legare l'enzima libero, competendo dunque sia con il piruvato che con il cofattore, con un valore di  $\text{IC}_{50}$  compreso tra 90 e 150  $\mu\text{M}$ .

Studi *in vitro* su alcune linee cellulari hanno infatti dimostrato che il composto **9** diminuisce la produzione di lattato, i livelli di ATP e la crescita della cellula cancerosa.<sup>5,10,14,22</sup>



**Figura 1.14** – Struttura della galloflavina (**9**).

Vi sono poi gli “inibitori bifunzionali”, termine usato per indicare quei composti in cui la porzione di molecola che mima il cofattore e quella che mima il substrato sono unite da un *linker* che permette di legare contemporaneamente le due porzioni enzimatiche. Il primo esempio di questa classe è il *glycolic acid-NADH* (GA-NADH) (**10**, *Figura 1.15*) in cui la molecola di acido glicolico ( $\text{HOCH}_2\text{COOH}$ ), legata sulla posizione 4 dell’anello nicotinamidico ridotto, mima il piruvato.



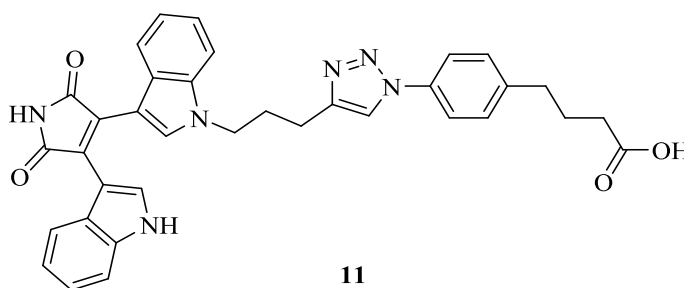
**Figura 1.15** – Esempio di “inibitore bifunzionale”: *glycolic acid-NADH* (**10**).

Tale composto ha mostrato un'elevata inibizione delle isoforme dell'enzima LDH presenti nel cuore dei bovini e nei muscoli dei conigli ed effetti cardioprotettivi sia *in vitro* che *in vivo*, con  $K_i$  circa 4 nM (inibizione competitiva con il NADH). La sua scarsa permeabilità cellulare ne impedisce tuttavia l'utilizzo in ambito medico come agente cardioprotettivo, ma non ne ha precluso gli studi volti a evidenziare il potere inibitorio verso l'enzima LDH.<sup>5,14,23</sup>

Una progettazione di farmaci mediante l'analisi dei frammenti (approccio “*fragment-based*”) ha indirizzato la ricerca verso la sintesi di trentuno “composti bifunzionali” come possibili inibitori dell'enzima *h*LDH-5, caratterizzati da:

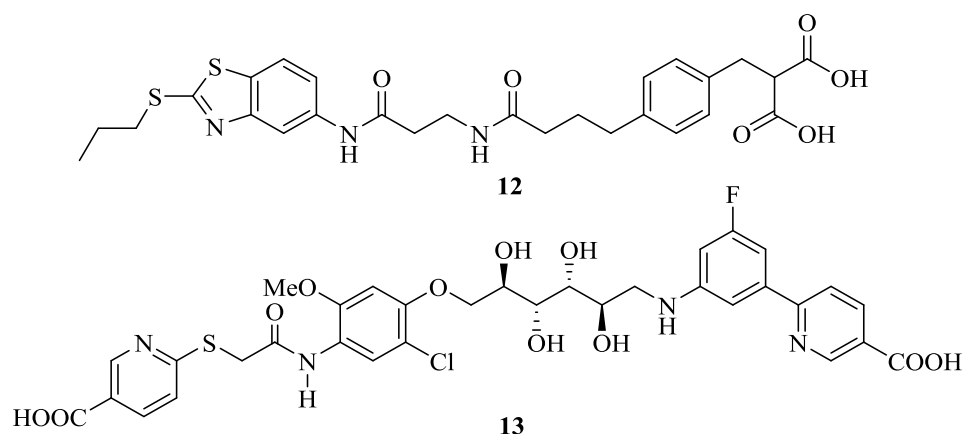
- una porzione bis-(indolil)-maleimidica che mima il NADH;
- una porzione contenente il gruppo –COOH che mima il substrato;
- un *linker* tra queste due porzioni, costituito da una catena alchilica oppure aril-alchilica di varia lunghezza contenente una molecola di 1,2,3-triazolo.

Tra tutti i derivati testati, il composto **11** (*Figura 1.16*) si è rivelato un inibitore selettivo verso l'isoforma *h*LDH-5, con un valore di  $IC_{50} = 14.8 \mu\text{M}$ .<sup>5,24</sup>



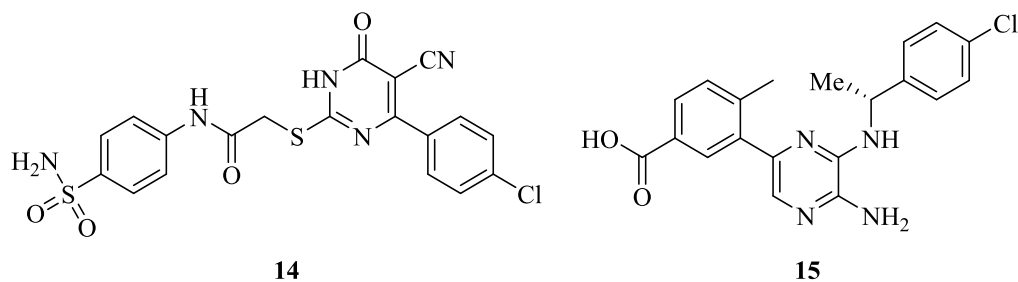
**Figura 1.16** – “Inibitore bifunzionale” **11**.

Recentemente, altri studi “*fragment-based*” svolti da AstraZeneca (Macclesfield, UK) e ARIAD Pharmaceuticals (MA, USA), hanno condotto a due “inibitori bifunzionali”, i composti **12**<sup>20</sup> e **13**<sup>25</sup> (*Figura 1.17*), aventi rispettivamente  $IC_{50}$  pari a 0.27  $\mu\text{M}$  e 0.12  $\mu\text{M}$ . Entrambi i sistemi, selettivi verso l'isoforma 5, mostrano un valore di  $IC_{50}$  tra i più bassi ad oggi riscontrati.<sup>5,10</sup>



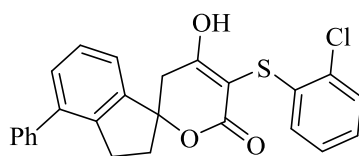
**Figura 1.17** – “Inibitori bifunzionali” **12** e **13**.

Nel 2013 Genentech (CA, USA) ha identificato una 2-tio-6-oxo-1,6-diidropirimidina<sup>26</sup> (**14**, *Figura 1.18*) e una 2-ammino-5-aril-pirazina<sup>27</sup> (**15**, *Figura 1.18*) come molecole in grado di inibire l'enzima *h*LDH-5. Il derivato pirimidinico **14** ha un valore di  $IC_{50} = 8.8 \mu\text{M}$  relativamente all'enzima *h*LDH-5 ma mostra anche un'attività inibitoria verso l'isoforma 1 dell'enzima *h*LDH ( $IC_{50} = 11.1 \mu\text{M}$ ) rendendolo dunque poco selettivo come inibitore.<sup>5,14,26</sup> Il derivato pirazinico **15** inibisce l'isoforma 5 con un  $IC_{50} = 0.50 \mu\text{M}$ .<sup>14,27</sup>



**Figura 1.18** – Recenti studi del gruppo Genentech: derivato diidropirimidinicco **14** e pirazinico **15**.

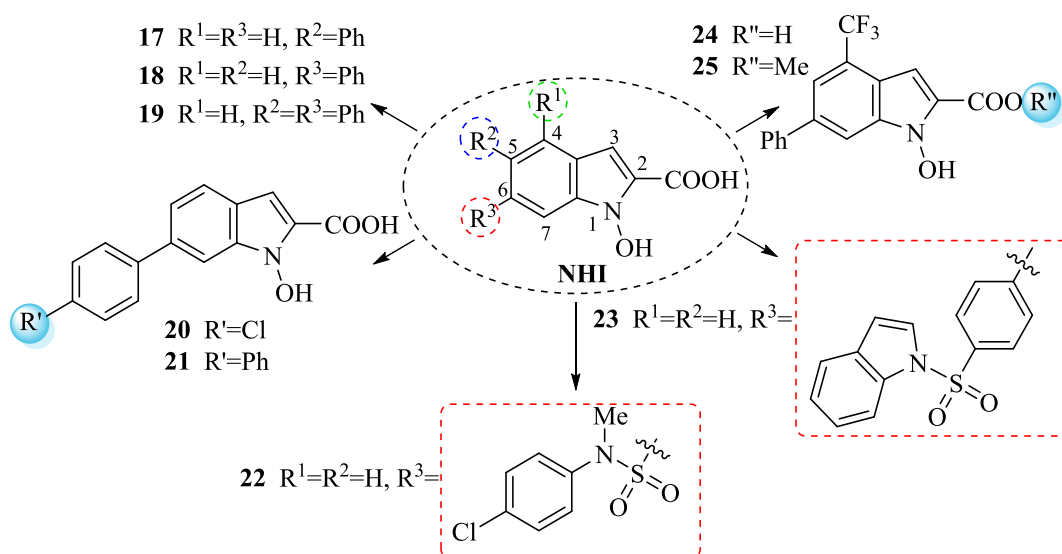
Anche i derivati diidropiridinici si sono dimostrati validi inibitori dell'enzima *h*LDH-5. Tra questi vi è il composto **16**, (*Figura 1.19*), con valore di  $IC_{50} = 0.030 \mu\text{M}$  relativo ad uno dei due enantiomeri, di cui non è stata attribuita la configurazione assoluta. Tale composto ha un'elevata solubilità a  $\text{pH} = 7.4$  ed un elevato livello di legame con le proteine plasmatiche dovuto anche alla sua alta lipofilia.<sup>14,28</sup>



16

**Figura 1.19** – Sistema diidropironico **16**.

A partire dal 2011 sono stati ideati nuovi composti in cui gli elementi farmacoforici sono stati inseriti in uno *scaffold* eterociclico aromatico tanto inusuale quanto innovativo: l'*N*-idrossiindolo (NHI), *Figura 1.20*.<sup>2,29</sup> La presenza del gruppo ossidrilico legato all'azoto sulla posizione 1 e del gruppo carbossilico in posizione 2 fanno sì che tale sistema mostri attività inibitoria, andando a competere, nel legarsi all'enzima, sia con il cofattore che con il substrato. La porzione farmacoforica *N*-OH/COOH sembra infatti mimare la struttura del substrato naturale dell'enzima LDH ovvero l' $\alpha$ -cheto acido (piruvato) oppure l' $\alpha$ -idrossi acido (lattato).<sup>5,14</sup>

**Figura 1.20** – Vari derivati *N*-idrossiindolici.<sup>14</sup>

Ad esempio il derivato *N*-idrossiindolico **17**, che presenta in posizione 5 un fenile, sembra esibire una maggiore attività inibitoria rispetto a **18**, dove tale sostituito si trova in posizione 6. La presenza di due gruppi fenilici in posizione 5 e 6 dell'NHI (composto **19**) aumenta ulteriormente l'inibizione verso l'isoforma *h*LDH-5 con valori



di  $K_i = 5.4 \mu\text{M}$  vs NADH e  $7.5 \mu\text{M}$  vs piruvato. Viceversa l'inserimento di un *p*-clorofenile (composto **20**) o di un bifenile (composto **21**) in posizione 6 ha effetti negativi sui valori della  $K_i$ .<sup>2,14,30</sup>

I derivati solfonamidici **22** e **23** hanno valori di  $K_i$  pari a  $6.6$  e  $7.7 \mu\text{M}$  vs NADH e  $5.6$  e  $8.8 \mu\text{M}$  vs piruvato.<sup>31</sup> Successivamente, l'inserimento di un gruppo elettron-attrattore come il  $-\text{CF}_3$  in posizione 4, oltre al fenile in 6, ha permesso di ottenere il composto **24**, avente  $K_i$  e  $\text{IC}_{50}$  mostrati in *Tabella 1.1*.<sup>2,32</sup>

**Tabella 1.1** - Valori di  $\text{IC}_{50}$  e  $K_i$  relativi ai composti **24** e **25**.<sup>2,14,32</sup>

|           | LDH-5 ( $\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{M}$ ) |                 | LDH-1 ( $\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{M}$ ) |                | LDH-5 ( $K_i$ , $\mu\text{M}$ ) |               |
|-----------|--|-----------------|--|----------------|---------------------------------|---------------|
|           | [NADH]                                     | [piruvato]      | [NADH]                                     | [piruvato]     | [NADH]                          | [piruvato]    |
| <b>24</b> | $29.0 \pm 3.0$                             | $73.4 \pm 11.0$ | $123.8 \pm 0.7$                            | >200           | $8.9 \pm 1.3$                   | $4.7 \pm 0.5$ |
| <b>25</b> | $14.7 \pm 2.1$                             | $10.5 \pm 2.5$  | $55.8 \pm 7.1$                             | $53.8 \pm 4.4$ | $5.1 \pm 1.1$                   | –             |

Successivamente l'approccio sintetico ha permesso di sostituire la funzionalità acida con un gruppo estereo in modo da ottenere l'1-idrossi-6-fenil-4-(trifluorometil)-1H-indolo-2-carbossilato di metile (**25**), composto che ha fornito i risultati più soddisfacenti tra i tutti i derivati indolici finora sintetizzati (*Tabella 1.1*).<sup>14,32</sup>

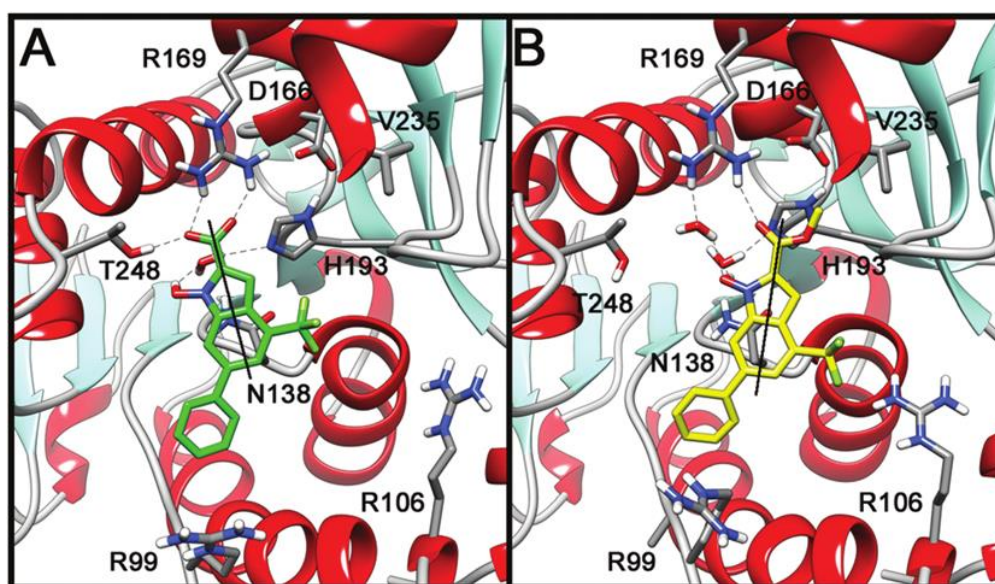
### 1.5.2 – Interazioni tra l'isoforma *h*LDH-5 e gli agenti citotossici **24** e **25**

Studi di modellistica molecolare hanno permesso la comprensione delle interazioni che si instaurano tra i derivati *N*-idrossiindolici **24** e **25** e l'enzima LDH-5.<sup>5,2,32</sup> In particolare è stato evidenziato che il derivato **24** mostra due interazioni fondamentali (*Figura 1.21A*):

- una forte interazione tra la funzione carbossilica del composto e le catene laterali dei residui amminoacidici Arg<sup>169</sup> (R169) e Thr<sup>248</sup> (T248);
- un legame a idrogeno tra l'ossidrilico indolico e l'azoto della catena laterale di del residuo amminoacidico Thr<sup>248</sup>.

Inoltre il gruppo *N*-OH è coinvolto in un legame a idrogeno con il residuo amminoacidico His<sup>193</sup> (H193) e tale interazione è mediata da una molecola di acqua.

Lo *scaffold* centrale del derivato **24** si inserisce in una tasca delimitata dai residui amminoacidici His<sup>193</sup>, Gly<sup>194</sup> (G294), Ala<sup>238</sup> (A238), Val<sup>241</sup> (V241), Ile<sup>242</sup> (I242) e Thr<sup>248</sup> cosicché Asn<sup>138</sup> (N138) va a trovarsi in prossimità del gruppo  $-CF_3$ . Il gruppo fenilico in posizione 6 invece è orientato verso l'ingresso al sito di *binding* e mostra interazioni lipofile sia con Ile<sup>242</sup> che con Tyr<sup>247</sup> (Y247). Inoltre questa porzione di molecola si sovrappone parzialmente alla regione occupata dal cofattore NADH nella struttura dell'enzima *hLDH-5* ai raggi X.<sup>2,5,32</sup>



**Figura 1.21** – Studi di modellistica molecolare sui complessi LDH-A con **24** (A, verde) e con **25** (B, giallo).<sup>32</sup>

Nel caso del derivato **25** (*Figura 1.21B*) gli studi di modellistica molecolare hanno mostrato che il gruppo estereo forma legami a idrogeno con il residuo amminoacidico Arg<sup>169</sup> ed il sostituente metilico è orientato verso il residuo lipofilo Val<sup>235</sup> (V235). La rotazione della molecola porta ad una nuova interazione, sempre mediata dall'acqua, tra il gruppo ossidrilico legato all'azoto indolico ed il gruppo NH del residuo amminoacidico Arg<sup>169</sup>. Oltre a ciò, il gruppo  $-CF_3$  va a trovarsi in prossimità del residuo carico positivamente di Arg<sup>106</sup>. Il resto della molecola mostra interazioni simili a quelle relative al composto **24** con l'enzima, incluso quella mediata dall'acqua tra *N*-OH ed il residuo amminoacidico His<sup>193</sup>.<sup>32</sup> I derivati indolici **24** e **25** hanno rivelato capacità inibitorie nei confronti dell'enzima *hLDH*, con elevata selettività

verso l'isoforma 5 rispetto all'isoforma 1 ed un comportamento competitivo sia nei confronti del NADH che del piruvato.

I saggi cellulari hanno infine confermato che il derivato *N*-idrossiindolico **25** è in grado di bloccare efficacemente la proliferazione cellulare, specialmente in condizioni di ipossia, riducendo la produzione di lattato. Il composto **24**, diversamente da **25**, mostra dei problemi di permeabilità cellulare che ne riducono l'efficacia nei saggi condotti su cellule.<sup>2,32</sup>

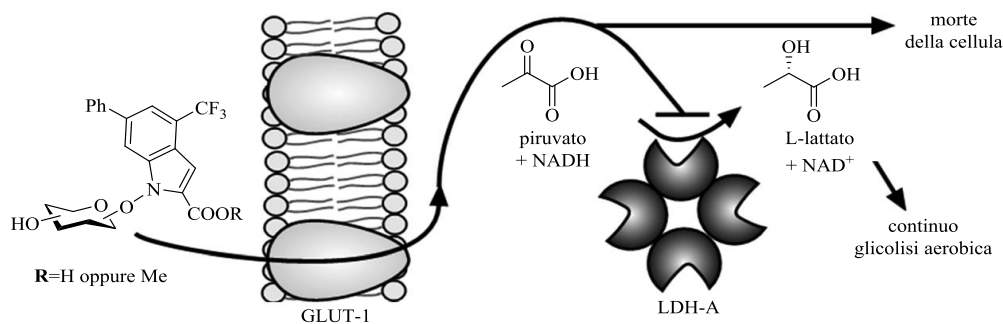
## 1.6 – La glicoconiugazione

Una strategia molto promettente per ottenere composti biologicamente attivi è quella di coniugare porzioni saccaridiche ad agenti dotati di azione citotossica.

Affinché tale glicoconiugazione sia efficace come metodica antitumorale, i trasportatori del glucosio devono essere sovraespressi nelle cellule tumorali rispetto alle cellule sane, in ragione dell'intensa attività glicolitica che esse svolgono (*effetto Warburg*). È stato infatti osservato che in molte forme tumorali vi è una sovraespressione del trasportatore GLUT-1. I trasportatori GLUT, famiglia di proteine che regolano il trasporto di glucosio (**1**) attraverso la membrana cellulare, mostrano affinità anche verso altri derivati saccaridici. In questo modo i glicoconiugati possono essere captati con avidità dalle cellule tumorali e, qualora il processo di captazione dello zucchero non subisca perturbazioni dovute alla coniugazione con l'agente citotossico, quest'ultimo viene introdotto in maniera rapida ed efficace all'interno della cellula tumorale, dove esplica la propria azione.<sup>33,34</sup>

### 1.6.1 – Saccaridi portanti strutture *N*-idrossiindoliche come aglicone

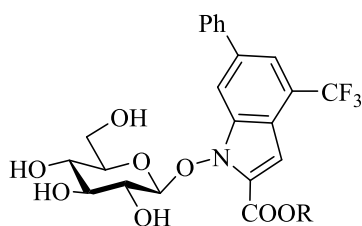
La strategia ha avuto come obiettivo l'ottenimento di derivati saccaridici *N*-idrossiindolici in grado di coniugare l'effetto inibitorio dell'unità *N*-idrossiindolica verso l'isoforma *h*LDH-5 all'elevata captazione cellulare della porzione zuccherina da parte dei trasportatori GLUT. In questo modo, diminuendo oppure arrestando la produzione di lattato, si ha conseguentemente la morte della cellula cancerosa (*Figura 1.22*).<sup>35</sup>



**Figura 1.22**– Esempio di glicoconiugazione.<sup>35</sup>

Inizialmente, la scelta della porzione saccaridica da coniugare con gli agenti citotossici **24** e **25** è stata rivolta verso il D-glucosio (**1**), monosaccaride più rappresentato nell'organismo. Sono stati così sintetizzati i glucoconiugati **26** e **27** (Figura 1.23).<sup>34,35</sup>

Studi *in vitro* sul glucoconiugato **27** hanno evidenziato che tale sistema, competendo con il NADH, inibisce l'isoforma 5 dell'enzima *h*LDH. Tuttavia la coniugazione con lo zucchero abbatte la capacità inibitoria di circa 2 volte rispetto a **24** e circa 7 volte rispetto a **25** ( $K_i = 37.8 \pm 0.9 \mu\text{M}$ , Tabella 1.2). Al contrario, studi di tossicità su alcune linee cellulari hanno mostrato che mentre **26** è inattivo, il derivato **27** è più efficace di circa 3/5 volte rispetto a **24** e di circa 6/9 volte rispetto a **25**. Il glucoconiugato **27** è infatti in grado di condurre ad una riduzione molto efficace e dose-dipendente della produzione di lattato in alcuni tipi di cellule cancerose (più potente dell'aglicone **25**) grazie allo sfruttamento dei sistemi di trasporto GLUT che ne permettono un maggior *uptake* nella cellula.<sup>34,35</sup>

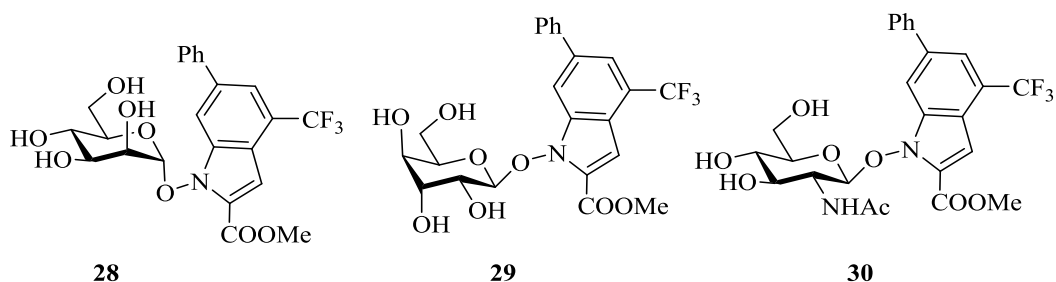


**26** R=H  
**27** R=Me

**Figura 1.23** – Strutture dei glucoconiugati **26** e **27**.

Caratteristica comune ai derivati **26** e **27** è il fatto che, una volta all'interno della cellula, essi non agiscono come profarmaci visto che non vengono scissi nell'aglicone e nella porzione saccaridica.<sup>35</sup> Probabilmente il particolare legame glicosidico presente in queste strutture non rappresenta il substrato più idoneo per le glicosidasi cellulari, gli enzimi preposti alla scissione dei legami glicosidici presenti nelle più comuni strutture saccaridiche.

Sulla base di questi incoraggianti risultati, sono stati sintetizzati i glicoconjugati **28**, **29**, **30** (Figura 1.24)<sup>36</sup> dove l'inibitore *N*-idrossiindolico **25** è legato sia a monosaccaridi ossigenati di diversa stereochimica come D-mannosio e D-gulosio che ad amminozuccheri come la *N*-acetil-D-glucosamina.



**Figura 1.24** – Strutture dei glicoconjugati **28**, **29** e **30**.

L'attività inibitoria di questi glicoconjugati è stata misurata attraverso saggi enzimatici sull'isoforma 5 dell'enzima *h*LDH ed il valore di  $K_i$  di ogni composto è stato registrato in condizione di competizione con il NADH. I derivati **28**, **29** e **30** hanno mostrato una minor attività inibitoria rispetto a **27**, con valori di  $K_i$  compresi tra 68.1 e 98.4  $\mu\text{M}$  (Tabella 1.2).<sup>36</sup>

**Tabella 1.2** – Inibizione enzimatica *in vitro* dei glicoconjugati **27-30** vs *h*LDH-5.<sup>35,36</sup>

|           | LDH-A ( $K_i$ , $\mu\text{M}$ ) |
|-----------|---------------------------------|
| <b>27</b> | 37.8 $\pm$ 0.9                  |
| <b>28</b> | 92.4 $\pm$ 9.0                  |
| <b>29</b> | 68.1 $\pm$ 17.5                 |
| <b>30</b> | 98.4 $\pm$ 15.6                 |

I dati riportati in *Tabella 1.2* mostrano che il derivato  $\beta$ -glucopiranosidico **27** rimane il più potente inibitore tra i glicoconiugati finora sintetizzati e testati nei saggi *in vitro* sull'enzima isolato. Inoltre, studi condotti su alcune linee cellulari, hanno evidenziato che il derivato  $\alpha$ -mannopiranosidico **28** conduce ad un'efficace e dose-dipendente riduzione di lattato, comparabile con quella del glucoconiugato **27**.

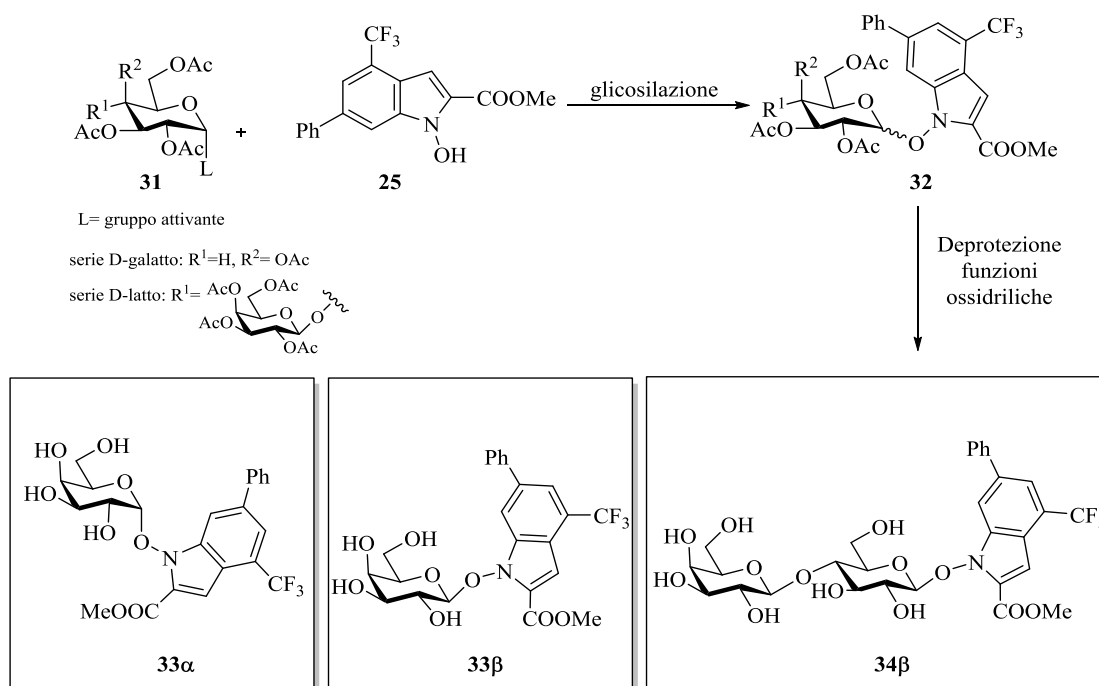
Un'apprezzabile attività dose-dipendente è stata osservata anche nel derivato  $\beta$ -gulopiranosidico **29** mentre il derivato  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminico **30** non ha mostrato alcuna attività significativa.<sup>36</sup> In maniera analoga a quanto osservato per il composto **27**, è stato evidenziato un maggior *uptake* in alcuni tipi di cellule del derivato  $\alpha$ -mannopiranosidico **28** rispetto al derivato *N*-idrossiindolico **25**. I derivati  $\beta$ -glucopiranosidico **27** e  $\alpha$ -mannopiranosidico **28** mostrano un livello di *uptake* simile e superiore al derivato  $\beta$ -gulopiranosidico **29**.<sup>36</sup>

## 1.7 – Scopo della tesi

Sulla base di quanto esposto nei paragrafi precedenti, il lavoro svolto in questa tesi ha avuto come obiettivo la sintesi di nuovi glicoconiugati contenenti l'unità *N*-idrossiindolica **25** legata, in posizione anomeric o in posizione C-6, a zuccheri mono- e disaccaridici con lo scopo di valutare come varia il rapporto struttura-attività in funzione sia del tipo di saccaride che della posizione di legame dell'agente citotossico. Il progetto di tesi è stato articolato in due sezioni principali, per le quali, nel prossimo capitolo, saranno analizzati in dettaglio i singoli passaggi e le problematiche affrontate.

Un primo obiettivo ha riguardato la sintesi di glicoconiugati dove l'unità *N*-idrossiindolica **25** è legata attraverso un legame glicosidico sia all'unità monosaccaridica della serie D-galatto che all'unità disaccaridica (D-latto). I risultati biologici ottenuti da questi glicoconiugati, confrontati con quelli ottenuti nelle precedenti ricerche, hanno permesso di ottenere utili informazioni sia sulla relazione fra le diverse unità saccaridiche presenti nei glicoconiugati che sull'incremento dell'idrofilicità nel caso del derivato disaccaridico. La sintesi dei glicoconiugati anomeric protetti mono- e disaccaridici tipo **32** (resa 22-65%) ha previsto la preliminare trasformazione del D-galattosio e D-lattosio, entrambi commerciali, negli

opportuni glicosil donatori tipo **31** (ad esempio tricloroacetimmidati), seguita da una reazione di glicosilazione con il nucleofilo **25**, condotta in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  o  $\text{CH}_3\text{CN}$  ed utilizzando opportuni promotori come TMSOTf o  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (Schema 1.1).



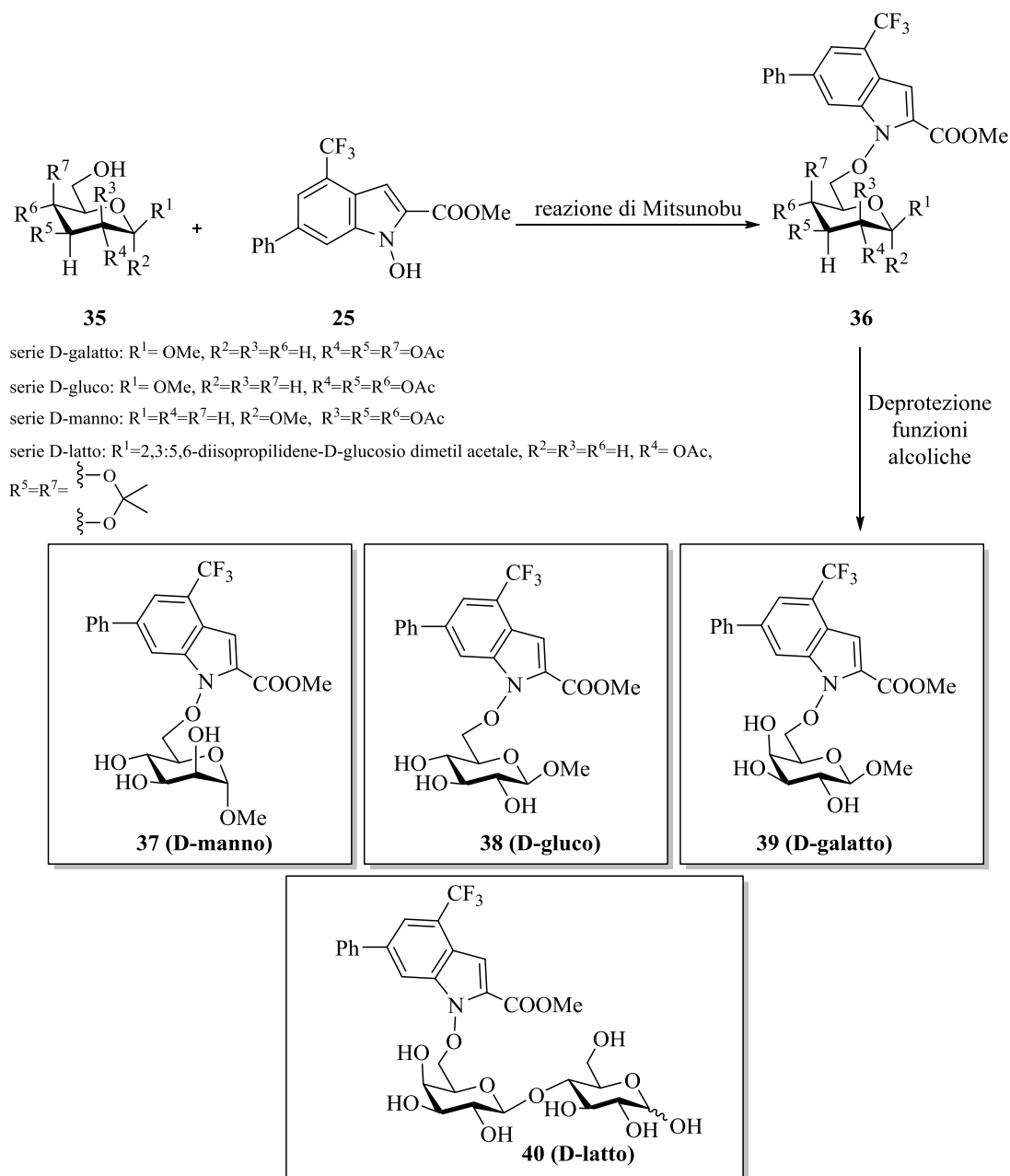
**Schema 1.1** – Nuovi glicocongiugati anomericici mono- e disaccaridici.

Il secondo obiettivo di questo lavoro di tesi è stata la sintesi di nuovi glicocongiugati dove il farmacoforo *N*-idrossiindolico è legato sulla posizione primaria (C-6) di mono- e disaccaridi con lo scopo di ottenere utili informazioni sulla dipendenza dell'attività biologica dalla diversa locazione dell'unità *N*-idrossiindolica nei diversi glicocongiugati. La strategia sintetica adottata ha previsto due fasi distinte ed è illustrata nello *Schema 1.2*.

Nella prima fase sono stati preparati i precursori saccaridici tipo **35**, aventi un gruppo alcolico primario libero, attraverso semplici sequenze sintetiche di protezione-deprotezione ortogonale a partire dai corrispondenti precursori deprotetti commerciali (metil  $\beta$ -D-galattopiranoside, metil  $\beta$ -D-glucopiranoside, metil  $\alpha$ -D-mannopiranoside e D-lattosio).

Nella seconda fase i saccaridi tipo **35** sono stati trasformati nei glicocongiugati tipo **36** (rese 46-86%) attraverso una reazione di Mitsunobu con il derivato *N*-

idrossiindolico **25** condotta in THF anidro, trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>) ed utilizzando dialchil azodicarbossilati come il diisopropil azodicarbossilato (DIAD) o il di-2-metossietil azodicarbossilato (DMEAD).

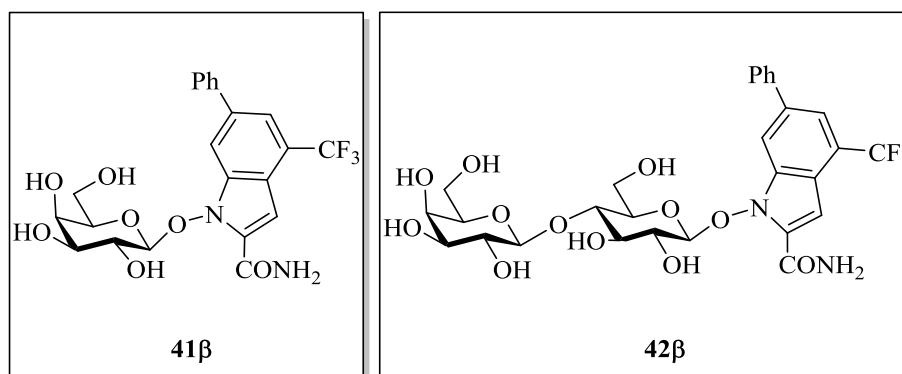


**Schema 1.2** – Nuovi glicoconjugati mono- e disaccaridici aventi l'unità *N*-idrossiindolica sulla posizione C-6 dell'unità saccaridica

La completa rimozione dei gruppi protettori presenti sull'unità saccaridica dei glicoconjugati tipo **32** e **36** ha permesso di ottenere i corrispondenti derivati deprotetti **33a**, **33b**, **34b** (Schema 1.1) e **37**, **38**, **39** e **40** (Schema 1.2) in ottime rese (92-98%).



Nel caso dei glicoconiugati anomeric tipo **32** (serie D-galatto e D-latto), la reazione di desacetilazione, effettuata in  $\text{NH}_3\text{-MeOH}$  anziché in presenza di  $\text{MeONa}$  in  $\text{MeOH}$ , ha condotto alla sintesi delle ammidi **41 $\beta$**  e **42 $\beta$**  (Figura 1.25) in ottime rese (96-98%).



**Figura 1.25** – Nuovi glicoconiugati aventi una funzionalità ammidica.

Con l'ottenimento dei glicoconiugati **33 $\alpha$** , **33 $\beta$** , **34 $\beta$**  (Schema 1.1), **37**, **38**, **39** e **40** (Schema 1.2) e **41 $\beta$** , **42 $\beta$**  (Figura 1.25) è stato raggiunto l'obiettivo sintetico prefissato in questo lavoro di tesi e volto alla ricerca di una combinazione ottimale tra unità saccaridica e *N*-idrossiindolica capace di agire sia nel profilo di captazione cellulare che nella potenza inibitoria nei confronti dell'enzima *h*LDH-5.

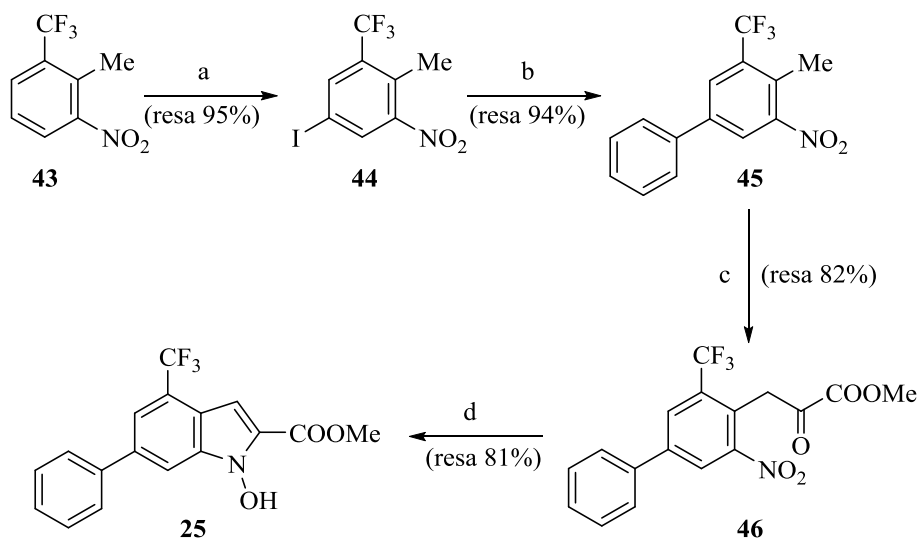
I glicoconiugati deprotetti **33 $\alpha$** , **33 $\beta$** , **34 $\beta$** , **37**, **38**, **39** e **40** insieme ai derivati **41 $\beta$**  e **42 $\beta$**  sono stati sottoposti a saggi di inibizione nei confronti dell'enzima *h*LDH-5 *in vitro*. Inoltre i derivati **33 $\alpha$** , **33 $\beta$**  e **34 $\beta$** , che hanno mostrato un'interessante attività di inibizione nei confronti dell'enzima *h*LDH-5, sono stati inviati al gruppo di ricerca del Prof. Hergenrother (University of Illinois, Urbana-Champaign) che ha effettuato saggi di citotossicità su cellule di tumore polmonare (A549). I risultati biologici saranno illustrati nel capitolo 2.

## 2 - Risultati e discussione

### 2.1 – Sintesi del derivato *N*-idrossiindolico 25

Il derivato NHI **25** è stato preparato secondo la procedura riportata in letteratura<sup>2</sup> che prevede i passaggi sintetici riportati nello *Schema 2.1*.

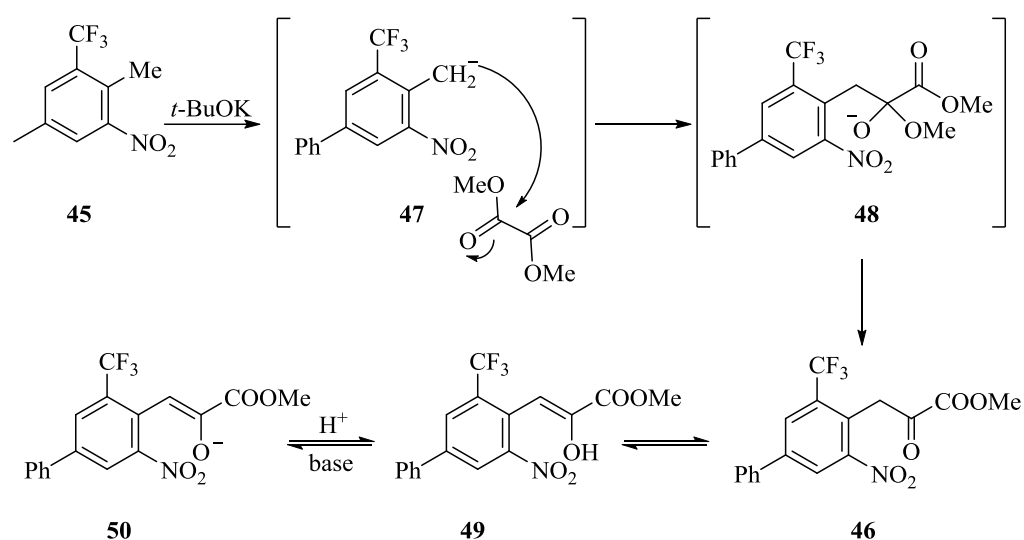
Il primo *step* della strategia sintetica consiste nella iodurazione del composto **43**, attraverso una reazione di sostituzione elettrofila aromatica condotta secondo la metodologia riportata da Hume e coll.<sup>37</sup> Tale procedura, che prevede l'impiego di *N*-iodosuccinimide (NIS) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato, permette di inserire regioselettivamente lo iodio sulla posizione 5 grazie agli effetti orientanti del nitro gruppo, del sostituente metilico e del gruppo –CF<sub>3</sub>.



**Schema 2.1** – Reagenti e condizioni: a) NIS, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc., 5-10°C (5 h) poi t.a. (16 h); b) PhB(OH)<sub>2</sub>, Pd(OAc)<sub>2</sub>, PPh<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq. 2 M, EtOH assoluto, toluene, 100°C *overnight*; c) (COOMe)<sub>2</sub>, *t*-BuOK, Et<sub>2</sub>O, MeOH, 0°C (15 min) poi t.a. *overnight*; d) SnCl<sub>2</sub>, DME, setacci molecolari 4Å, 0°C→t.a. (21 h).

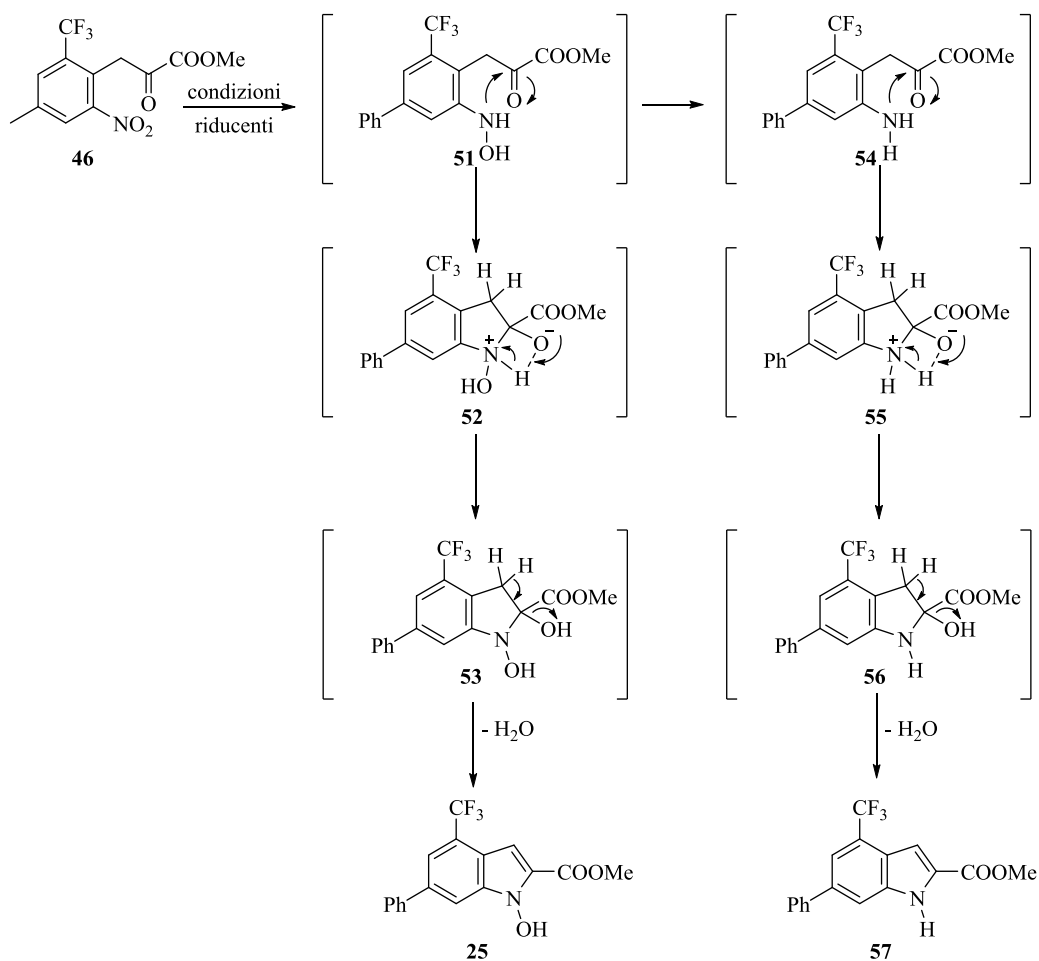
Il derivato **44**, ottenuto in resa del 95% (parametri spettroscopici in accordo con il dato di letteratura<sup>37</sup>), è stato sottoposto a reazione di *cross-coupling* di Suzuki<sup>38</sup> impiegando l'acido fenilboronico [PhB(OH)<sub>2</sub>] come *partner* organometallico, Pd(OAc)<sub>2</sub> come precatalizzatore e PPh<sub>3</sub> come legante. La reazione, condotta a 100°C, ha fornito **45** (resa 94%) che successivamente è stato trasformato nel derivato **46** (resa

82%, parametri spettroscopici in accordo con il dato di letteratura<sup>2)</sup> per trattamento con *t*-BuOK e dimetilossalato (COOMe)<sub>2</sub>. Il meccanismo di tale reazione è illustrato nello *Schema 2.2*. Il derivato **45** viene facilmente deprotonato ad opera di *t*-BuOK grazie alla presenza, in posizione *orto*, di un gruppo elettron-attrattore come il gruppo nitro. Successivamente l'anione **47** funge da nucleofilo per il carbonio carbonilico del dimetilossalato e porta alla formazione del derivato **48** che, eliminando MeO<sup>-</sup>, fornisce il chetoestere **46** in equilibrio tautomerico con la forma enolica **49**. La presenza della base favorisce la deprotonazione dell'enolo **49** per dare l'anione **50** confermato, nella miscela di reazione, da un'intensa colorazione rosso-viola.



**Schema 2.2** – Meccanismo di formazione del derivato chetoestereo **46** e suo equilibrio tautomerico con la forma enolica.

L'ultimo passaggio sintetico, ovvero la ciclizzazione riduttiva del chetoestere **46** in presenza di SnCl<sub>2</sub> come agente riducente, ha permesso di ottenere il prodotto desiderato **25** con resa dell'81%.<sup>2</sup> Secondo il meccanismo illustrato nello *Schema 2.3*, il cloruro stannoso determina infatti una riduzione parziale del gruppo nitro ad idrossilammina **51** che ciclizza *in situ* per attacco nucleofilo dell'azoto sul carbonile del chetoestere a dare, dopo disidratazione, il derivato ciclico *N*-idrossiindolico **25**.<sup>39,40,41</sup>

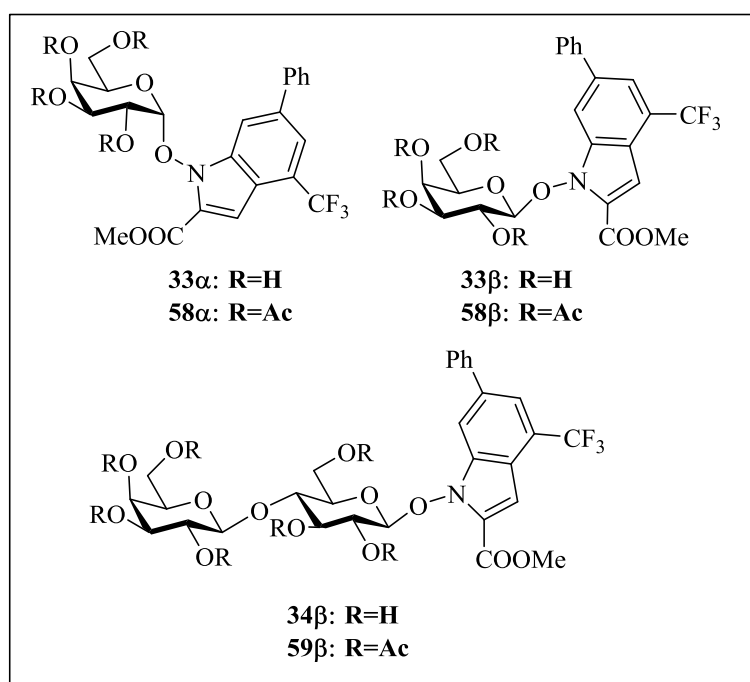


**Schema 2.3** – Meccanismo di ciclizzazione riduttiva del chetoestere **46**.<sup>40,41</sup>

Tuttavia il problema maggiore della ciclizzazione è dato dalla contemporanea formazione del derivato indolico **57**, in quantità variabili, insieme al derivato NHI desiderato **25**. L'idrossilammina **51** può essere infatti ulteriormente ridotta ad ammina **54** ed in questo caso l'attacco del doppietto dell'azoto sul carbonio carbonilico e la successiva disidratazione portano all'ottenimento del derivato indolico **57**, come sottoprodotto di reazione.<sup>40,41</sup>

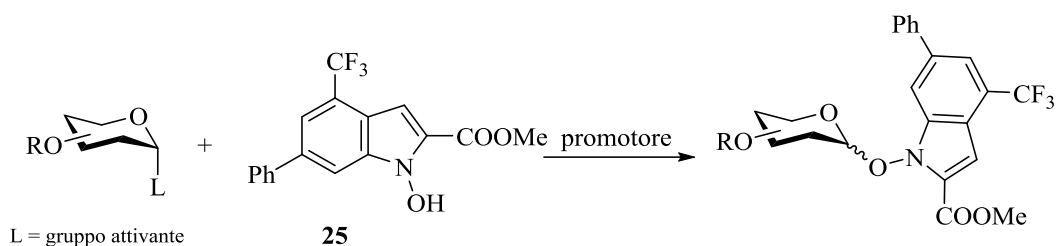
## 2.2 – Sintesi di glicoconiugati in posizione anomeric

Il primo obiettivo del presente lavoro di tesi è stata la sintesi dei glicoconiugati **33 $\alpha$**  e **33 $\beta$**  (contenenti l'unità di D-galattosio) e **34 $\beta$**  (contenente l'unità D-lattosidica) e portanti lo *scaffold* *N*-idrossiindolico in posizione anomeric (*Figura 2.1*). Idonei precursori di questi glicoconiugati si sono rivelati i derivati *N*-idrossiindolici **58 $\alpha$** , **58 $\beta$**  e **59 $\beta$**  aventi una completa omogeneità dei sostituenti sulle porzioni saccaridiche (gruppi acetilici). Ciò ha permesso l'ottenimento dei *target* finali utilizzando reazioni che avvengono con rese quantitative, come ad esempio la desacetilazione con MeONa in MeOH, associate ad una facile purificazione dei prodotti.



**Figura 2.1**– Obiettivi sintetici.

Il passaggio chiave di questo approccio sintetico è rappresentato dalla reazione di glicosilazione che prevede l'attacco di un nucleofilo sul carbonio anomeric di un saccaride avente in tale posizione un gruppo attivante. In particolare, dopo aver sintetizzato gli opportuni glicosil donatori, è stata effettuata la reazione di glicosilazione con il derivato *N*-idrossiindolico **25** quale glicosil accettore, secondo lo schema generale illustrato di seguito (*Schema 2.4*).



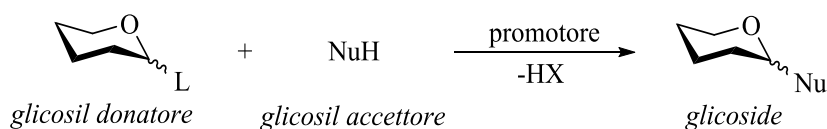
**Schema 2.4** – Schema generale per la preparazione di glicocongiugati.

La reazione di glicosilazione ha permesso di ottenere i glicocongiugati peracetilati **58a**, **58b** e **59b** che successivamente sono stati sottoposti a reazione di desacetilazione per ottenere i *target* finali **33a**, **33b** e **34b** (Figura 2.1).

### 2.2.1 – Caratteristiche generali delle reazioni di glicosilazione

Negli ultimi anni, le reazioni di glicosilazione hanno acquisito un enorme sviluppo e un posto di rilievo nella chimica dei carboidrati.<sup>42</sup> Tali reazioni permettono infatti l'introduzione di diverse funzionalità quali alcoli, ammine, tioli e tioeteri sulla posizione anomeric (C-1) del saccaride. La reazione avviene secondo un meccanismo di sostituzione nucleofila al carbonio anomeric e coinvolge l'agente glicosilante, che prende il nome di glicosil donatore e la specie nucleofila (NuH) denominata glicosil accettore.

L'agente glicosilante deve possedere in posizione anomeric un gruppo attivante (L) le cui caratteristiche di elettrofilo siano esaltate con l'uso di un adeguato promotore (Schema 2.5).<sup>43</sup>



**Schema 2.5** – Schema generale delle reazioni di glicosilazione.<sup>43</sup>

Il meccanismo generale può essere semplificato ammettendo che un promotore favorisca l'uscita del gruppo attivante in posizione anomeric dando luogo ad un carbocatione il quale viene successivamente attaccato da un nucleofilo. Tali reazioni, nel caso in cui l'ossidrile in posizione C-2 non sia funzionalizzato, hanno quindi un considerevole carattere S<sub>N</sub>1.<sup>44</sup>

Esistono numerosi metodi di glicosilazione che vengono scelti a seconda della strategia necessaria per ottenere il *target* saccaridico desiderato.<sup>42</sup> Ad oggi, non esiste una metodica di glicosilazione universalmente applicabile, in quanto numerosi sono i fattori che regolano questo tipo di reazioni, tra cui la scelta del glicosil donatore, del gruppo uscente, del gruppo protettore in posizione C-2, del solvente e della temperatura. Una reazione di glicosilazione chimica ideale dovrebbe avere le stesse caratteristiche di una glicosilazione enzimatica, ovvero essere quantitativa, veloce, sperimentalmente facile e soprattutto stereoselettiva. La stereoselettività è sicuramente uno dei limiti delle reazioni di glicosilazione, in quanto è quasi impossibile perseguire reazioni S<sub>N</sub>2 "pulite" sul carbonio anomero. Ciò è attribuibile all'assistenza vicinale dell'ossigeno endociclico che stabilizza il carbocatione derivante dalla perdita del gruppo uscente sulla posizione anomero, conferendo a tali reazioni un considerevole carattere S<sub>N</sub>1.

Il nuovo legame glicosilico che si forma può essere sia  $\alpha$  che  $\beta$  ed i glicoconjugati ottenuti possono essere sistemi 1,2-*cis* o 1,2-*trans*, terminologia che sottolinea la relazione fra il sostituente in posizione anomero ed il gruppo ossidrilico sul C-2.

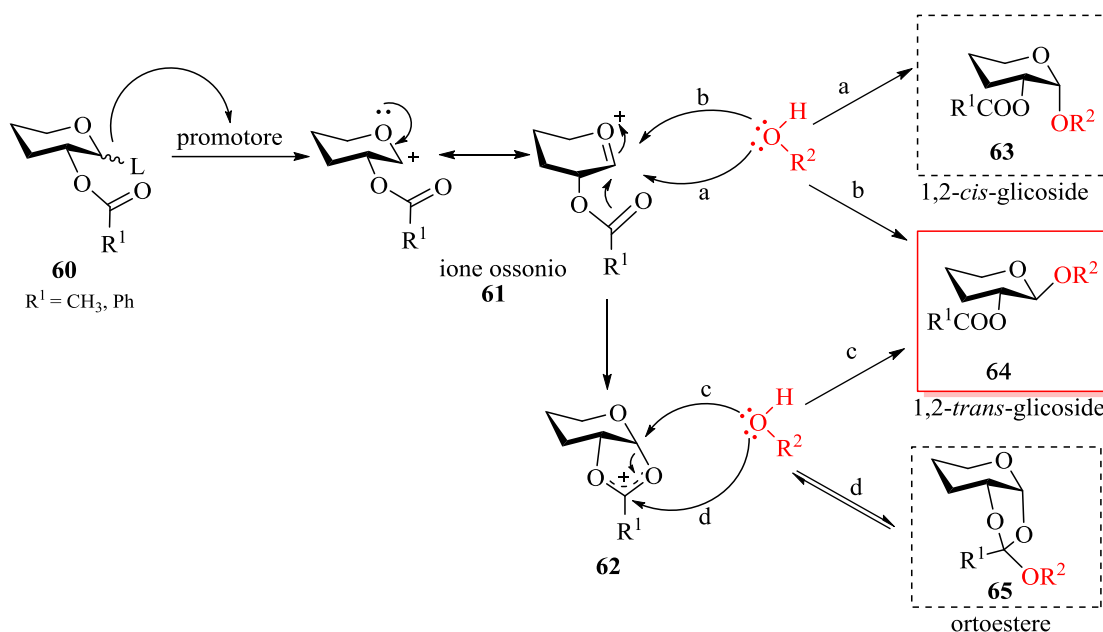
### 2.2.2 – Glicosilazioni: meccanismo e aspetti stereochimici

I meccanismi di glicosilazione sono spesso complessi e particolari, tuttavia è possibile delineare le caratteristiche generali di tali reazioni distinguendo il caso in cui in posizione C-2 è presente un gruppo partecipante da quello in cui in posizione C-2 è presente un gruppo non partecipante.

Nel caso in cui è presente in C-2 il gruppo partecipante (*Schema 2.6*), il promotore agisce sul substrato di tipo **60** favorendo l'uscita del gruppo attivante e generando lo ione ossonio **61**, stabilizzato per risonanza. Il nucleofilo R<sup>2</sup>OH potrebbe teoricamente attaccare **61** sia sulla faccia  $\alpha$  (*percorso a*) che sulla faccia  $\beta$  (*percorso b*) per dare rispettivamente l'1,2-*cis*-glicoside **63** o l'1,2-*trans*-glicoside **64**.

Tuttavia in presenza di un gruppo partecipante come l'acetile sul carbonio C-2, si forma lo ione acilossonio **62** (R<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>) avente la faccia  $\alpha$  fortemente ingombra stericamente. Il nucleofilo, attacca quindi preferenzialmente la faccia  $\beta$  di **62**, con formazione del  $\beta$ -O-glicoside **64** con una relazione 1,2-*trans* (*percorso c*).<sup>42,45</sup>

Nelle reazioni di glicosilazione, il nucleofilo  $R^2OH$  può attaccare anche il carbonio elettrofilo dello ione acilossonio **62** (*percorso d*) con formazione dell'ortoestere **65** come sottoprodotto di reazione. La formazione dell'ortoestere non costituisce tuttavia un reale problema perché i promotori tradizionali rendono tale reazione reversibile.<sup>43</sup>

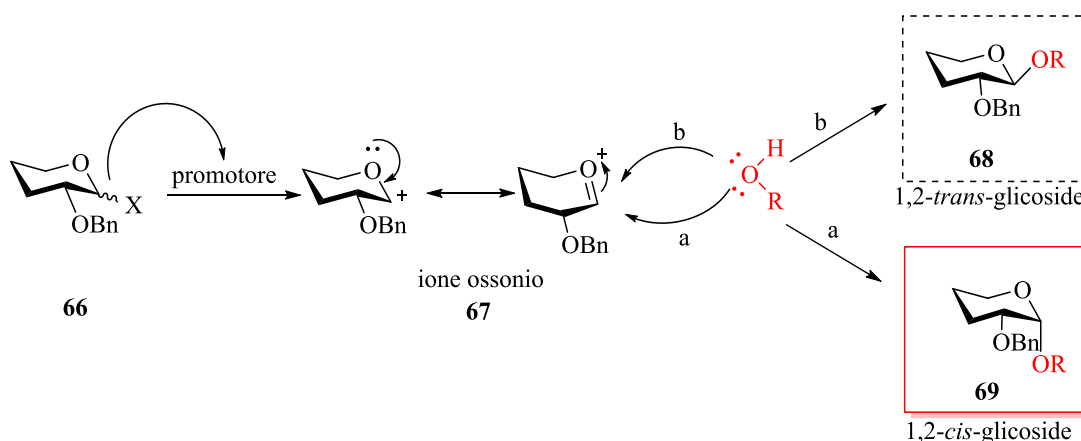


**Schema 2.6** – Glicosilazioni in presenza di un gruppo partecipante in C-2.<sup>42,45</sup>

D'altra parte, se sul carbonio C-2 è presente un gruppo non partecipante come quello benzilico (*Schema 2.7*), l'azione del promotore sul substrato **66** porta alla formazione dello ione ossonio **67**. Sullo ione ossonio **67**, l'attacco del nucleofilo ROH avviene preferenzialmente sulla faccia  $\alpha$  (*percorso a*) con formazione dell' $\alpha$ -O-glicoside **69** con una relazione 1,2-*cis*.

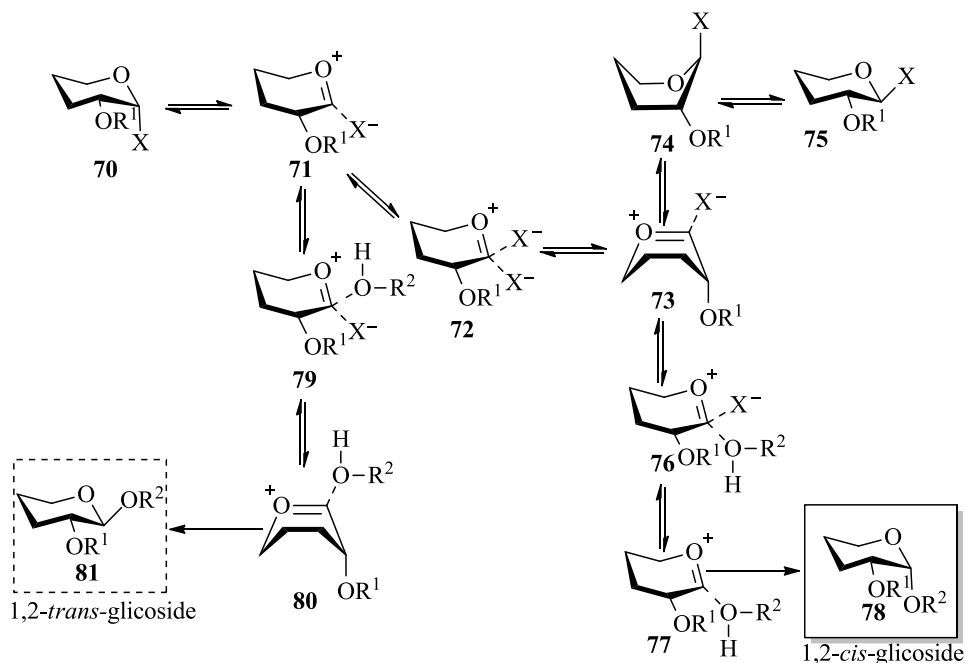
Il *percorso b*, che porta all'ottenimento del  $\beta$ -O-glicoside **68** con una relazione 1,2-*trans* risulta essere meno favorito.<sup>46</sup>





**Schema 2.7** – Glicosilazioni in presenza di un gruppo non partecipante in C-2.<sup>46</sup>

Per spiegare la formazione di 1,2-*cis*-glicosidi a partire da saccaridi aventi un gruppo non partecipante in posizione C-2, Lemieux e coll.<sup>47</sup> hanno ipotizzato un meccanismo relativo alle reazioni di alcolisi di bromuri anomerici con un gruppo etero in C-2. Come riportato nello *Schema 2.8*, partendo dal più stabile  $\alpha$ -glicosil alogenuro **70** in presenza di  $\text{Bu}_4\text{NBr}$  si instaura un equilibrio con il più reattivo  $\beta$ -glicosil alogenuro **75** attraverso gli intermedi **71**→**72**→**73**→**74**.

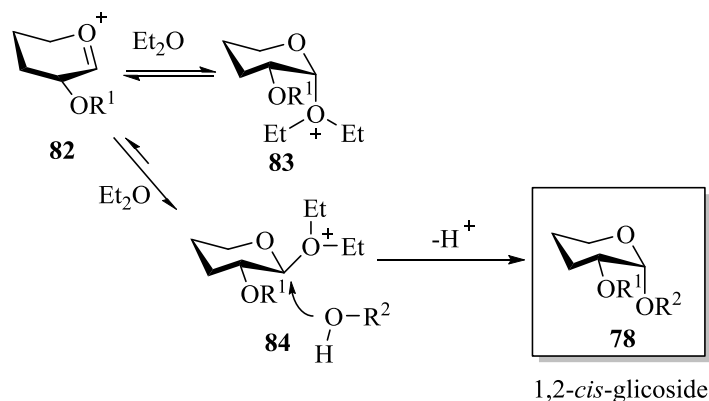


**Schema 2.8** – Glicosilazioni catalizzate da ioni alogenuro.<sup>42,46,47</sup>

La barriera energetica della sostituzione nucleofila del  $\beta$ -alogenuro **75** che conduce all' $\alpha$ -*O*-glicoside **78** con una relazione 1,2-*cis* (via **74**→**73**→**76**→**77**) è più bassa di quella relativa alla reazione che coinvolge l'alogenuro **70** e che conduce al  $\beta$ -*O*-glicoside **81** con una relazione 1,2-*trans* (via **71**→**79**→**80**).<sup>42,46,47</sup>

Anche il tipo di solvente impiegato può influenzare la stereoselettività delle reazioni di glicosilazione.<sup>48</sup> Generalmente si impiegano solventi anidri per evitare la competizione con l'acqua che potrebbe attaccare l'intermedio cationico. Solventi non coordinanti poco polari come toluene,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e 1,2-dicloroetano sono quelli generalmente più utilizzati in quanto non interferiscono con i meccanismi specifici che sono coinvolti di volta in volta.<sup>42,48</sup> Invece con l'uso di solventi coordinanti, la stereoselettività è influenzata dal diretto coinvolgimento del solvente nel meccanismo di reazione. I casi limite sono rappresentati da  $\text{Et}_2\text{O}$  e MeCN che favoriscono rispettivamente la formazione di 1,2-*cis* e 1,2-*trans*-glicosidi.<sup>42,48</sup>

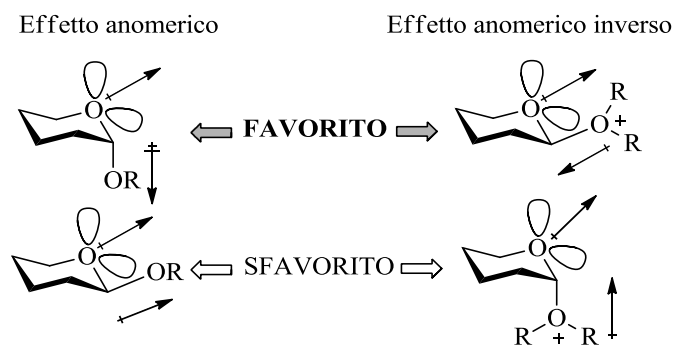
Utilizzando l'etere dietilico (*Schema 2.9*), lo ione ossonio **82** fornisce prevalentemente il  $\beta$ -addotto **84** più stabile di **83** a causa dell'effetto anomero inverso (*Figura 2.2*). L'intermedio **84** subisce poi attacco del nucleofilo  $\text{R}^2\text{OH}$  a dare l'1,2-*cis*-glicoside **78**.<sup>42,48</sup>



**Schema 2.9** –Glicosilazione in presenza di  $\text{Et}_2\text{O}$ .<sup>42,48</sup>

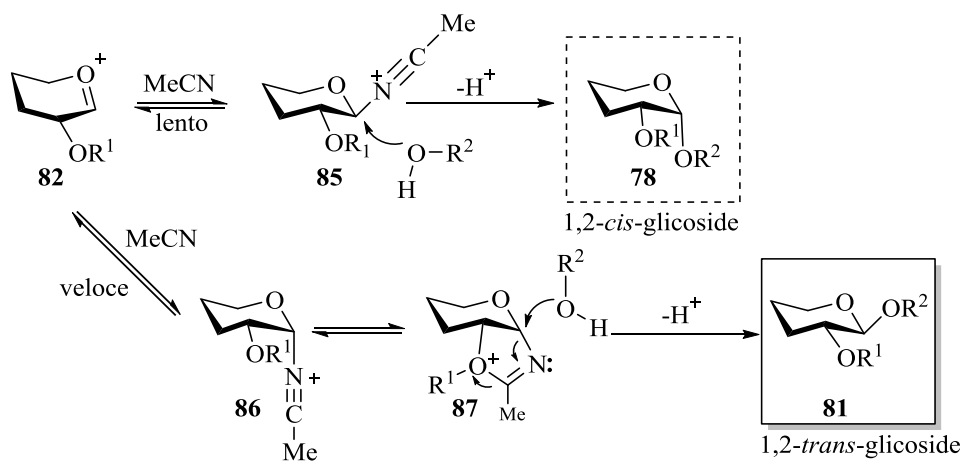
È necessario precisare che in un anello piranosidico, l'effetto anomero descrive la tendenza di un eteroatomo esociclico a preferire la posizione assiale rispetto all'equatoriale in quanto i due dipoli sono orientati in verso opposto (*Figura 2.2*).

Quando l'eteroatomo esociclico è in posizione assiale esiste inoltre un'iperconiugazione tra l'orbitale in cui si trova il doppietto elettronico e l'orbitale di antilegame del legame C-OR. Nell'effetto anomero inverso la presenza di una carica positiva sull'eteroatomo esociclico in posizione anomerica fa sì che i due dipoli siano opposti nel  $\beta$  addotto (più stabile dunque dell' $\alpha$  addotto).



**Figura 2.2**– Effetto anomero.

Utilizzando MeCN come solvente, la situazione è più complessa (Schema 2.10). Lo ione ossonio **82** è solvatato preferenzialmente sulla faccia  $\alpha$  a dare l'intermedio cinetico **86** in equilibrio con lo ione ossazolio **87**; a questo punto poiché la faccia  $\alpha$  del sistema è fortemente ingombra,  $R^2OH$  può attaccare solo la faccia  $\beta$  fornendo l'1,2-*trans*-glicoside **81**.<sup>42,45,48,49,50</sup> Tuttavia può realizzarsi anche la formazione dell'addotto **85**, più stabile termodinamicamente a causa dell'effetto anomero inverso. Il prodotto primario **85** può poi subire l'attacco nucleofilo di  $R^2OH$  a dare l'1,2-*cis*-glicoside **78**.<sup>42,48,49</sup>



**Schema 2.10** – Glicosilazione in presenza di MeCN.<sup>42,48,49</sup>

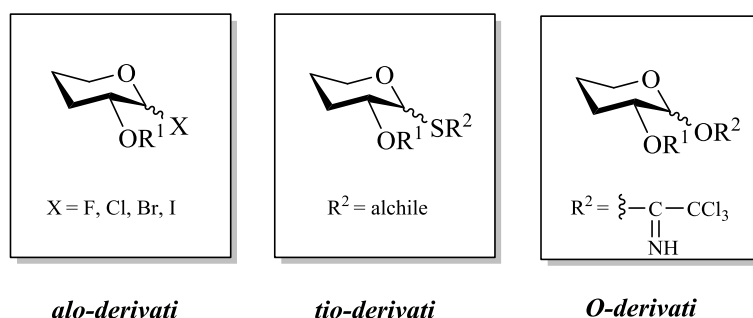
Queste considerazioni non hanno tuttavia una valenza generale in quanto la combinazione solvente/promotore nonché la presenza in posizione C-2 di un gruppo partecipante o meno giocano un ruolo fondamentale nello stereocontrollo anomero delle reazioni di glicosilazione.

### 2.2.3 – Caratteristiche dei glicosil donatori

I glicosil donatori possono essere caratterizzati sulla base del gruppo attivante presente sulla posizione anomero (*Figura 2.3*).<sup>42,51</sup> Più precisamente i glicosil donatori si suddividono fondamentalmente in:

- alo-derivati (bromuri, ioduri, cloruri e fluoruri);
- tio-derivati (tioglicosidi, solfossidi e solfoni);
- *O*-derivati (immidati, epossidi, fosfati e fosfiti).

A ciascuna di queste classi sono associati differenti promotori.



**Figura 2.3** – Glicosil donatori più comuni.<sup>42,51</sup>

I glicosil alogenuri (o alo-derivati) sono stati i primi glicosil donatori ad essere impiegati nelle reazioni di glicosilazione. Il metodo di Koenigs-Knorr<sup>52</sup> risalente al 1901 prevede infatti l'utilizzo di un alogenuro anomero (cloruro o bromuro) in presenza di sali di metalli pesanti [ $AgOTf$ ,  $Ag_2O$ ,  $Ag_2CO_3$ ,  $Hg(CN)_2$ ,  $HgBr_2$  e  $HgCl_2$ ] come promotori e di uno *scavenger* in grado di prevenire la formazione di acido alogenidrico. Oltre ai sali dei metalli pesanti, sono stati introdotti altri attivatori come acidi di Lewis [ $SnCl_4$ ,  $BF_3 \cdot Et_2O$ ,  $ZnCl_2$  e  $Sn(OTf)_2$ ] oppure sali di ammonio ( $Bu_4NBr$  e  $Et_4NBr$ ). Attualmente questi glicosil donatori sono meno utilizzati a causa della loro instabilità, dell'elevata sensibilità all'umidità e spesso della considerevole tossicità,

nonché costo, dei sistemi di attivazione.<sup>42,51</sup> Ad oggi i metodi di glicosilazione più comuni si basano sull'impiego di tioglicosidi e tricloroacetimmidati.

I tioglicosidi<sup>53</sup> sono certamente i glicosil donatori più versatili perché, essendo chimicamente stabili, possono essere conservati per lungo tempo e tollerano svariate manipolazioni chimiche senza che venga modificato il sostituente anomero. Inoltre sono precursori di altri glicosil donatori (alogenuri, tricloroacetimmidati ecc.) e sono attivabili utilizzando sali di mercurio [HgSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>, Hg(OAc)<sub>2</sub>], sali di palladio come Pd(ClO<sub>4</sub>), miscele di rame ed argento (CuBr<sub>2</sub>-Bu<sub>4</sub>NBr-AgOTf) e derivati del selenio (PhSeOTf). A partire dagli anni '80 sono stati introdotti anche altri attivanti non metallici come MeOTf, NBS (*N*-bromosuccinimide), IDCP (iodonio dicollidina perclorato) e DMTST (dimetil-(metiltio)-solfoniotriflato). Per aumentare l'efficienza dell'attivazione spesso si usa il sistema composto da NIS (*N*-iodosuccinimide) stechiometrico e quantità catalitiche di TfOH, TMSOTf, AgOTf o BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O.<sup>42,51</sup>

Per quanto riguarda gli *O*-derivati, i glicosil donatori più utilizzati sono i tricloroacetimmidati impiegati per la prima volta come glicosil donatori da Sinaÿ e coll.<sup>54</sup> e sistematicamente studiati da Schmidt.<sup>55</sup> Tali donatori sono relativamente stabili in condizioni basiche o neutre, ma reagiscono velocemente in condizioni acide e possono essere attivati con acidi di Lewis quali BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O e TMSOTf in quantità catalitiche.<sup>42,51</sup> Essendo sistemi sensibili all'umidità, obbligano ad una notevole cautela sia nel loro uso che nella loro conservazione.

Nonostante questo, tra tutti i glicosil donatori, i tricloroacetimmidati risultano i sistemi maggiormente reattivi e questo giustifica il loro ampio utilizzo nelle reazioni di glicosilazione.

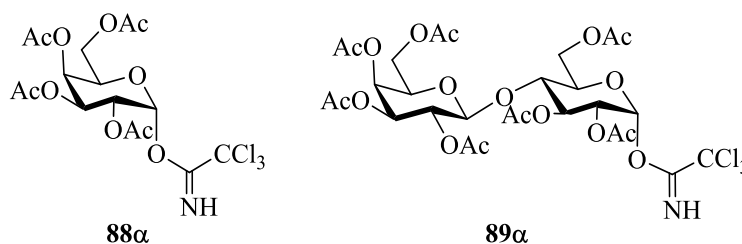
Sulla base di queste considerazioni, nella strategia sintetica adottata nel presente lavoro di tesi sono stati scelti i tricloroacetimmidati come glicosil donatori.

#### 2.2.4 – Sintesi dei glicosil donatori galattosidico **88a** e lattosidico **89a**

Il primo obiettivo del presente lavoro di tesi ha riguardato la sintesi dei *target* saccaridici peracetilati **58a**, **58b** e **59b** (*Figura 2.1*) attraverso una reazione di glicosilazione che ha previsto l'impiego del glicosil accettore **25** (*Schema 2.1*) e dei

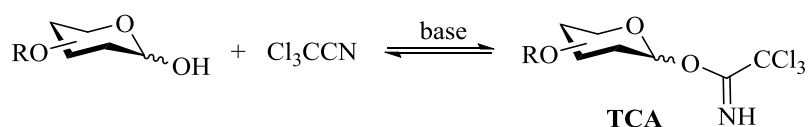
tricloroacetimmidati (TCA) di tipo galattosidico **88 $\alpha$**  e lattosidico **89 $\alpha$**  (Figura 2.4) come glicosil donatori.

È necessario precisare che il gruppo tricloroacetimmidato, essendo molto labile, non permette nessuna manipolazione dei gruppi protettori presenti sulle altre funzionalità ossidriliche del saccaride. Per questo motivo l'introduzione di tale gruppo rappresenta sempre l'ultimo stadio della sequenza sintetica.



**Figura 2.4** – Glicosil donatori **88 $\alpha$**  e **89 $\alpha$** .

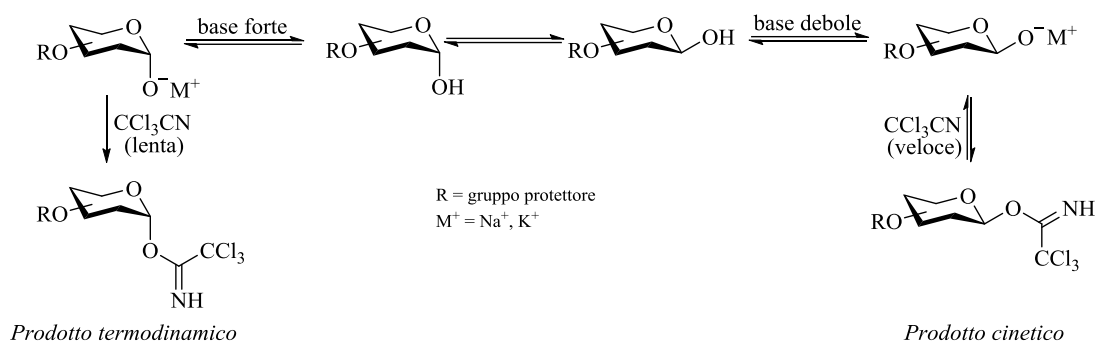
In generale i tricloroacetimmidati sono sistemi efficienti e facilmente sintetizzabili a partire dal corrispondente emiacetale in presenza di una base e di tricloroacetonitrile (Schema 2.11).<sup>42,51,56</sup>



**Schema 2.11**– Schema generale per la preparazione di tricloroacetimmidati.<sup>56</sup>

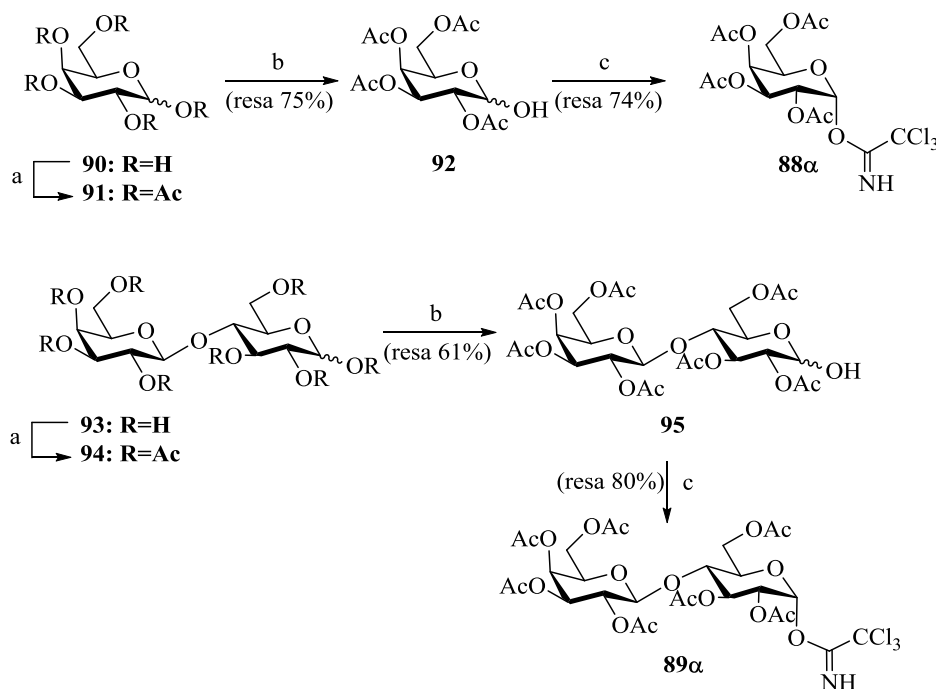
Data la reversibilità della reazione, è possibile ottenere un ottimo controllo della stereoselettività sul carbonio anomero.

Con una base debole come  $K_2CO_3$  si ottiene preferenzialmente il tricloroacetimmidato  $\beta$  (prodotto cinetico) mentre utilizzando una base forte come NaH o DBU si ottiene il tricloroacetimmidato  $\alpha$ , che rappresenta il prodotto termodinamico (Schema 2.12).<sup>57</sup>



**Schema 2.12** - Controllo cinetico e termodinamico nella formazione di trichloroacetimidati.<sup>57</sup>

Sulla base di queste considerazioni, sono stati preparati i trichloroacetimidati mono e disaccaridici **88a** e **89a** a partire, rispettivamente, dal peracetilgalattosio **91**<sup>58,59</sup> e dal peracetillattosio **94** (Schema 2.13), facilmente ottenibili per acetilazione convenzionale (Ac<sub>2</sub>O-piridina) del D-galattosio (**90**) e del D-lattosio (**93**) commerciali.



**Schema 2.13** – Reagenti e condizioni: a) Ac<sub>2</sub>O-piridina 1:2 t.a.; b) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·AcOH, DMF 60°C; c) CCl<sub>3</sub>CN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DBU 0°C t.a.

Il gruppo acetilico in posizione anomeroica è più labile degli altri gruppi acetilici presenti sulle struttura saccaridica e può essere rimosso selettivamente in ambiente debolmente basico. In particolare, il trattamento di **91** e **94** con idrazina acetato

(NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·AcOH) in DMF a riflusso ha fornito i corrispondenti emiacetali **92** (resa 75%) e **95** (resa 61%) che, all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR, si presentano come miscele di anomeri α e β (**92** con rapporto 4:1; **95** con rapporto 75:25, calcolato sulla base delle altezze relative ai segnali C-1 a δ 89.9/89.6 e 95.1/94.7 rispettivamente). I parametri spettroscopici sono in accordo con i dati di letteratura.<sup>60,61,62</sup>

Gli emiacetali **92** e **95** sono stati quindi trattati con CCl<sub>3</sub>CN in presenza di quantità catalitiche di DBU (0.05 eq) e, dopo scomparsa dei prodotti di partenza (2-9 ore), la purificazione *flash*-cromatografica dei grezzi di reazione ha fornito i corrispondenti tricloroacetimmidati **88α** (resa 74%) e **89α** (resa 80%) in accordo con quanto aspettato.

I parametri spettroscopici dei tricloroacetimmidati **88α** e **89α** sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>63,64</sup> In particolare, nel caso del derivato monosaccaridico **88α**, la presenza del gruppo tricloroacetimmidico in posizione anomericα è confermata, nello spettro <sup>13</sup>C NMR, dalla presenza di due segnali a δ 160.8 e 90.7, attribuibili rispettivamente al C=N e al carbonio quaternario triclorurato (CCl<sub>3</sub>). Particolarmente indicativo, ai fini della determinazione della configurazione del legame glicosidico, è il basso valore della costante di accoppiamento (*J*<sub>1,2</sub> 3.2 Hz), che indica un assetto equatoriale-assiale dei protoni H-1 e H-2.

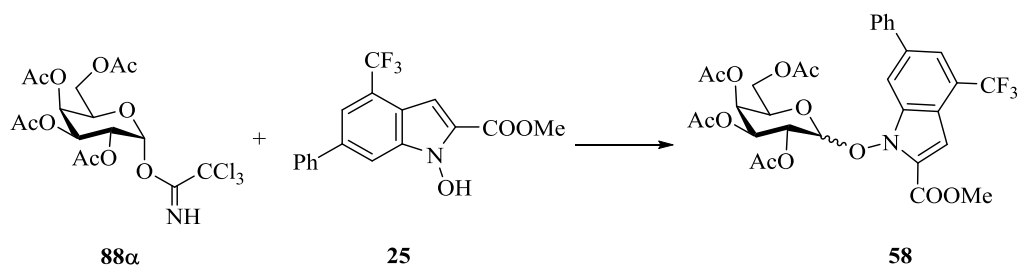
### 2.2.5 – Sintesi dei glicoconiugati **58α**, **58β** e **59β**

Dopo aver preparato il glicosil accettore **25** e i glicosil donatori **88α** e **89α**, è stata effettuata la sintesi dei glicoconiugati protetti **58α**, **58β** e **59β** (*Figura 2.1*) mediante una reazione di glicosilazione. Impiegando come glicosil donatore il 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-galattopiranosil tricloroacetimmidato (**88α**) e come glicosil accettore il derivato *N*-idrossiindolico **25** è stata effettuata la reazione in diverse condizioni (*Metodo A, B, C*) variando il promotore e/o il solvente (*Schema 2.14*), con l'obiettivo di valutare l'influenza delle condizioni di reazione sulla stereochimica del carbonio anomericα del nuovo glicoconiugato **58**.

In tutte e tre le prove di glicosilazione, il rapporto stechiometrico tra l'accettore e il donatore è di 1/1.3-1.5 equivalenti e l'anidricità dell'ambiente è stata garantita, oltre che dall'impiego solventi anidri, dalla presenza di setacci molecolari AW 300 attivati e dall'eliminazione di tracce di acqua presenti nell'accettore e/o nel donatore mediante



formazione di un azeotropo di minimo tra acqua e toluene e successiva evaporazione della soluzione alla pompa meccanica munita di una trappola raffreddata.



**Schema 2.14** – Reagenti e condizioni: *Metodo A* – TMSOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, setacci molecolari AW 300 0°C (30 min) poi t.a. (4 h). *Metodo B* – TMSOTf, MeCN, setacci molecolari AW 300 0°C (30 min) poi t.a. (3 h). *Metodo C* – CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, setacci molecolari AW 300 0°C (30 min) poi BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, -30°C → t.a. (2 h).

Le quantità di promotore TMSOTf o BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, aggiunto in soluzione di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro (1:10 v/v), sono pari a 0.2 e 1.3 equivalenti rispettivamente.

Tutte le reazioni sono state monitorate mediante analisi TLC e il trattamento della miscela di reazione è stato effettuato dopo aver verificato la scomparsa del glicosil accettore *N*-idrossiindolico **25**, utilizzato in difetto.

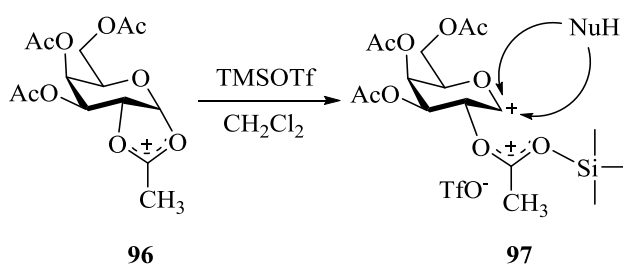
I prodotti di reazione sono stati purificati mediante *flash*-cromatografia su gel di silice, isolati e caratterizzati.

Nella *Tabella 2.1* sono riportati tutti i risultati ottenuti.

**Tabella 2.1** – Condizioni di reazione per la sintesi di **58**.

|                 | Promotore                          | Solvente                        | <br><b>58α</b> <b>58β</b> | Resa % |
|-----------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|--------|
| <i>Metodo A</i> | TMSOTf                             | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 44 : 66                   | 39%    |
| <i>Metodo B</i> | TMSOTf                             | MeCN                            | 78 : 22                   | 41%    |
| <i>Metodo C</i> | BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 5 : 95                    | 60%    |

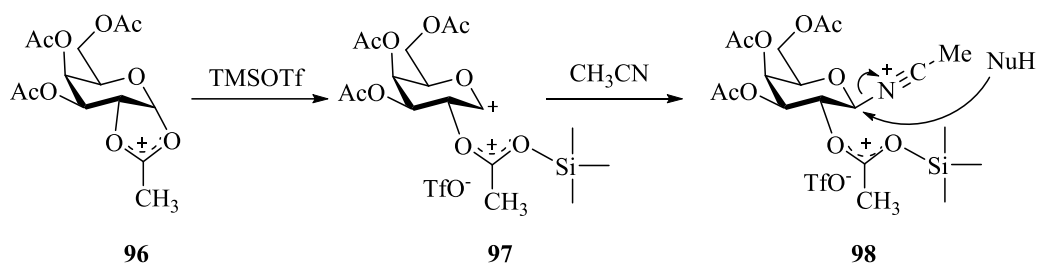
Impiegando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  come solvente non coordinante e TMSOTf come acido di Lewis per promuovere la glicosilazione (*Metodo A*), la reazione del tricloroacetimidato **88a** con il nucleofilo **25** ha fornito una miscela 44:66 di glicosidi **58a** e **58b** rispettivamente. In maniera piuttosto inaspettata quindi, il processo di glicosilazione non è risultato stereoselettivo. In queste condizioni infatti è presumibile che il gruppo partecipante in C-2 favorisca la formazione dello ione acilossonio **96** (*Schema 2.15*). Tuttavia la coordinazione con l'acido di Lewis TMSOTf è sufficientemente forte da determinare una pressoché completa rottura del legame fra il carbonio anomero e l'ossigeno dell'acilossonio con formazione del carbocatione **97**. Il nucleofilo **25** può quindi attaccare la specie **97** sia sulla faccia  $\alpha$  che sulla faccia  $\beta$ , determinando una perdita di stereoselettività nel processo di glicosilazione. L'uso dell'acido di Lewis è del resto necessario in considerazione della scarsa reattività del nucleofilo *N*-idrossiindolico **25**.



**Schema 2.15** – Azione di TMSOTf sullo ione acilossonio **96** in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

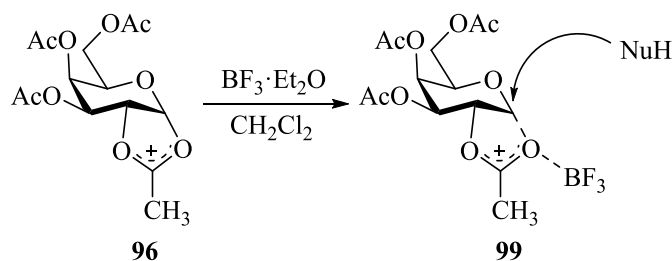
Utilizzando ancora TMSOTf come acido di Lewis ma MeCN come solvente (*Metodo B*), la glicosilazione è avvenuta con elevato grado di  $\alpha$  stereoselettività (*Schema 2.16*).

Presumibilmente in queste condizioni si forma nuovamente la specie carbocationica **97** ma, questa volta, tale specie subisce un'iniziale solvatazione da parte del solvente coordinante MeCN a dare l'addotto termodinamicamente stabile **98**. Successivamente l'attacco nucleofilo da parte dell'*N*-idrossiindolo **25** sull'addotto **98** avviene preferenzialmente dalla faccia  $\alpha$ , più libera, a dare un rapporto **58a/58b** 78:22.



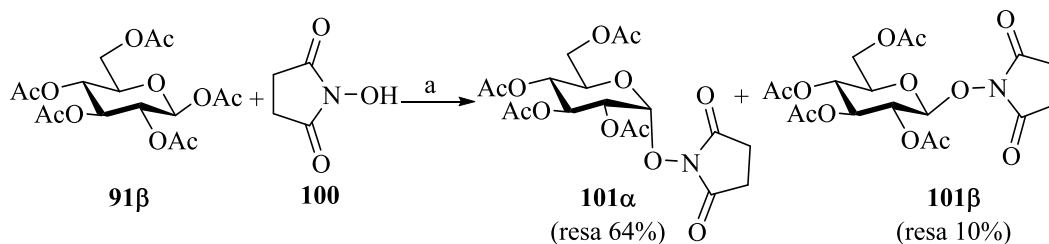
**Schema 2.16** – Azione di TMSOTf sullo ione acilossonio **96** e azione di MeCN sull'intermedio **97**.

Infine l'uso di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  come solvente e di  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  come acido di Lewis (*Metodo C*) determina solo un allentamento del legame carbonio anomero/ossigeno nello ione acilossonio **96**, tale da favorire l'attacco del nucleofilo **25** preferenzialmente dalla faccia  $\beta$  (*Schema 2.17*). È stato così osservato, come teoricamente previsto in relazione alla presenza del gruppo partecipante in C-2, un'elevata  $\beta$  stereoselettività del processo con formazione dei glicosidi **58 $\alpha$**  e **58 $\beta$**  in rapporto 5:95.



**Schema 2.17** - Azione di  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  sullo ione acilossonio **96** in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

I dati sperimentali ottenuti sono in accordo con quanto riportato in letteratura relativamente alla reazione di glicosilazione tra l'1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranoside (**91 $\beta$** ) e l'*N*-idrossisuccinimide (**100**) condotta in  $\text{MeNO}_2$  (solvente analogo a MeCN) e TMSOTf, quale promotore acido, che fornisce i glicosidi **101 $\alpha$**  e **101 $\beta$**  in rapporto 6:1 (*Schema 2.18*).<sup>65</sup>



**Schema 2.18** –Reagenti e condizioni: a)  $\text{MeNO}_2$ , setacci molecolari  $4\text{\AA}$ , t.a. (30 min) poi TMSOTf,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$  (24 h).

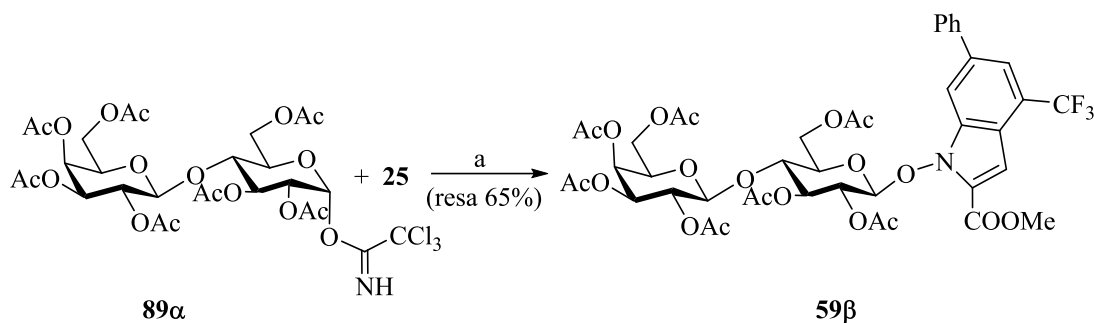
I glicoconjugati **58 $\alpha$**  e **58 $\beta$** , non riportati in letteratura, sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico e i dati  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono in accordo con le strutture proposte.

Generalmente, gli spettri  $^1\text{H}$  NMR di derivati saccaridici, pur permettendo un'immediata identificazione dei sostituenti (PhCOO, CH<sub>3</sub>CON, CH<sub>3</sub>COO, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, NHAc, e OMe), presentano delle difficoltà quando si vuol effettuare un'interpretazione completa dei segnali protonici glicosidici. Infatti tali segnali risuonano tutti in una zona molto ristretta dello spettro (5.3-3.4 ppm). È possibile ottenere una buona risoluzione degli spettri impiegando solventi a bassa viscosità come il CD<sub>3</sub>CN, abbinato all'uso di tecniche bidimensionali (DEPT-135, COSY, HSQC). In questo modo è possibile assegnare inequivocabilmente sia la struttura che la configurazione anomerica dei derivati saccaridici. I segnali dei protoni anomerici, per la loro semplice struttura (doppietto) e per il loro valore di *chemical shift* ( $\delta$  5.0-4.4), più deschermati degli altri protoni piranosici, costituiscono il punto di partenza per l'interpretazione completa di uno spettro di un derivato saccaridico.

Negli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR dei derivati **58 $\alpha$**  e **58 $\beta$** , la presenza di segnali caratteristici dell'aglicone indolico conferma l'avvenuta glicosilazione. Particolarmente indicativo, ai fini della determinazione della configurazione del legame glicosidico, è il valore della costante di accoppiamento fra i protoni H-1 e H-2 che nel composto **58 $\beta$**  risulta elevata ( $J_{1,2} = 8.1$  Hz) e indica un assetto assiale-assiale, mentre ha un valore più basso ( $J_{1,2} = 4.0$  Hz) nel caso dell'anomero **58 $\alpha$** , in accordo con un assetto equatoriale-assiale dei protoni H-1 e H-2. Negli spettri  $^{13}\text{C}$  NMR dei derivati **58 $\alpha$**  e **58 $\beta$** , particolarmente significativi sono i segnali relativi al C-1 (**58 $\beta$** :  $\delta$  106.2; **58 $\alpha$** :  $\delta$  104.4) che risultano deschermati di circa 11-13 ppm rispetto al corrispondente segnale del glicosil donatore **88 $\alpha$**  ( $\delta$  93.4) per la presenza dell'aglicone in tale posizione. Inoltre il segnale del carbonio anomerico del derivato **58 $\beta$**  risulta più deschermato ( $\delta$  106.2) del corrispondente segnale dell'anomero **58 $\alpha$**  ( $\delta$  104.4) in accordo con quanto osservato nei dati spettroscopici relativi agli anomeri saccaridici.

Sulla base dei risultati ottenuti nella reazione glicosilazione tra il tricloroacetimidato **88 $\alpha$**  e il derivato *N*-idrossiindolico **25**, è stata effettuata la sintesi del glicoconjugato disaccaridico **59 $\beta$**  (*Schema 2.19*). Il glicosil accettore **25** è stato

sottoposto a  $\beta$ -lattosidazione con il tricloroacetimidato disaccaridico **89 $\alpha$**  (1.5 eq) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro, in presenza di  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0.5 eq) come promotore acido, setacci molecolari attivati (AW-300) e conducendo la reazione a temperatura ambiente. Dopo trattamento della miscela di reazione e purificazione *flash*-cromatografica del grezzo è stato isolato, come unico prodotto, il glicoconjugato protetto **59 $\beta$**  (resa 65%) chimicamente puro all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.



**Schema 2.19** - Reagenti e condizioni: *Metodo C* –  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , setacci molecolari AW 300, t.a. (1 h) poi  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$   $-30^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$  (2 h).

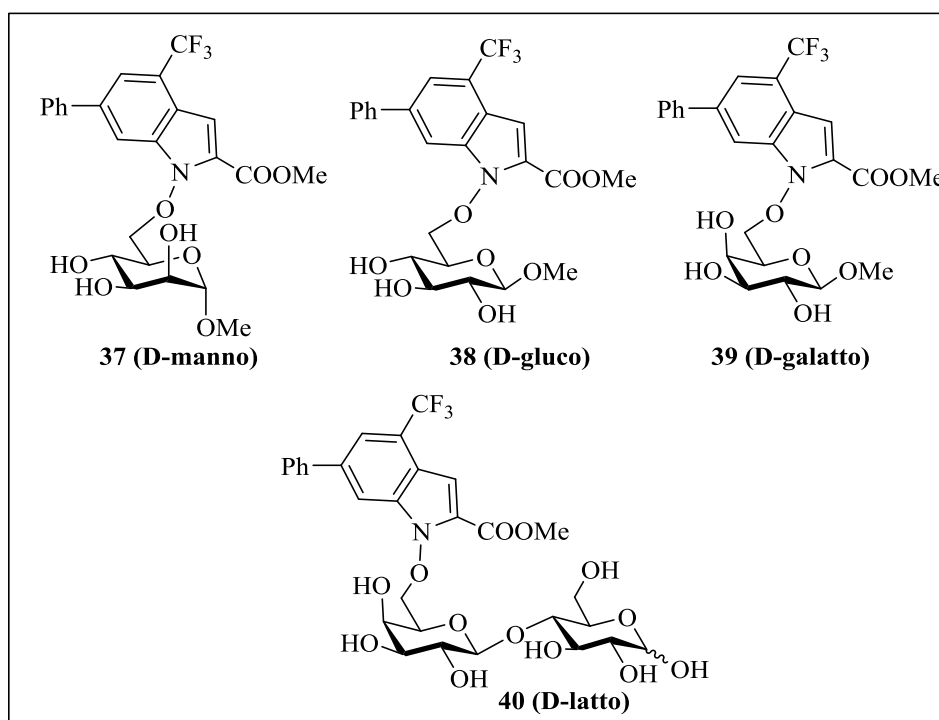
Il disaccaride **59 $\beta$** , non noto in letteratura, è stato completamente caratterizzato dal punto di vista chimico-fisico e i dati  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono in accordo con la struttura proposta. In particolare nello spettro  $^{13}\text{C}$  NMR, oltre alla presenza dei segnali caratteristici dell'aglicone indolico, particolarmente significativo è il segnale relativo al C-1 ( $\delta$  105.6) che risulta deschermato di circa 13 ppm rispetto al corrispondente segnale del glicosil donatore ( $\delta$  92.6) per la presenza dell'aglicone in tale posizione. Particolarmente indicativo, ai fini della determinazione della  $\beta$ -stereoselettività della reazione di glicosidazione, è l'alto valore della costante di accoppiamento ( $J_{1,2}$  8.0 Hz) che indica un assetto assiale-assiale dei protoni H-1 e H-2.

### 2.3 – Sintesi di glicoconjugati in posizione C-6

Il secondo obiettivo del presente lavoro di tesi è stata la sintesi di nuovi glicoconjugati aventi l'unità *N*-idrossiindolica legata su una posizione diversa da quella anomérica. È stata scelta la posizione C-6 di derivati mono- e disaccaridici in quanto più facilmente accessibile ed avente un gruppo ossidrilico primario, più reattivo dei secondari presenti nelle altre posizioni della molecola.

A tal scopo è stata progettata la sintesi dei glicocongiugati monosaccaridici **37**, **38** e **39** rispettivamente della serie  $\alpha$ -D-manno,  $\beta$ -D-gluco e  $\beta$ -D-galatto e del disaccaride lattosidico **40**, completamente deprotetti (*Figura 2.5*).

La sintesi dei derivati **37**, **38**, **39** e **40** ha permesso di ottenere utili informazioni sulla dipendenza dell'attività biologica dalla diversa locazione dell'unità farmacoforica nei diversi glicocongiugati.



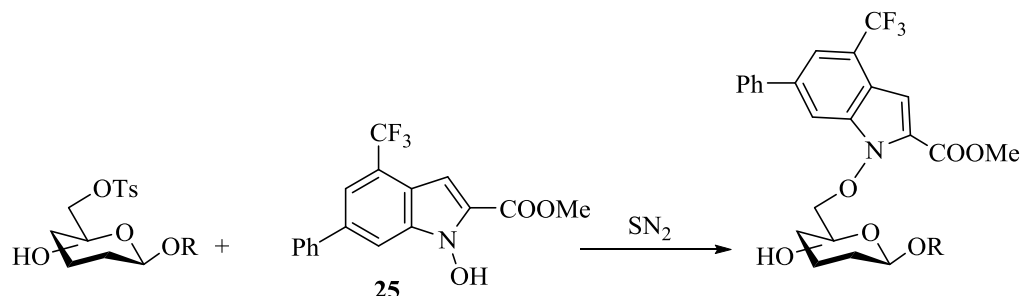
**Figura 2.5** – Obiettivi sintetici.

### 2.3.1 – Sintesi di glicocongiugati a partire da 6-*O*-tosil derivati

Il primo approccio sintetico adottato per la sintesi di glicocongiugati portanti l'unità *N*-idrossiindolica in posizione C-6 è rappresentato da una classica reazione  $S_N2$  coinvolgente la specie nucleofila NHI **25** ed un saccaride avente un solfonato come gruppo uscente (*Schema 2.20*).

Tra i vari gruppi potenzialmente impiegabili, è stato scelto il tosile in considerazione del fatto che il gruppo cromoforo fenilico, essendo visibile all'UV, permette di monitorare più facilmente le reazioni mediante analisi TLC. Inoltre, l'elevato ingombro sterico di tale gruppo favorisce la reazione di tosilazione

regioselettivamente sulla posizione C-6 di un alchil glicoside avente tutte le funzioni alcoliche libere.<sup>66</sup>



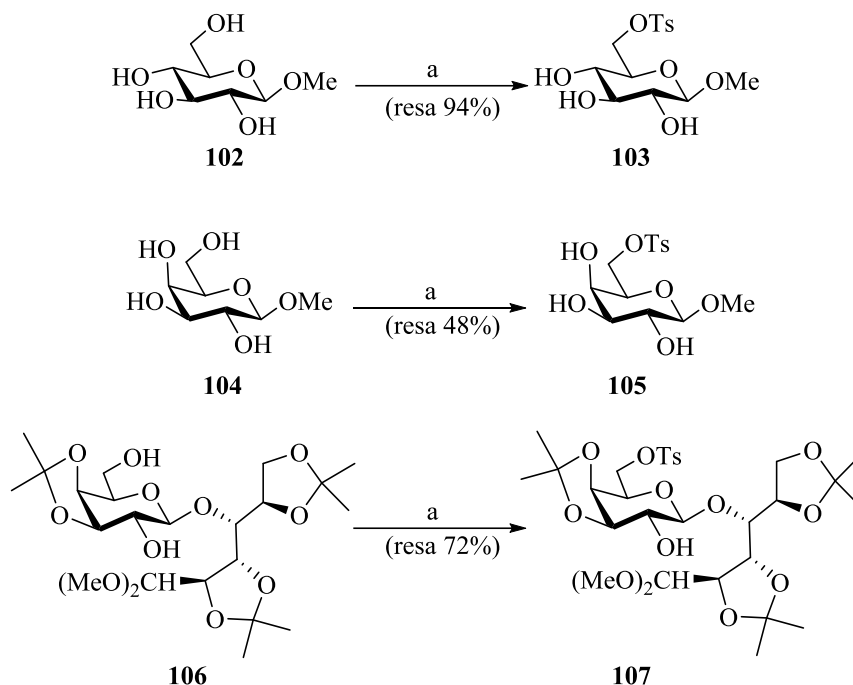
**Schema 2.20** – Schema generale della reazione di  $S_N2$  con tosilato come gruppo uscente.

È noto infatti che in questi tipi di substrati vi sono due tipi di ossidrili: quello primario sul C-6 e i tre secondari su C-2, C-3 e C-4 che differiscono per la loro nucleofilicità. In particolare, il gruppo alcolico primario è più reattivo di quelli secondari e può essere funzionalizzato regioselectivamente con un gruppo protettore molto ingombrante come *t*-butildimetilsilile (TBDMS), trifenilmetile (o tritile, Trt), pivaloile (Piv), tosile (Ts) ecc. Nel caso di gruppi alcolici secondari, generalmente la loro distinzione dipende dalla loro configurazione: quelli equatoriali tendono a reagire più velocemente di quelli assiali per motivi sterici. A parità di disposizione non è possibile fare altre generalizzazioni, anche se è noto, ad esempio, che negli alchilglucosidi, l'ossidrile equatoriale sul C-2 è il più reattivo mentre quello sul C-4 è il meno reattivo.

### 2.3.1.1 – Preparazione dei 6-*O*-tosil derivati **103**, **105** e **107**

I derivati 6-*O*-tosilici **103**, **105** e **107** rappresentano degli ottimi precursori per la realizzazione di reazioni  $S_N2$  con la specie nucleofila NHI **25** in quanto permettono, nel caso ad esempio di **103** e **105**, di ottenere in maniera diretta i glicoconjugati *target* **38** e **39**, completamente deprotetti sull'unità saccaridica. I precursori 6-*O*-tosilici sono stati preparati attraverso una reazione di solfonilazione diretta di derivati saccaridici come mostrato nello *Schema 2.21*. In particolare la preparazione dei 6-*O*-tosil derivati monosaccaridici **103** e **105** è stata effettuata in maniera analoga a quanto riportato in

letteratura<sup>67,68</sup> a partire, rispettivamente, dal metil  $\beta$ -D-glucopiranoside (**102**) e dal metil  $\beta$ -D-galattopiranoside (**104**), entrambi commerciali.



**Schema 2.21** – Reagenti e condizioni: a) *p*-TsCl, piridina-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1 0°C.

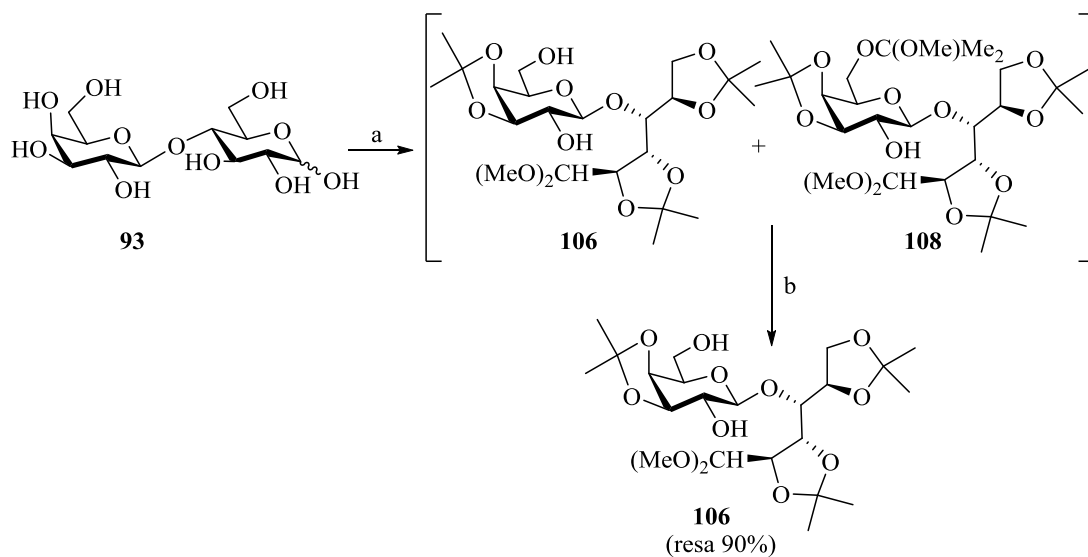
Le reazioni sono state condotte con un eccesso di cloruro di tosile (*p*-TsCl, 1.7 eq) in soluzione diclorometanica ed in presenza di piridina come base, necessaria a neutralizzare l'acido cloridrico formatosi *in situ*. Dopo 8-23 ore a temperatura ambiente, l'analisi TLC ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza e la formazione di un unico prodotto a R<sub>f</sub> maggiore, visibile all'UV. Il trattamento delle reazioni e la successiva purificazione *flash*-cromatografica dei grezzi ha permesso di ottenere i derivati **103** (resa 94%) e **105** (resa 48%) che presentano dati analitici e spettroscopici in accordo con quelli riportati in letteratura. In particolare la presenza del gruppo tosilico negli spettri protonici di **103** e **105** è confermata da due multipletti a  $\delta$  7.80 e 7.44-7.42, integranti ciascuno per due protoni, attribuibili ai quattro protoni aromatici e da un singoletto a  $\delta$  2.45-2.40, integrante per tre protoni e attribuibile al metile legato all'anello aromatico. È possibile inoltre stabilire che l'introduzione del gruppo tosilico è avvenuta in posizione C-6 e non sulle posizioni secondarie del saccaride, in quanto i protoni H-6a e H-6b risultano deschermati di 0.8-1.1 ppm. Gli



spettri  $^{13}\text{C}$  NMR, anch'essi concordi con le strutture, presentano 4 segnali tra  $\delta$  131.1 e 129.0, attribuibili ai 4 CH aromatici e tre segnali a  $\delta$  144.5/145.6, 133.9/134.2 e 21.6 attribuibili rispettivamente ai due carboni quaternari aromatici e al metile del gruppo tosilico.<sup>67,68</sup>

Nel caso della sintesi del 6'-*O*-tosil derivato disaccaridico **107** è stata necessaria la preliminare preparazione, a partire dal D-lattosio (**93**) commerciale, del precursore triacetone lattosio **106** (Schema 2.22) dove l'unità galattopiranosidica è protetta in 3,4 con un acetale isopropilidenico e l'unità riducente di D-glucosio è bloccata nella struttura aciclica dimetil acetaleica portante due acetoni sui gruppi diolici 2,3 e 5,6.

Il composto **106** è stato preparato per acetoneazione del D-lattosio (**93**) secondo la metodica riportata da Catelani e coll.<sup>69</sup> (Schema 2.22). In particolare il D-lattosio (**93**) è stato trattato con 2,2-dimetossipropano, alla temperatura di 80°C ed in presenza di *p*-TsOH come catalizzatore acido. La miscela di reazione è stata successivamente neutralizzata con Et<sub>3</sub>N e sottoposta ad un'accurata evaporazione del solvente e dell'eccesso di ammina a pressione ridotta. Il grezzo di reazione, costituito da una miscela di prodotti **106** e **108**, è stato convertito nell'unico poliacetone **106** in presenza di quantità catalitiche di Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>TsO<sup>-</sup> formatosi nell'ambiente di reazione e di una miscela MeOH-acqua 10:1. Il derivato **106** è stato isolato con una resa del 90% e presenta parametri spettroscopici in accordo con quelli riportati in letteratura.<sup>69</sup>



**Schema 2.22** - Reagenti e condizioni: a) *p*-TsOH cat., DMP 80°C (3 h) poi Et<sub>3</sub>N t.a. (10 min); b) MeOH-acqua 10:1 80°C (2 h).

Come si può osservare dall'analisi delle strutture dei due poliacetonuri **106** e **108**, l'unità galattopiranosidica del lattosio è protetta in posizione C-3 e C-4 con un acetale isopropilidenico. Il metanolo che si sviluppa nella transacetilazione è responsabile poi dell'apertura del ciclo piranosico dell'unità riducente di D-glucosio, bloccandolo nella struttura aciclica dimetil acetale, portante due acetonuri sui gruppi diolici 2,3 e 5,6. Il forte eccesso di DMP promuove la formazione dell'acetale misto aciclico metossiisopropilico (MIP) sul gruppo alcolico primario OH-6' di **106** portando al derivato **108**. Il tetracetonuro del lattosio **108** presenta due tipologie di gruppi protettori ortogonali tra loro di cui il gruppo 2-metossiisopropilico (MIP) è molto più labile in ambiente acido dei gruppi isopropilidenici e può essere quindi idrolizzato in condizioni in cui tali gruppi sono perfettamente stabili.

Le condizioni debolmente acide ( $\text{Et}_3\text{NH}^+\text{TsO}^-$  in MeOH-acqua 10:1) sono infatti sufficienti per idrolizzare selettivamente il gruppo 2-metossiisopropilico (MIP) in posizione C-6' di **108**.

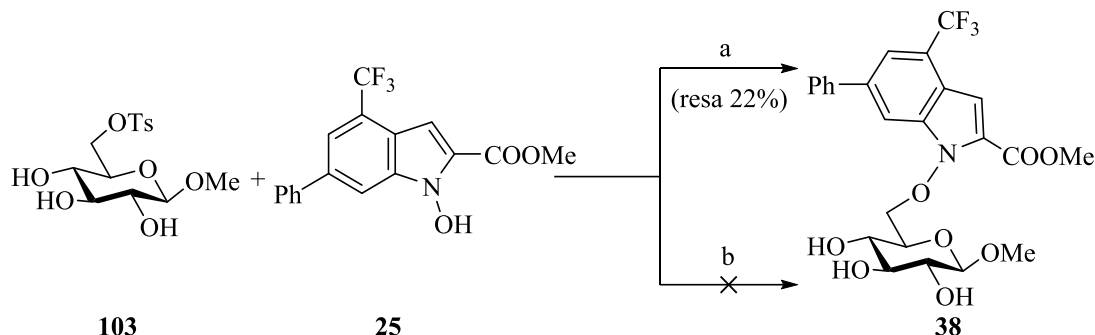
La successiva reazione di tosilazione del triacetone lattosio **106**, condotta nelle stesse condizioni descritte nella preparazione di **103** e **105**, ha fornito il 6'-O-tosil derivato disaccaridico **107** (resa 72%), che presenta dati analitici e spettroscopici in accordo con quelli riportati in letteratura.<sup>70</sup>

### 2.3.1.2 – Reazione $\text{S}_{\text{N}}2$ tra i 6-O-tosil derivati e il nucleofilo NHI **25**

Dopo aver preparato i saccaridi **103**, **105** e **107**, opportunamente funzionalizzati in posizione C-6, lo *step* successivo è stato quello di effettuare la sostituzione nucleofila  $\text{S}_{\text{N}}2$  con il nucleofilo *N*-idrossiindolico **25**.

Impiegando il derivato glucopiranosidico **103** (*Schema 2.23*) sono state effettuate due prove. Nella prova 1 (*percorso a*), il nucleofilo **25** (1.0 eq) è stato solubilizzato in 0.65 mL di una soluzione 0.33 M di MeONa in DMF-MeOH 8:2 ed il sistema è stato mantenuto in agitazione per circa 2 ore al fine di favorire la formazione dell'anione, specie più nucleofila della corrispondente specie neutra. Successivamente è stato addizionato il tosil derivato **103** (1.0 eq) e, dopo 4 gg, neutralizzata la miscela di reazione, il grezzo ottenuto è stato purificato mediante TLC preparativa per dare il prodotto desiderato **38** con resa del 22%. Tuttavia il tempo di reazione molto elevato,

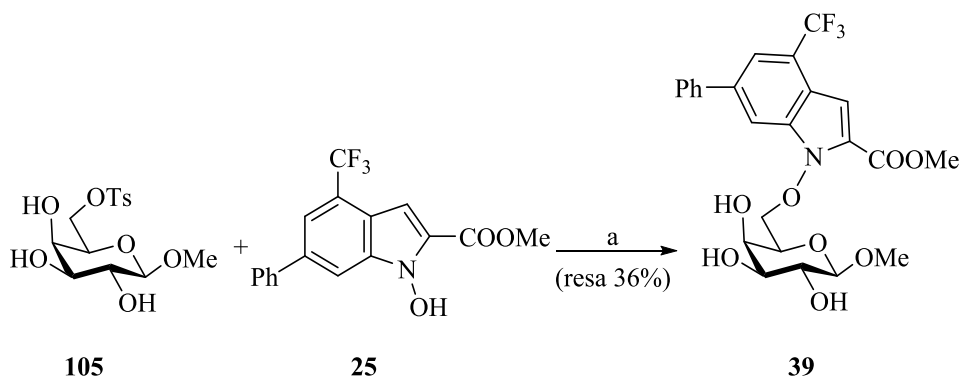
imputabile alla scarsa nucleofilicità di **25**, ha rappresentato un limite di questa metodica.



**Schema 2.23** – Reagenti e condizioni: a) soluzione 0.33 M di MeONa in DMF-MeOH 8:2 t.a. (4 gg); b) MeONa, DMF t.a. (23 h) poi 40°C (6.5 h).

Nella prova 2 (*percorso b*), la reazione di  $S_N2$  è stata effettuata utilizzando MeONa, solido commerciale (6.6 eq) in DMF a 40°C per 6 ore. In queste condizioni, tuttavia, è stata ottenuta una miscela complessa ( $^1H$  NMR) nella quale non è stata evidenziata la formazione del prodotto desiderato.

Anche il derivato galattopiranosidico **105** è stato sottoposto a reazione con **25**, in presenza del sale sodico MeONa (5.5 eq) in DMF (*Schema 2.24*). In questo caso il derivato **39** è stato ottenuto con resa del 36% dopo purificazione *flash*-cromatografica del grezzo. Il tempo di reazione anche in questo caso è risultato molto elevato e la resa insoddisfacente.

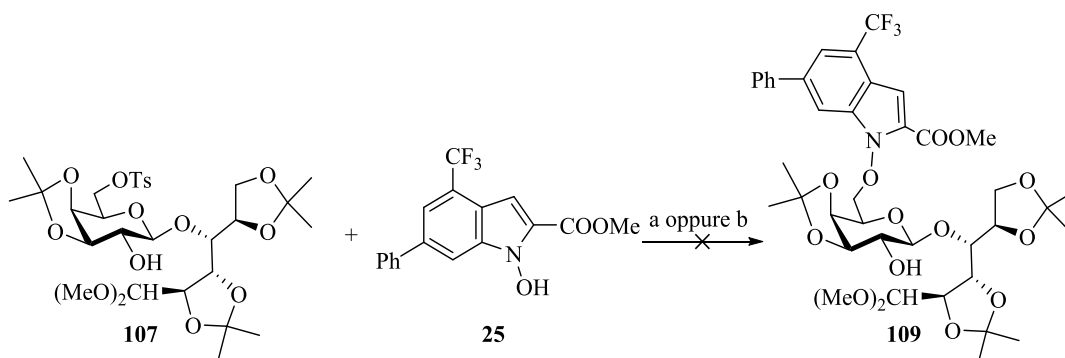


**Schema 2.24** – Reagenti e condizioni: a) MeONa, DMF t.a. (4 gg).

I composti **38** e **39**, non noti in letteratura, sono stati caratterizzati mediante analisi  $^1H$  e  $^{13}C$  NMR e i dati ottenuti sono risultati in accordo con la struttura proposta. In particolare, nello spettro protonico del composto **39**, oltre alla presenza dei segnali

caratteristici del sostituente indolico, particolarmente significativi sono i segnali relativi a H-6a e H-6b ( $\delta$  4.59 e 4.74) che risultano più deschermati rispetto ai corrispondenti segnali del tosil derivato **105** ( $\delta$  4.17 e 4.21) per la presenza dell'unità NHI in tale posizione. Ciò è confermato, nello spettro  $^{13}\text{C}$  NMR, dal segnale relativo al C-6 ( $\delta$  79.0) che risulta deschermato di circa 8 ppm rispetto al corrispondente segnale del precursore **105** ( $\delta$  70.8).

Sulla base dei risultati ottenuti, anche se insoddisfacenti, è stata verificata la possibilità di ottenere il glicocongiugato **109** a partire dal 6'-*O*-tosil derivato disaccaridico **107** e dall'inibitore **25** (Schema 2.25). La reazione è stata condotta in DMF, alla temperatura di 45°C, impiegando MeONa solido (5.5 eq). Tuttavia la reazione non ha fornito il prodotto desiderato neanche dopo tempi lunghissimi (8 gg). Una seconda prova è stata condotta nelle condizioni classiche di eterificazione che prevedono l'impiego di sodio idruro (NaH), una base più forte del MeONa. Anche in questo caso la reazione tra il derivato **107** e il nucleofilo **25** non ha fornito il prodotto desiderato **109** nonostante fosse stato addizionato tetra-*n*-butilammonio ioduro (TBAI) al fine di favorire lo scambio *in situ* tra il tosilato e lo ioduro per migliorare la bontà del gruppo uscente.

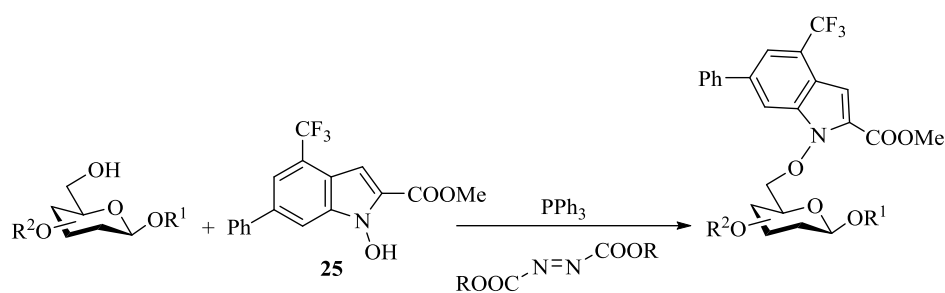


**Schema 2.25** –Reagenti e condizioni: a) MeONa, DMF 45°C (8 gg); b) NaH, DMF, TBAI t.a. (21 h) poi 50°C (10 gg).

Una possibile spiegazione alla mancata reattività del substrato disaccaridico **107** è ascrivibile all'ingombro sterico esercitato dal gruppo isopropilidenico in posizione C-3' e C-4' che rende difficile l'attacco del nucleofilo ingombrato **25** in posizione C-6'.

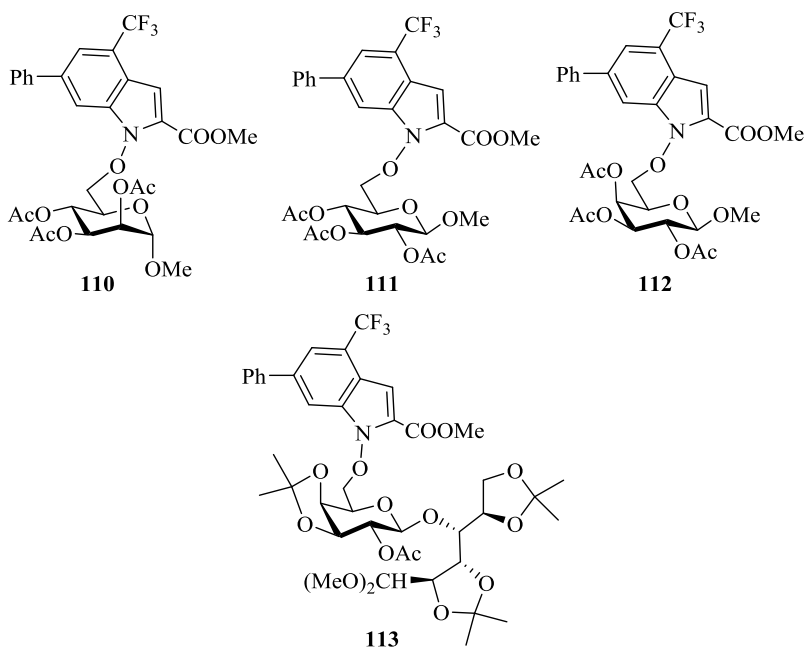
### 2.3.2 – Sintesi dei glicoconiugati 110, 111, 112 e 113 mediante reazione di Mitsunobu

Le problematiche riscontrate con l'impiego dei 6-*O*-tosil derivati, in particolare su substrati particolarmente ingombrati, hanno spinto verso la ricerca di una metodica alternativa, più generale e meno sensibile a fattori sterici. A tal scopo è stata scelta la reazione di Mitsunobu<sup>71</sup> in quanto rappresenta un metodo versatile per sostituire un gruppo alcolico con un'ampia gamma di gruppi funzionali. Tale reazione ha permesso la coniugazione dell'unità NHI **25** alla posizione C-6 di un opportuno saccaride, come mostrato nello *Schema 2.26*.



**Schema 2.26** – Schema generale per la sintesi di glicoconiugati mediante reazione di Mitsunobu.

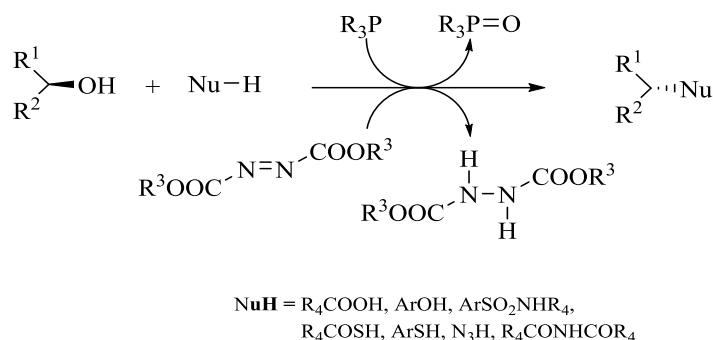
Sono stati così preparati, in rese soddisfacenti, i glicoconiugati **110**, **111**, **112** e **113** (*Figura 2.6*).



**Figura 2.6** – Glicoconiugati protetti **110**, **111**, **112** e **113**.

### 2.3.2.1 – Reazione di Mitsunobu: generalità e meccanismo

La reazione di Mitsunobu (*Schema 2.27*) permette la trasformazione di alcoli in un gran numero di gruppi funzionali come esteri, tioli, eteri ecc., attraverso l'uso di due reagenti che funzionano da coppia redox.<sup>72,73</sup> Generalmente questa coppia redox è formata da una triaril- o trialchilfosfina ( $R_3P$ ) e da un dialchil azodicarbossilato.

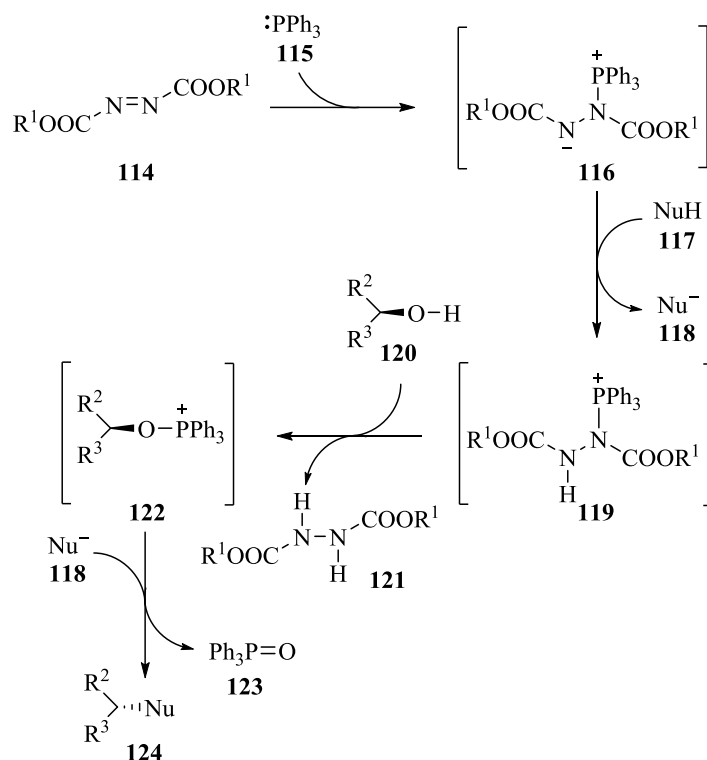


**Schema 2.27**- Schema generale della reazione di Mitsunobu.<sup>72,74</sup>

La reazione coinvolge alcoli primari o secondari (i terziari sono poco reattivi) e, ad eccezione di alcuni rari casi, decorre con inversione di configurazione come mostrato nello *Schema 2.28*.<sup>75,76</sup>

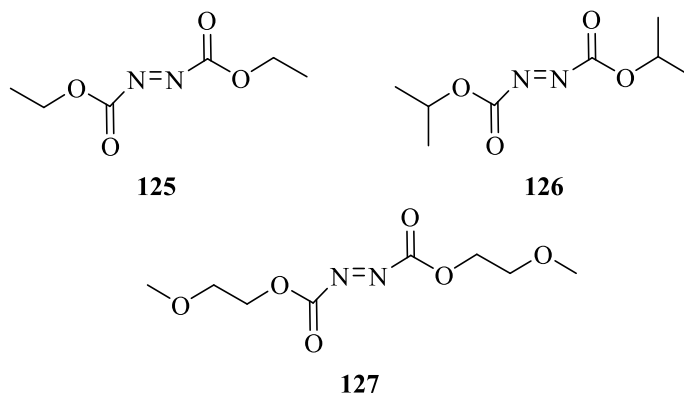
Il meccanismo prevede inizialmente l'attacco nucleofilo della fosfina **115** al doppio legame dell'azodicarbossilato **114** con formazione della betaina **116**. Tale addotto, comportandosi da base, strappa un protone alla specie nucleofila **117** e si trasforma nell'intermedio **119** che, in presenza dell'alcol chirale **120**, porta alla formazione dell'idrazina **121** e del sale di alcossifosfonio **122**. Nello *step* finale della reazione di Mitsunobu l'intermedio **122** subisce una sostituzione nucleofila  $S_N2$  da parte dell'anione **118** per formare il prodotto desiderato **124**, oltre al trifenilfosfinossido **123** come sottoprodotto.<sup>75,76</sup>

Questa reazione deve la sua importanza all'elevato controllo stereochimico con cui procede, all'ampia scelta di nucleofili che si possono impiegare e alle blande condizioni in cui avviene. La metodica può essere applicabile anche a saccaridi aventi gruppi protettori di tipo estereo, etero e acetilici.



**Schema 2.28** – Meccanismo della reazione di Mitsunobu.<sup>75,76,77</sup>

I solventi più utilizzati nelle reazioni di Mitsunobu sono THF e toluene, in quanto forniscono i migliori risultati. Altri solventi anidri impiegati sono DMF, Et<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e 1,4-diossano.<sup>72,74</sup> Relativamente alle fosfine, la trifenilfosfina è quella impiegata nella maggior parte dei casi riportati in letteratura.<sup>72</sup> Per quanto riguarda gli azodicarbossilati (*Figura 2.7*) il DEAD (diethyl azodicarboxylate, **125**) ed il DIAD (diisopropil azodicarboxylate, **126**) sono quelli più comuni ed in genere intercambiabili.

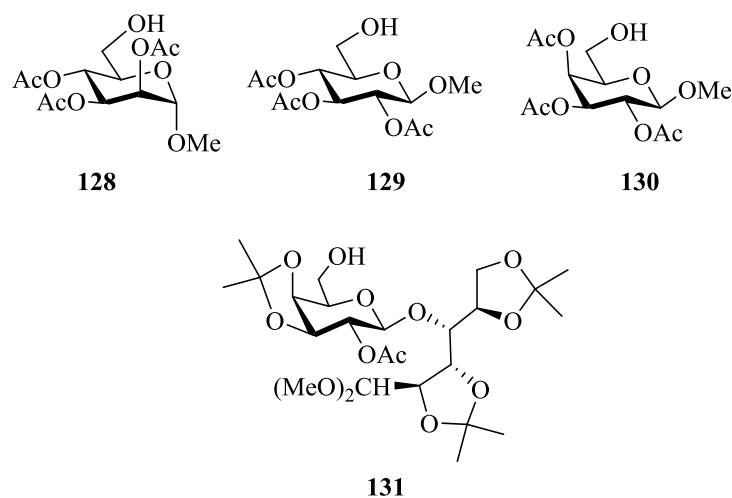


**Figura 2.7** – Vari azodicarbossilati.

Tuttavia, la scelta del tipo di azodicarbossilato è generalmente effettuata in base alla facilità con cui la corrispondente idrazina è separabile per via cromatografica dal prodotto di interesse.<sup>72</sup> Il DMEAD (di-2-metossietil azodicarbossilato, **127**) è un reattivo meno noto e meno impiegato ma ha il vantaggio, una volta effettuata la reazione, di facilitare l'eliminazione della corrispondente idrazina attraverso una semplice estrazione con acqua.<sup>74,78</sup>

### 2.3.2.2 – Sintesi di mono- e disaccaridi selettivamente deprotetti sulla posizione primaria (C-6)

La reazione di Mitsunobu richiede, come già detto, l'impiego di un nucleofilo, in questo caso il derivato NHI **25** e di un metil glicopiranoside selettivamente deprotetto al C-6. Per questo motivo, per realizzare la sintesi dei glicoconiugati **110**, **111**, **112** e **113** è stata necessaria la preparazione dei derivati saccaridici **128**, **129**, **130** e **131** riportati in *Figura 2.8*.

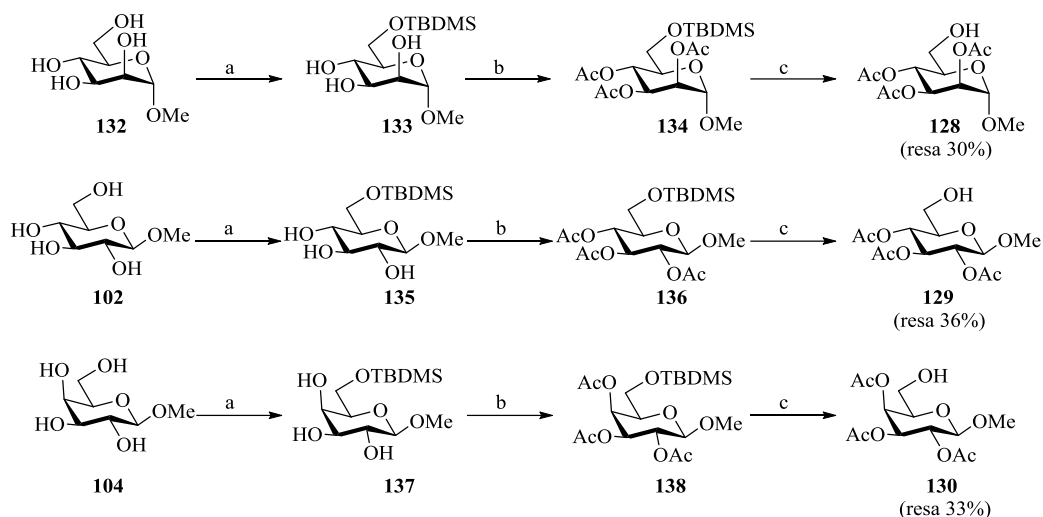


**Figura 2.8** – Derivati saccaridici **128**, **129**, **130** e **131**.

I derivati **128**, **129** e **130** sono stati preparati, rispettivamente, a partire dal metil  $\alpha$ -D-mannopiranoside (**132**), dal metil  $\beta$ -D-glucopiranoside (**102**) e dal metil  $\beta$ -D-galattopiranoside (**104**) commerciali secondo la sequenza sintetica illustrata nello *Schema 2.29*. La trasformazione dei tetraoli **132**, **102** e **104** nei corrispondenti 6-OH- $\beta$ -D-glicopiranosidi **128**, **129** e **130** ha reso necessaria una protezione ortogonale delle



posizioni C-2, C-3 e C-4 con gruppi protettori stabili nelle condizioni di Mitsunobu e, successivamente, rimovibili con metodologie che non coinvolgano né il legame glicosidico, né il legame con il derivato indolico.



**Schema 2.29** - Reagenti e condizioni: a) TBDMSCl, piridina t.a.; b) Ac<sub>2</sub>O-piridina 1:2 t.a.; c) AcOH aq. al 70% 70°C.

In generale, i gruppi protettori utilizzati nelle sequenze sintetiche saccaridiche possono essere suddivisi in permanenti quando rimangono sul substrato fino al raggiungimento del saccaride finale e temporanei quando vengono impiegati per ottenere un ossidrile libero nel corso del processo sintetico (in questo caso la posizione C-6). I gruppi protettori permanenti devono poter essere manipolati efficacemente (introduzione/rimozione) con un elevato regiocontrollo e devono essere stabili nelle condizioni di rimozione ed inserzione dei gruppi temporanei (ortogonalità dei gruppi protettori). Il concetto di protezione ortogonale è definito come un *set* di classi di gruppi protettori completamente indipendenti tali che ogni classe possa essere rimossa in presenza di tutte le altre. Un esempio di *set* di gruppi protettori ortogonali può essere rappresentato da: benzile (rimozione: H<sub>2</sub>, Pd/C in MeOH), acetato o benzoato (rimozione: MeONa-MeOH), TBDMS (rimozione: TBAF-THF o AcOH acquoso) e allile (rimozione: PdCl<sub>2</sub>, MeOH). È quindi essenziale disporre di metodologie sintetiche che permettano di discriminare i vari ossidrili presenti sul substrato

saccaridico al fine di inserire regioselettivamente una data protezione su una determinata posizione.

In generale, in derivati saccaridici è possibile funzionalizzare regioselettivamente il gruppo alcolico primario, più nucleofilo degli ossidrili secondari, con l'impiego di un reagente molto ingombrante come il *t*-butildimetilsilil cloruro (TBDMSCl), il trifenilmetile cloruro (TrtCl), il pivaloil cloruro (PivCl) ecc. In questo caso, per poter effettuare la successiva reazione di Mitsunobu, è stato deciso di introdurre sulla posizione C-6 dei tetraoli **132**, **102** e **104** un gruppo temporaneo di tipo sililetereo come il *t*-butildimetilsilile (TBDMS) e, come gruppo permanente e ortogonale, il gruppo acetilico sulle posizioni C-2, C-3 e C-4.

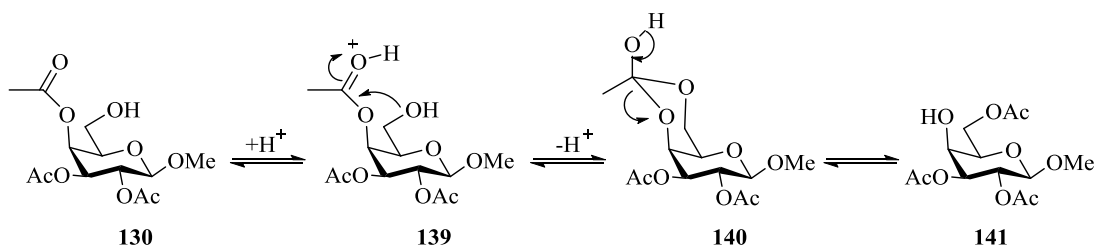
Generalmente le reazioni di sililazione sono effettuate in DMF anidra in presenza di imidazolo o piridina.<sup>79</sup> Conducendo la reazione in presenza di TBDMSCl (1.2 eq) e piridina, i tetraoli **132**, **102** e **104** (*Schema 2.29*) sono stati trasformati efficacemente nei corrispondenti 6-*O*-silil derivati **133**, **135** e **137** impiegati poi nello *step* successivo senza ulteriori purificazioni. I composti ottenuti presentano parametri spettroscopici in accordo con i dati di letteratura.<sup>80</sup> In particolare, la presenza del gruppo *t*-butildimetilsililico in posizione C-6 è confermata, nello spettro protonico del composto **135**, da un singoletto (9 H) a  $\delta$  0.85 attribuibile ai metili del raggruppamento *t*-butilico e da un singoletto fortemente schermato ( $\delta$  0.04), integrante per sei protoni e attribuibile ai due metili legati all'atomo di silicio. Nello spettro <sup>13</sup>C NMR, il segnale relativo al C-6 ( $\delta$  64.0), che risulta deschermato di circa 3 ppm rispetto al corrispondente segnale del precursore **102** ( $\delta$  60.3), conferma la presenza del gruppo sililetereo in tale posizione.

La successiva acetilazione convenzionale (Ac<sub>2</sub>O-piridina) dei derivati **133**, **135** e **137** ha fornito, in resa quantitativa, i derivati completamente protetti **134**, **136** e **138**, aventi parametri spettroscopici in accordo con quelli riportati in letteratura.<sup>81,82</sup>

A questo punto della sequenza sintetica è stato necessario rimuovere selettivamente il gruppo sililetereo sul C-6 in modo da liberare la funzione alcolica per poi effettuare la successiva reazione di Mitsunobu con il derivato *N*-idrossiindolico **25**. Generalmente i gruppi silileterei vengono rimossi selettivamente mediante trattamento con ioni fluoruro, ad esempio con tetrabuttilammonio fluoruro (TBAF) in soluzione di

THF anidro e conducendo la reazione a temperatura ambiente.<sup>79</sup> Questo metodo, a causa della basicità dello ione fluoruro accentuata dall'anidricità dell'ambiente di reazione, può portare in alcuni casi alla rimozione di gruppi acetilici particolarmente reattivi come quelli in posizione C-2 di unità galattopiranosidiche.<sup>83</sup> Per ovviare a questo inconveniente, la rimozione del gruppo *t*-butildimetilsililico nei composti **134**, **136** e **138** (Schema 2.29) è stata effettuata con acido acetico acquoso al 70%, alla temperatura di 70°C.<sup>79</sup> Dopo trattamento della miscela di reazione per semplice coevaporazione con toluene a pressione ridotta e purificazione *flash*-cromatografica dei grezzi di reazione, sono stati isolati i composti desiderati **128** (resa 30% calcolata da **132**), **129** (resa 36% calcolata da **102**) e **130** (resa 33% calcolata da **104**). I derivati alcolici **128**, **129** e **130** presentano dati spettroscopici in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>84,85,86,87</sup> In particolare, negli spettri protonici, la scomparsa dei segnali relativi al gruppo *t*-butildimetilsililico conferma la presenza della funzionalità alcolica libera in posizione C-6.

Nel caso del derivato galattosidico **138** la rimozione del gruppo *t*-butildimetilsililico con acido acetico acquoso al 70% ha fornito, oltre al composto desiderato **130**, il metil 2,3,6-*O*-acetil- $\beta$ -D-galattopiranoside (**141**, Schema 2.30) in resa del 17% ed avente parametri spettroscopici in accordo con il dato di letteratura.<sup>82,86</sup> In particolare fra i valori di *chemical shift* dei segnali relativi ai protoni del derivato **141** e quelli del derivato **130** vi è un ottimo accordo, ad eccezione di quelli relativi ai protoni H-6a e H-6b, che risultano più deschermati (0.6-0.7 ppm) in **141** a causa dell'effetto anisotropico del carbonile che conferma la presenza di un gruppo acetilico in posizione C-6.

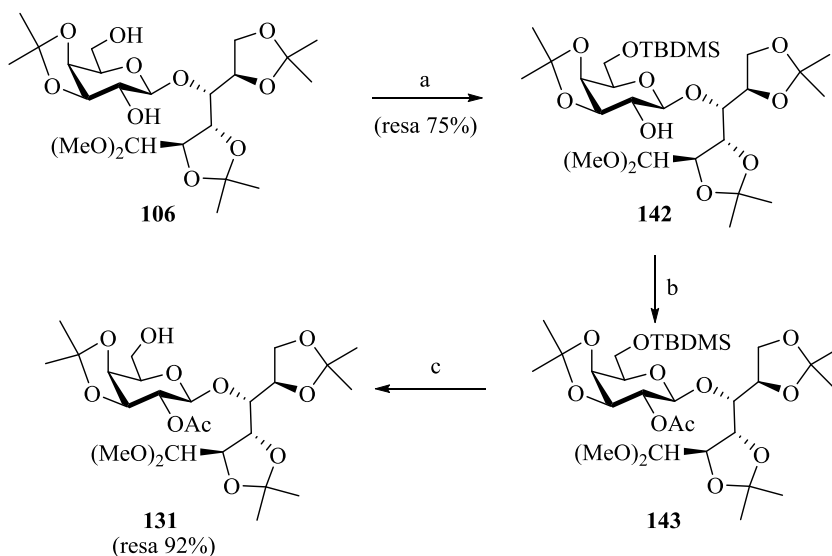


Schema 2.30 – Probabile meccanismo di formazione di **141**.

La formazione di **141** è spiegabile ammettendo che l'acidità dell'ambiente di reazione favorisca la formazione dell'intermedio ciclico **140**, attraverso un attacco

nucleofilo dell'ossidrile in posizione C-6 sulla forma protonata **139**. Ciò promuove uno *shift* di acile dalla posizione C-4 al vicino OH-6 del derivato **130** per dare il 4-OH-derivato **141** (*Schema 2.30*).

La sintesi del derivato saccaridico **131** ha previsto una strategia sintetica che si differenzia dalla precedente solo per l'ultimo passaggio, ovvero quello relativo alla rimozione selettiva del gruppo sililetereo (*Schema 2.31*). A partire dal triacetonlattosio **106**, per trattamento con TBDMSCl e piridina, è stato ottenuto il derivato *t*-butildimetilsililico **142**, avente dati spettroscopici in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>88</sup> L'acetilazione con Ac<sub>2</sub>O-piridina 1:2 di **142** ha fornito il 2'-*O*-acetil derivato **143**, avente parametri spettroscopici in accordo con quelli riportati in letteratura.<sup>88</sup>

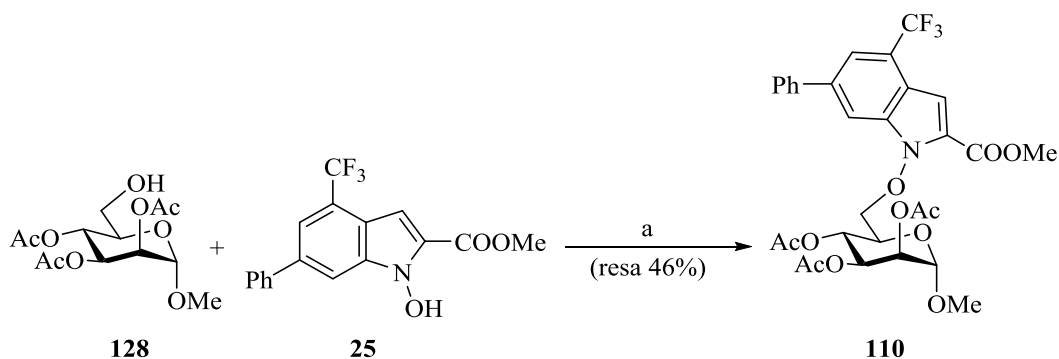


**Schema 2.31** - Reagenti e condizioni: a) TBDMSCl, piridina t.a. (22 h); b) Ac<sub>2</sub>O-piridina 1:2 t.a. (2 h); c) TBAF, THF 0°C (3 h).

A causa della presenza di funzioni acido labili, nell'ultimo *step* della sequenza sintetica, la rimozione del gruppo *t*-butildimetilsililico nel disaccaride **143** è stata realizzata con TBAF in THF per evitare la rimozione del gruppo acetilico sulla posizione C-2 dell'unità non riducente β-galattopiranosidica. La reazione è stata condotta alla temperatura di 0°C e, dopo purificazione *flash*-cromatografica del grezzo di reazione, è stato isolato il composto **131** (resa 92%) avente parametri spettroscopici in accordo con il dato di letteratura.<sup>89</sup>

### 2.3.2.3 – Reazione di Mitsunobu

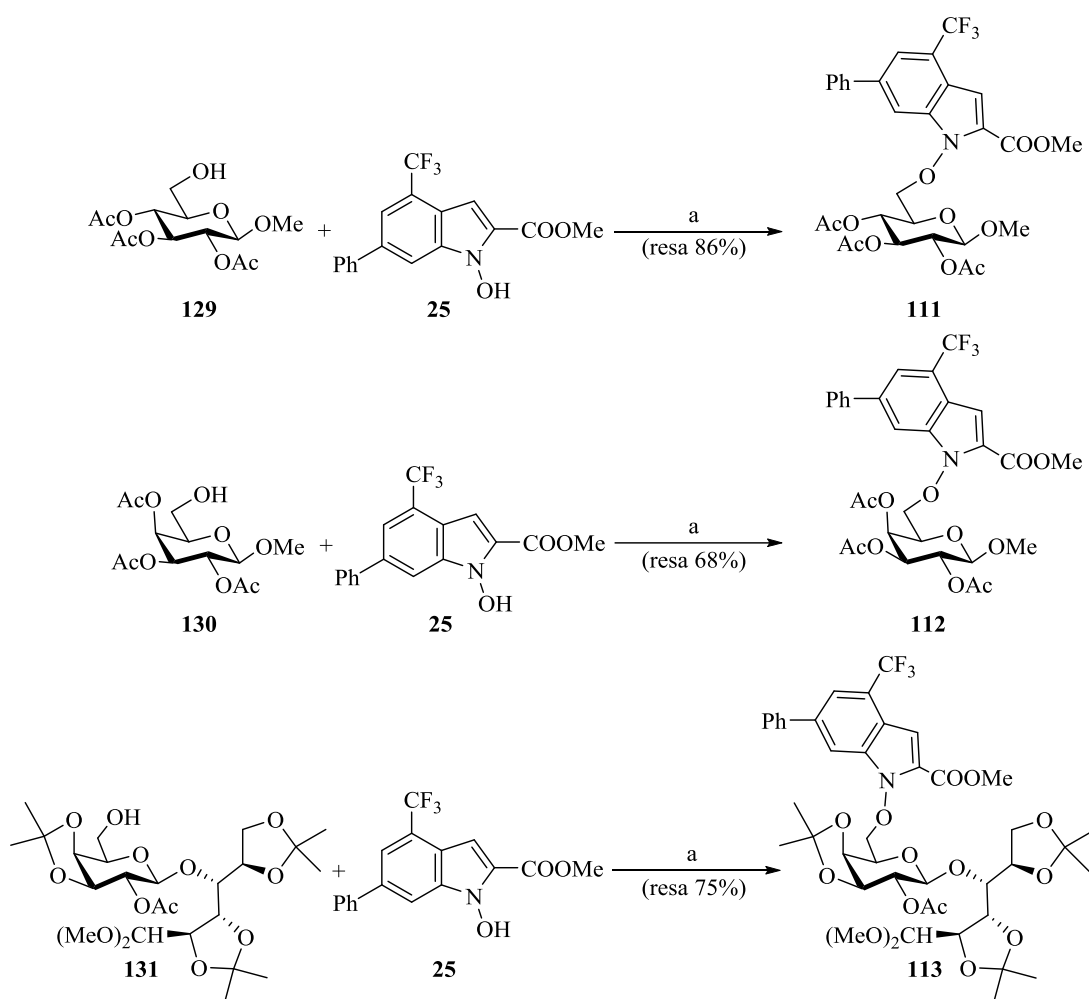
La disponibilità del derivato *N*-idrossiindolico **25** e dei saccaridi **128**, **129**, **130** e **131**, selettivamente deprotetti al C-6, ha permesso la sintesi dei corrispondenti glicoconjugati mediante reazione di Mitsunobu. Poiché in letteratura sono riportati molti esempi di reazione di Mitsunobu che prevedono l'impiego di DIAD come azodicarbossilato, è stato deciso di effettuare la sintesi del glicoconjugato **110** (Schema 2.32) mediante trattamento di una soluzione di metil 2,3,4-*O*-acetil- $\alpha$ -D-mannopiranoside (**128**) in THF anidro con NHI **25**, impiegando un largo eccesso di DIAD (3.5 eq) e PPh<sub>3</sub> (3.5 eq). Dopo trattamento della reazione e doppia purificazione *flash*-cromatografica del grezzo, è stato isolato il derivato **110** con resa del 46%, chimicamente puro all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.



**Schema 2.32** - Reagenti e condizioni: a) PPh<sub>3</sub>, DIAD, THF 0°C→t.a. (3 h).

A causa delle difficoltà incontrate nella purificazione del composto **110**, dovute alla presenza dell'idrazina derivante dalla riduzione del DIAD che possiede R<sub>f</sub> analogo al prodotto desiderato, è stato deciso di impiegare nelle reazioni successive il DMEAD, un azodicarbossilato la cui idrazina è più facilmente separabile dal prodotto di reazione in quanto solubile in acqua.

I 6-OH derivati **129**, **130** e **131** sono stati sottoposti a reazione di Mitsunobu con il derivato *N*-idrossiindolico **25** impiegando un largo eccesso di DMEAD (3.5 eq), PPh<sub>3</sub> (3.5 eq) e THF anidro come solvente (Schema 2.33). Dopo 3-4 ore l'analisi TLC ha evidenziato, in tutti i casi, la scomparsa dei derivati saccaridici e la formazione di un prodotto largamente maggioritario. Il trattamento delle reazioni e le purificazioni *flash*-cromatografiche dei grezzi hanno permesso di isolare i glicoconjugati **111** (resa 86%) **112** (resa 68%) e **113** (resa 75%), chimicamente puri all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.

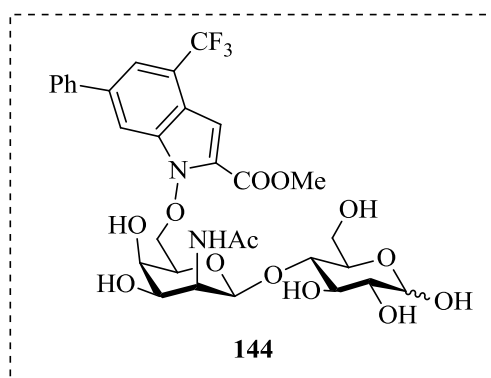


**Schema 2.33** - Reagenti e condizioni: a) DMEAD, PPh<sub>3</sub>, THF 0°C→t.a.

I glicocongiugati **110**, **111**, **112** e **113**, non noti in letteratura, sono stati completamente caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico ed i parametri spettroscopici sono in accordo con le strutture proposte. In tutti i casi, nello spettro <sup>13</sup>C NMR, particolarmente significativo è il segnale relativo al C-6 che risulta deschermato di circa 18 ppm rispetto al corrispondente segnale dei 6-OH derivati, per la presenza del sostituito indolico in tale posizione. Ad esempio, lo spettro <sup>13</sup>C NMR del glicocongiugato **112**, oltre a presentare tutti i segnali della struttura indolica, mostra la presenza di un forte effetto di deschermo ( $\delta$  18.1) sul C-6 (da  $\delta$  60.8 a  $\delta$  78.9) a conferma dell'avvenuta eterificazione del gruppo alcolico.

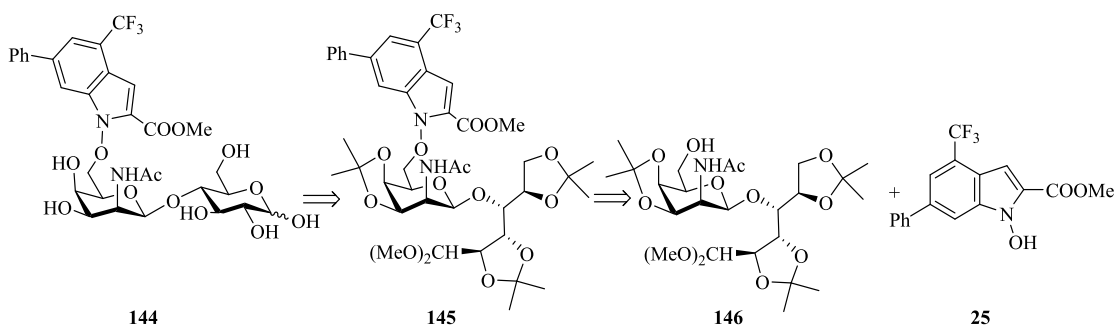
### 2.3.3 – Sintesi di un glicocongiugato della serie D-talo

L'ultimo obiettivo di questo lavoro di tesi ha riguardato la possibilità di coniugare il derivato NHI **25** ad un disaccaride molto più complesso, avente un gruppo acetammidico assiale in posizione C-2 dell'unità non riducente, al fine di ottenere il glicocongiugato **144** (Figura 2.9).



**Figura 2.9** – Obiettivo sintetico.

L'analisi retrosintetica del composto **144**, di seguito riportata (Schema 2.34), mostra come tale glicocongiugato possa essere ottenuto dalla deprotezione del derivato **145**, a sua volta preparato tramite reazione di Mitsunobu tra il derivato talosaminico **146** ed il composto *N*-idrossiindolico **25**.



**Schema 2.34** – Approccio retrosintetico per la sintesi del glicocongiugato **144**.

### 2.3.3.1 – Sintesi del derivato disaccaridico 146

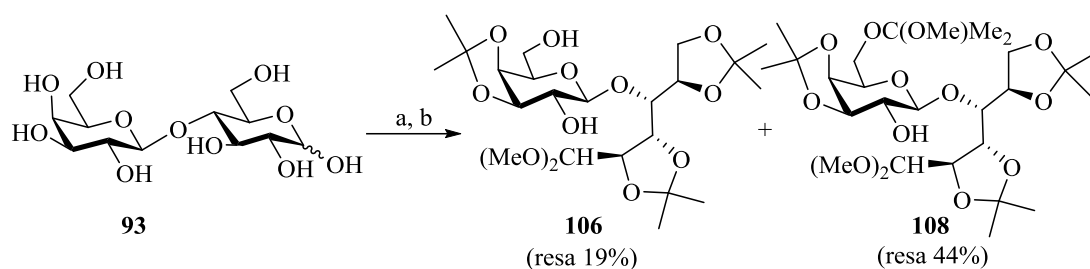
Sulla base di quanto sopra esposto, è stato necessario effettuare la sintesi del derivato disaccaridico **146**, deprotetto al C-6 dell'unità non riducente mediante una metodica messa a punto nel laboratorio dove è stato svolto il presente lavoro di tesi a partire dal D-lattosio (**93**). La reazione chiave che permette la conversione del D-lattosio (**93**) nel derivato **146** è rappresentata da una reazione di amminazione con inversione di configurazione della posizione C-2 dell'unità  $\beta$ -D-galattopiranosidica del poliacetonuro **108**, avente in tale posizione un gruppo alcolico.

Il primo passaggio della sequenza sintetica (*Schema 2.35*) ha previsto una doppia reazione di acetonzione con 2,2-dimetossipropano (DMP), solvente e agente acetonzante, promossa da quantità catalitiche di acido *p*-toluenosfonico.<sup>69</sup> Dopo 18 ore alla temperatura di 80°C, l'analisi TLC ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza **93** e la formazione di due prodotti principali, attribuibili al triacetonzlattosio dimetilacetale (**106**) ed al suo 6'-*O*-metossisopropil derivato (**108**). Dopo neutralizzazione della miscela di reazione con Et<sub>3</sub>N, seguita da evaporazione dell'eccesso di ammina e DMP mediante ripetute coevaporazioni con toluene, è stato ottenuto un grezzo che all'analisi <sup>13</sup>C NMR è risultato costituito da una miscela dei due acetonzuri **106** e **108** in rapporto 7:3.

Poiché il derivato del lattosio più utile per la strategia sintetica adottata è **108**, è stata effettuata una seconda reazione di acetonzione riprendendo semplicemente il residuo con DMP e lasciando il sistema in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 17 ore, è stato osservato mediante analisi TLC che il rapporto tra i prodotti **106** e **108** risultava invertito grazie allo stabilirsi di una nuova posizione di equilibrio fra i due componenti come risultato dell'allontanamento del metanolo derivante dalla prima acetonzione.

La neutralizzazione della miscela con Et<sub>3</sub>N e la purificazione *flash*-cromatografica sul grezzo hanno permesso di isolare i due poliacetonuri **106** (resa 19%) e **108** (resa 44%), aventi proprietà chimico-fisiche e parametri spettroscopici in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>69</sup>



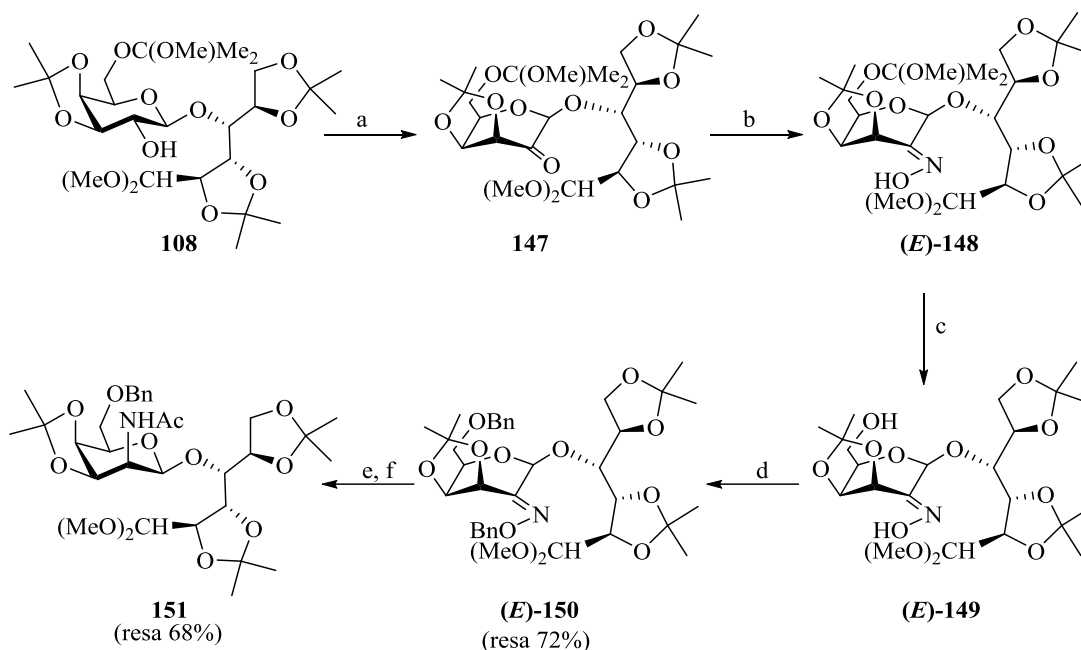


**Schema 2.35** – Reagenti e condizioni: a) *p*-TsOH cat., DMP 80°C (18 h); b) *p*-TsOH cat., DMP t.a. (17 h).

Il tetracetone del lattosio **108** è un ottimo precursore per la sintesi del derivato saccaridico **146** e permette di realizzare la sequenza di ossidazione-ossimazione-riduzione a dare il derivato **151** (Schema 2.36), costituito da un'unità *N*-acetil-D-talosaminica legata, con un legame  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), all'unità riducente di D-glucosio bloccata nella struttura aciclica dimetil acetaleica.

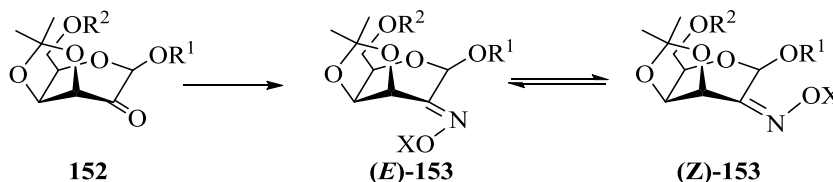
L'ossidazione di **108**, a causa della labilità della funzione metossisopropilica in 6', richiede l'uso di sistemi di reazione che operino in condizioni neutre come il sistema ossidante costituito da tetrapropilammonio perrutenato ( $n\text{PrN}_4^+\text{RuO}_4^-$ , TPAP) e 4-metilmorfolina *N*-ossido (NMO). Le ossidazioni con TPAP sono generalmente effettuate con quantità catalitiche di ossidante dato che NMO, in eccesso nell'ambiente di reazione, rigenera il TPAP che si consuma durante la reazione.<sup>90</sup>

L'ossidazione di **108** è stata quindi effettuata a temperatura ambiente in soluzione di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro contenente TPAP commerciale (0.05 eq), NMO (1.4 eq) ed in presenza di setacci molecolari 4Å al fine di rimuovere l'acqua che si forma durante la reazione. Trascorse 2.5 ore a temperatura ambiente, la miscela di reazione è stata filtrata e la soluzione concentrata a pressione ridotta. È stato ottenuto un grezzo che all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR risulta costituito esclusivamente dal 2-uloside **147**, direttamente utilizzato nella successiva reazione di ossimazione senza ulteriori processi di purificazione. Il derivato **147** presenta dati analitici e spettroscopici in accordo con quelli riportati in letteratura.<sup>91</sup> In particolare, negli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR, risultano diagnostici il segnale di doppietto a  $\delta$  5.20, attribuibile al protone H-1' ( $J_{1;3'}$  0.7 Hz) ed un segnale a  $\delta$  197.3, attribuibile alla risonanza del C-2' di natura chetonica.



**Schema 2.36** – Reagenti e condizioni: a) NMO cat., TPAP, setacci molecolari 4Å t.a. (2.5 h); b)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , MeOH riflusso (4 h); c) MeOH-acqua 10:1, AcOH tracce 40°C (4 h); d) 18-crown-6, THF+0.5 v/v di acqua, KOH 0°C (30 min) poi BnBr t.a. (5 h); e)  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$  0°C→riflusso (20 h); f)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , MeOH t.a. (16 h).

La successiva trasformazione del chetone in ossima può essere effettuata in condizioni termodinamiche<sup>92</sup> (Schema 2.37) per trattamento, a temperatura ambiente, di un derivato chetonico tipo **152** in soluzione di piridina con un eccesso dell'opportuno cloridrato dell'idrossilammina ( $\text{NH}_2\text{OX}\cdot\text{HCl}$ ). In queste condizioni si formano miscele diastereoisomeriche di **(E)-153** e **(Z)-153** interconvertibili tra loro grazie ad un processo acido catalizzato promosso, in questo caso, dalla presenza dei sali di piridinio nell'ambiente di reazione. Inoltre, in queste condizioni, si ha anche la rimozione dei gruppi acido labili come il gruppo metossiisopropilico.



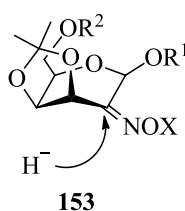
**Schema 2.37** – Trasformazioni di ulosidi in ossime in condizioni termodinamiche.

La reazione di ossimazione dell'uloside tipo **152**, effettuata in condizioni cinetiche<sup>92</sup> (metanolo in presenza di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e NH<sub>2</sub>OH·HCl), costituisce una valida alternativa alla precedente metodica e permette di isolare, in rese quantitative, esclusivamente l'ossima cinetica (*E*)-**153** che mantiene la funzione acetaleica mista al C-6', vista la basicità dell'ambiente di reazione.

Sulla base di queste considerazioni, il composto **147** è stato disciolto in metanolo e la soluzione ottenuta è stata lasciata in agitazione, in presenza di NH<sub>2</sub>OH·HCl e con un eccesso di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Dopo 4 ore a riflusso, l'analisi TLC ha evidenziato la completa scomparsa del substrato di partenza e la formazione di un unico prodotto. Il *work-up* della reazione ha permesso di ottenere un grezzo sciropposo costituito esclusivamente dallo stereoisomero cinetico (*E*)-**148**, che presenta parametri spettroscopici in accordo con quelli riportati in letteratura.<sup>93</sup> In particolare, la presenza del gruppo metossisopropilico (MIP) in posizione C-6' di (*E*)-**148** è facilmente confermata dai segnali relativi al gruppo metossilico (<sup>1</sup>H NMR: δ 3.15; <sup>13</sup>C NMR δ 48.9) e da quelli dei due metili [<sup>1</sup>H NMR: δ 1.28 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR δ 24.8 e 24.7]. L'avvenuta ossimazione è inoltre confermata nello spettro <sup>13</sup>C NMR dalla scomparsa del segnale attribuibile al carbonile (δ 197.3) sostituito da un segnale a δ 151.8 diagnostico per un doppio legame C=N-OH. In generale è anche possibile distinguere le forme diastereoisomeriche delle ossime, grazie al fatto che l'ossigeno del raggruppamento N-OH esercita un forte effetto di deschermo sui protoni situati dalla stessa parte rispetto al doppio legame. Nel caso di **148**, il segnale di doppio doppietto a δ 5.46 attribuibile a H-3' (*J*<sub>1,3'</sub> 0.7 Hz e *J*<sub>3',4'</sub> 7.9 Hz) è sensibilmente più deschermato di tutti gli altri protoni piranosici e indica quindi una configurazione (*E*) di tale derivato.

Per proseguire la sequenza sintetica (*Schema 2.36*) e realizzare una riduzione dell'ossima con completa stereoselettività, è necessario proteggere la funzionalità ossidrilica e quella ossimminica con gruppi benzilici. Il passaggio chiave di questa sequenza sintetica risiede infatti nella stereoselettività della reazione di riduzione del legame C=N ad opera di idruri come LiAlH<sub>4</sub>.<sup>93</sup> I dati sperimentali ottenuti da ricerche precedenti hanno evidenziato che la stereoselettività della riduzione di substrati ossimminici tipo **153** (*Figura 2.10*) è da attribuirsi essenzialmente a due fattori quali:

- l'effetto sterico di schermo esercitato dal ponte isopropilidenico sulla faccia superiore dell'anello piranosidico che dirige l'attacco dell'idruro sulla faccia inferiore, meno impedita, del doppio legame C=N favorendo l'esclusiva formazione del gruppo amminico in *cis* rispetto all'anello diossolanico;
- lo stereocontrollo anomerico che dirige l'attacco dell'idruro sulla faccia opposta a quella del sostituito anomerico, con formazione esclusiva o con alta stereoselettività dell'ammina a configurazione 1,2-*cis*.

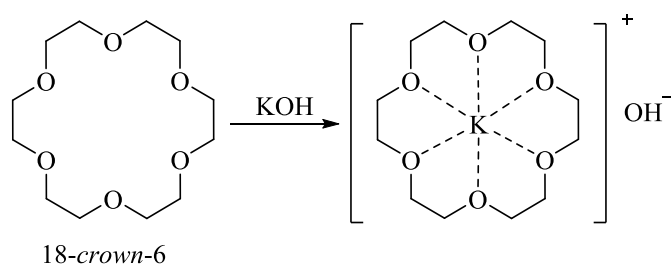


**Figura 2.10** – Stereoselettività nella riduzione di substrati ossimminici.

È stato inoltre osservato che la stereoselettività delle reazioni di riduzione di derivati 2-ossimminici con  $\text{LiAlH}_4$  non dipende dalla loro isomeria geometrica (*E* e/o *Z*) e che, pur mostrando una forte prevalenza per la formazione del derivato D-talosaminico, la formazione dell'epimero al C-2' della serie D-galatto è fortemente dipendente anche dal tipo di sostituito al C-6' e dall'ossigeno ossimminico. La protezione delle posizioni C-2' e C-6' con gruppi benzilici permette di garantire una totale stereoselettività.<sup>93</sup>

Sulla base di queste considerazioni, la via sintetica (*Schema 2.36*) ha previsto la deprotezione della posizione OH-6' attraverso un'idrolisi selettiva del gruppo metossiisopropilico per riscaldamento (40°C) dell'ossima (***E***-148) in soluzione metanolica acquosa, in presenza di tracce di AcOH. Dopo eliminazione dei solventi mediante coevaporazione con toluene, è stato ottenuto un solido schiumoso costituito esclusivamente dall'ossima (***E***-149), direttamente utilizzato nella successiva reazione di benzilazione senza ulteriori processi di purificazione. Il derivato (***E***-149) ha presentato dati analitici e spettroscopici in accordo con quelli riportati in letteratura.<sup>93</sup> La presenza del gruppo alcolico primario in posizione C-6' è stata confermata, negli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR, dall'assenza dei segnali relativi al gruppo metossiisopropilico.

L'ossima (**E**)-**149** è stata quindi sottoposta a benzilazione secondo un protocollo ampiamente utilizzato nel laboratorio nel quale è stato svolto il presente lavoro di tesi che si basa sulla salificazione delle funzionalità ossidriliche mediante il sistema KOH-18-crown-6 in THF+0.5% v/v di acqua, seguita dal trattamento con bromuro di benzile. L'idrossido di potassio (KOH), in presenza dell'etere corona, forma una coppia ionica costituita dal sistema chelato etere-K<sup>+</sup> e dall'OH<sup>-</sup> (Figura 2.11) nel quale l'anione ossidrile acquista una basicità maggiore. La sostituzione del K<sup>+</sup>, che con OH<sup>-</sup> forma una coppia ionica molto stretta, con una struttura molto più grande quale il chelato etere-K<sup>+</sup> esalta la reattività dell'anione OH<sup>-</sup> rendendolo capace di salificare le funzionalità ossidriliche, in grado poi di reagire con l'elettrofilo presente in soluzione.



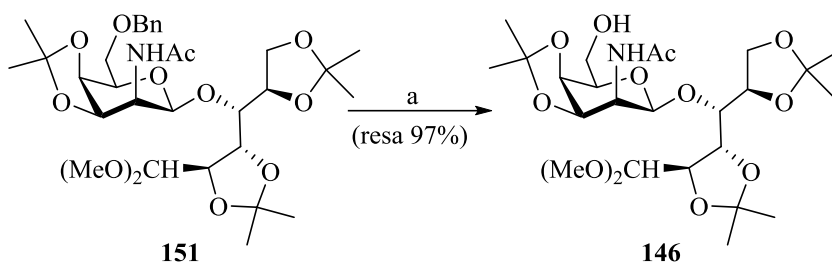
**Figura 2.11** – Sistema KOH-18-crown-6.

La reazione di benzilazione è stata quindi effettuata facendo reagire l'ossima (**E**)-**149** in presenza di un eccesso di bromuro di benzile (4.0 eq). Trascorse 5 ore, è stata evidenziata la completa scomparsa del substrato di partenza e la formazione di un unico prodotto. Dopo trattamento della miscela di reazione e purificazione *flash*-cromatografica, è stato isolato il di-*O*-benzil derivato (**E**)-**150** con una resa complessiva del 72% calcolata da **108**. Il composto (**E**)-**150** presenta dati analitici e spettroscopici in accordo con quelli riportati in letteratura.<sup>93</sup> La presenza di due gruppi benzilici è confermata, nello spettro protonico, da un multipletto a  $\delta$  7.38-7.26 integrante per 10 protoni e da due sistemi AB ( $\delta$  5.19 e 5.02,  $J_{A,B}$  12.7 Hz;  $\delta$  4.49 e 4.56,  $J_{A,B}$  11.9 Hz) integranti ciascuno per due protoni ed attribuibili ai due metileni benzilici. Anche lo spettro <sup>13</sup>C NMR conferma la struttura proposta e presenta, oltre a tutti gli altri segnali della molecola, quattro segnali a  $\delta$  76.8, 73.4, 137.9 e 137.0, attribuibili rispettivamente ai due CH<sub>2</sub> benzilici ed ai due carboni quaternari aromatici. Inoltre il segnale relativo al C-6' ( $\delta$  68.8) di (**E**)-**150** risulta deschermato di circa 7 ppm

rispetto al corrispondente segnale di (*E*)-**149** ( $\delta$  61.8) per la presenza del gruppo etereo in tale posizione.

Il composto (*E*)-**150** è stato sottoposto poi a riduzione stereoselettiva con un eccesso di  $\text{LiAlH}_4$  in  $\text{Et}_2\text{O}$  anidro a refluxo (Schema 2.36). Dopo trattamento della miscela di reazione, è stato ottenuto un grezzo poi direttamente sottoposto a *N*-acetilazione per trattamento con  $\text{Ac}_2\text{O}$  in metanolo. La purificazione *flash*-cromatografica ha permesso di isolare il derivato *N*-acetilamminico **151** a configurazione *D*-talo (resa 68%) che presenta parametri spettroscopici in accordo con quelli riportati in letteratura.<sup>94</sup> In particolare nello spettro protonico di **151**, la presenza del gruppo acetamidico è confermata da un doppietto ( $J_{2',\text{NH}}$  9.0 Hz), scambiabile con  $\text{D}_2\text{O}$ , e da un singoletto ( $\delta$  1.88) integrante per tre protoni, assegnabili rispettivamente al protone legato all'azoto e al metile acetilico. L'avvenuta inversione al C-2' nel derivato **151** è evidenziata dal basso valore della costante di accoppiamento  $J_{1;2'}$  2.5 Hz che indica una disposizione equatoriale del protone H-2', propria della configurazione *D*-talo.

Il derivato  $\beta$ -*D*-talosaminico completamente protetto **151**, è stato trasformato nel desiderato derivato **146**, avente un ossidrilico libero in posizione C-6', mediante una reazione di idrogenolisi in presenza di Pd/C in metanolo (Schema 2.38).

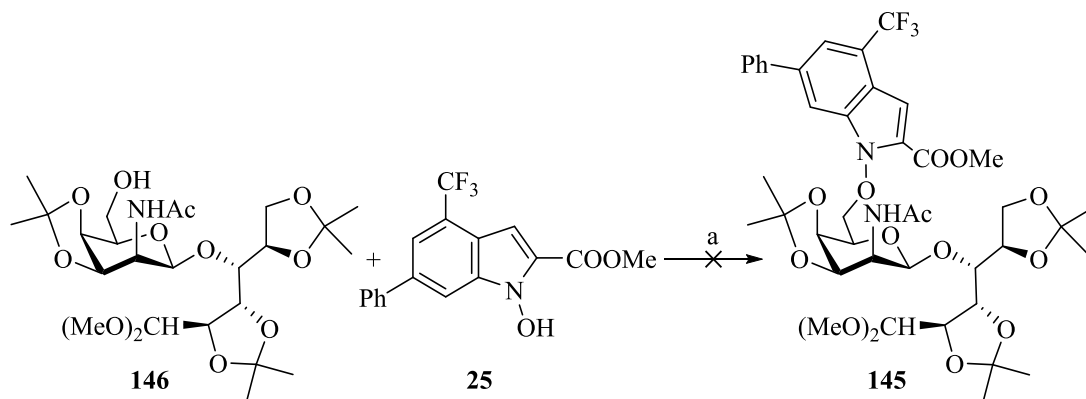


**Schema 2.38** – Reagenti e condizioni: a)  $\text{H}_2$ , Pd/C al 10%, MeOH t.a. (96 h).

Dopo purificazione *flash*-cromatografica del grezzo di reazione, è stato isolato il derivato **146** (resa 97%), avente parametri spettroscopici in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>95</sup>

### 2.3.3.2 – Tentativo di sintesi del glicocongiugato **145**, precursore di **144**

La disponibilità del derivato saccaridico **146**, avente un ossidrile libero in posizione C-6 dell'unità non riducente, ha permesso di effettuare la reazione di Mitsunobu con il derivato NHI **25** impiegando PPh<sub>3</sub> e DMEAD (*Schema 2.39*), nelle stesse condizioni utilizzate per la preparazione dei derivati **111-113**.



**Schema 2.39** – Reagenti e condizioni: a) DMEAD, PPh<sub>3</sub>, THF anidro 0°C→t.a. (24 h), 50°C (6.5 h), t.a. (3 gg).

L'analisi TLC, effettuata dopo 24 ore a temperatura ambiente, ha mostrato solo macchie riconducibili ai precursori di partenza. Per questo motivo la miscela di reazione è stata scaldata a 50°C per 6.5 ore e poi riportata a temperatura ambiente per 3 giorni. Effettuato il *work-up* della reazione, l'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sul grezzo ha mostrato la presenza di una miscela di prodotti difficilmente identificabili.

La non avvenuta reazione è imputabile alla presenza del gruppo acetammidico in posizione assiale che può ostacolare l'attacco del nucleofilo **25** sulla posizione C-6 dell'unità non riducente del disaccaride **146**.

La strategia sintetica seguita in questo lavoro di tesi non ha dunque condotto alla sintesi del prodotto desiderato. Tuttavia una nuova procedura alternativa per la sintesi del glicocongiugato **145** (precursore di **144**) sarà oggetto di studi futuri.

## 2.4 – Preparazione dei *target* finali 33 $\alpha$ , 33 $\beta$ , 34 $\beta$ , 37, 38, 39, 40, 41 $\beta$ e 42 $\beta$

L'ultimo passaggio sintetico ha previsto l'ottenimento dei *target* finali rappresentati dai glicoconiugati 33 $\alpha$ , 33 $\beta$ , 34 $\beta$ , 37, 38, 39, 40, 41 $\beta$  e 42 $\beta$  (Figura 2.12), attraverso rimozione dei gruppi protettori presenti sulle funzioni alcoliche delle unità saccaridiche.

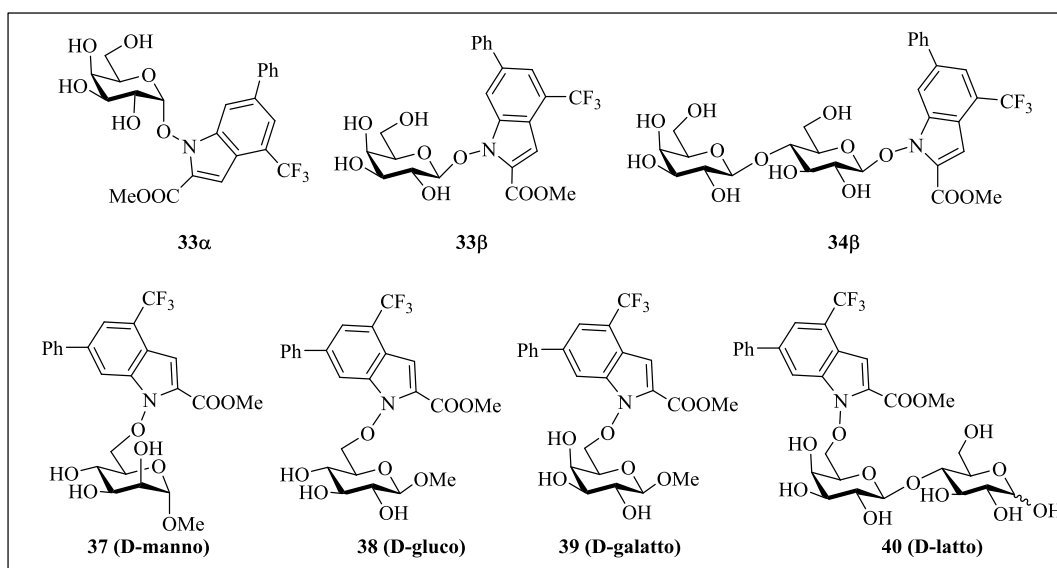


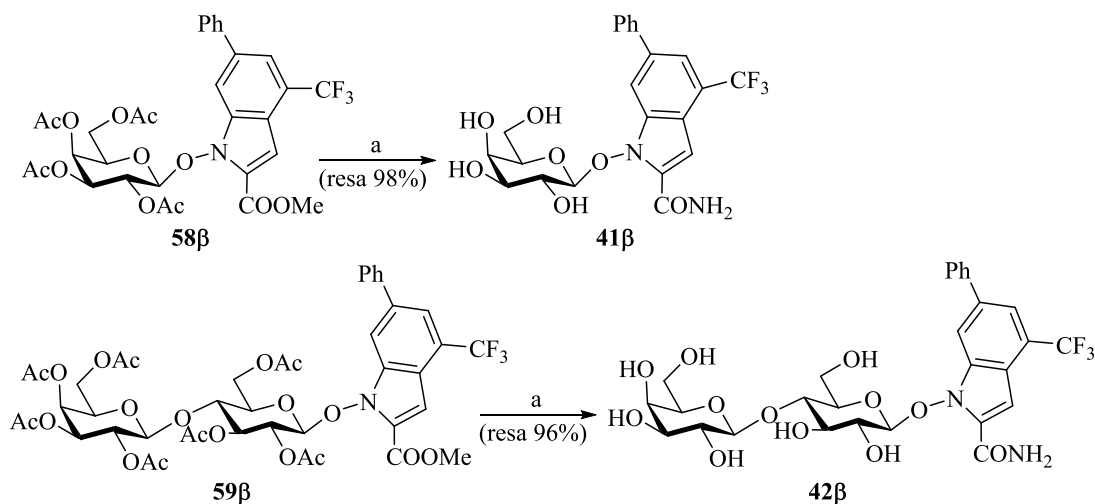
Figura 2.12 – *Target* finali.

Inizialmente la desacetilazione dei derivati 58 $\beta$  e 59 $\beta$  (Schema 2.40) è stata condotta seguendo una metodica ampiamente utilizzata nel laboratorio dove è stato svolto il presente lavoro di tesi che prevede l'impiego di NH<sub>3</sub> in MeOH.

Generalmente queste condizioni permettono di ottenere l'alcol in ottime rese, anche in presenza di funzionalità esteree,<sup>96</sup> accompagnato solo da prodotti volatili e quindi facilmente allontanabili per semplice evaporazione a pressione ridotta.

I composti 58 $\beta$  e 59 $\beta$  sono stati dunque trattati con una soluzione di NH<sub>3</sub>-MeOH (7N)-MeOH 1:1 a temperatura ambiente per 16-18 ore. L'evaporazione dei solventi a pressione ridotta ha fornito dei grezzi che all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono risultati costituiti rispettivamente dai glicoconiugati ammidici 41 $\beta$  (resa 98%) e 42 $\beta$  (resa 96%). La successiva triturazione con Et<sub>2</sub>O ha fornito i derivati 41 $\beta$  (resa 51%) e 42 $\beta$  (resa 87%) puri come solidi cristallini.

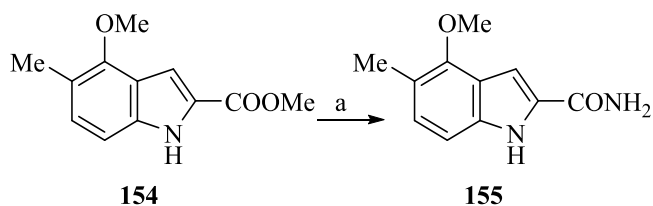




**Schema 2.40** – Reagenti e condizioni: a)  $\text{NH}_3$ -MeOH (7N)-MeOH 1:1 t.a.

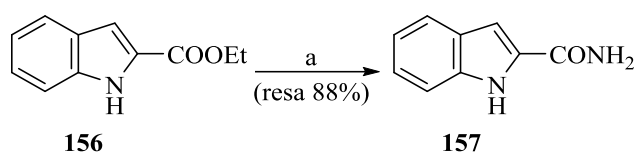
I glicocongiugati ammidici **41β** e **42β**, non noti in letteratura, sono stati completamente caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico ed i parametri spettroscopici sono in accordo con le strutture proposte. In particolare, negli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR di **41β** e **42β** la scomparsa dei segnali caratteristici del metossile estereo conferma la trasformazione dell'estere metilico, presente sulla porzione *N*-idrossiindolica, nella corrispondente amide primaria.

Una ricerca in letteratura<sup>97</sup> ha evidenziato che la conversione di esteri metilici tipo **154**, analoghi al derivato *N*-idrossiindolico **25**, in ammidi primarie come **155** può essere realizzata conducendo la reazione in  $\text{NH}_3$  e MeOH ad alte temperature (Schema 2.41).



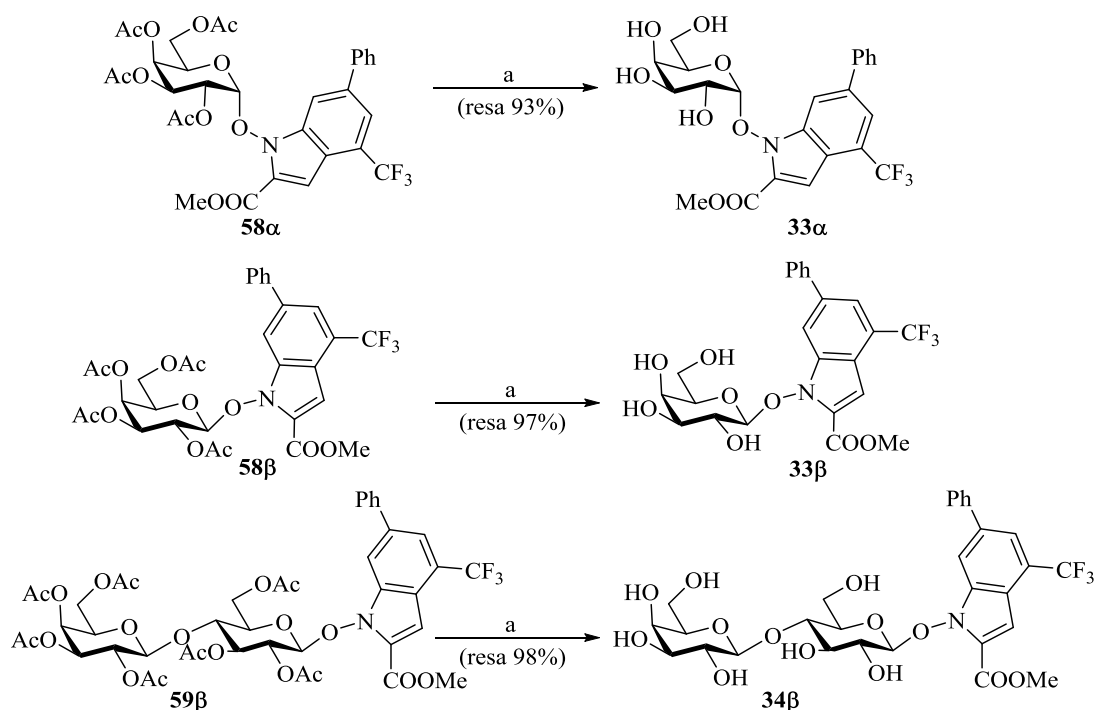
**Schema 2.41** – Reagenti e condizioni: a)  $\text{NH}_3$ -MeOH (7 N) 80°C (7 gg).

Vi sono pochissimi esempi in cui tale trasformazione avviene a temperatura ambiente. In particolare un lavoro di Csomós e coll.<sup>98</sup> (Schema 2.42) riporta che il derivato **156** è stato convertito in **157** (resa 88%) impiegando  $\text{NH}_3$ -MeOH in THF. Tale reazione richiede tuttavia tempi molto elevati se confrontati con quelli impiegati per ottenere i derivati **41β** e **42β** (16-18 ore).



**Schema 2.42** – Reagenti e condizioni: a)  $\text{NH}_3$ -MeOH, THF t.a. (35 gg).

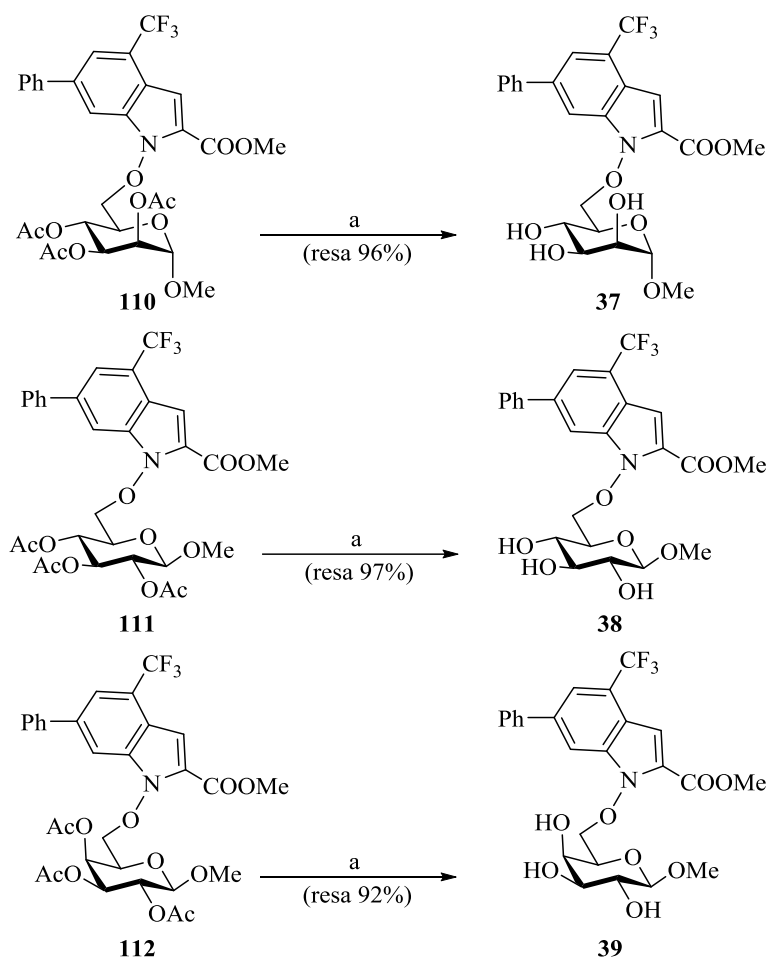
Alla luce dei risultati negativi sopra esposti, la reazione di desacetilazione dei derivati mono- e disaccaridici **58 $\alpha$** , **58 $\beta$**  e **59 $\beta$**  (Schema 2.43) è stata realizzata impiegando una miscela  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 2:3 (per garantire la completa solubilizzazione dei precursori), con quantità catalitiche di MeONa (MeONa/MeOH 0.33M) alla temperatura di  $0^\circ\text{C}$ . Dopo neutralizzazione con resina acida seguita da filtrazione ed eliminazione dei solventi a pressione ridotta, sono stati ottenuti dei grezzi schiumosi che all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR risultano costituiti esclusivamente dai glicoconiugati desiderati **33 $\alpha$**  (resa 93%), **33 $\beta$**  (resa 97%) e **34 $\beta$**  (resa 98%). La successiva triturazione con  $\text{Et}_2\text{O}$  ha permesso di ottenere i derivati **33 $\alpha$**  (resa 49%), **33 $\beta$**  (resa 66%) e **34 $\beta$**  (resa 74%) puri come solidi cristallini.



**Schema 2.43** – Reagenti e condizioni: a)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 2:3, MeONa-MeOH 0.33 M  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$

I composti **33a**, **33b** e **34b**, non noti in letteratura, sono stati completamente caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico ed i parametri spettroscopici sono in accordo con le strutture proposte.

La desacetilazione dei derivati monosaccaridici **110**, **111** e **112**, aventi l'unità *N*-idrossiindolica in posizione C-6 (*Schema 2.44*), condotta con MeONa in una miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 2:3 secondo quanto descritto precedentemente, ha fornito dei grezzi schiumosi che all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR risultano costituiti esclusivamente dai glicocongiugati desiderati **37** (resa 96%), **38** (resa 97%) e **39** (resa 92%). La successiva triturazione con Et<sub>2</sub>O ha permesso di ottenere i derivati **37** (resa 73%), **38** (resa 43%) e **39** (resa 76%) puri come solidi cristallini.

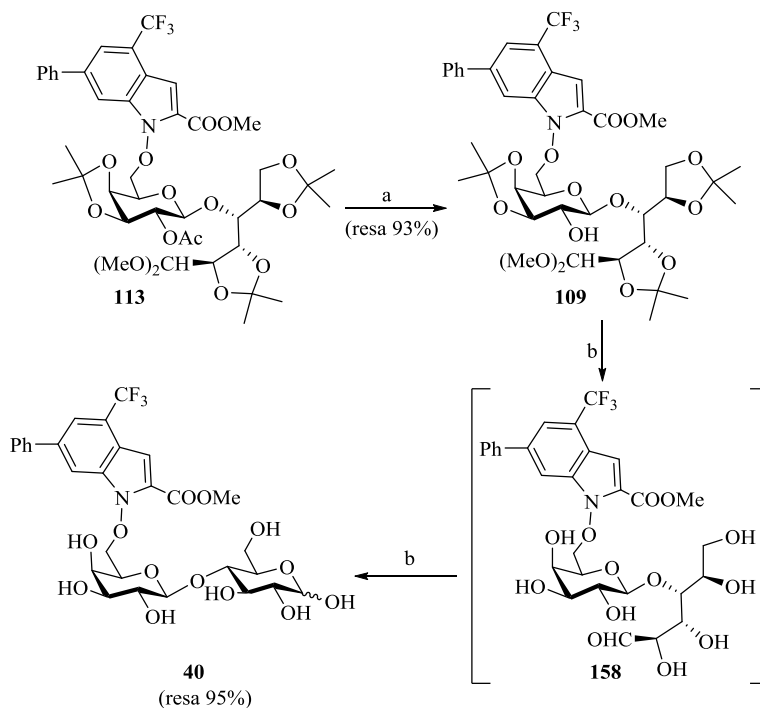


**Schema 2.44** – Reagenti e condizioni: a) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 2:3, MeONa-MeOH 0.33 M 0°C → t.a.

I glicocongiugati **37**, **38** e **39**, non noti in letteratura, sono stati completamente caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico ed i parametri spettroscopici sono in accordo con le strutture proposte.

Infine la preparazione del glicocongiugato disaccaridico completamente deproteetto **40** (Schema 2.45) è stata realizzata mediante una sequenza sintetica che ha previsto inizialmente la rimozione del gruppo acetilico in posizione C-2' di **113** (MeONa in MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) a dare il derivato **109**, seguita dalla rimozione dei gruppi isopropilidenici e dimetil acetalici con acido acetico acquoso.<sup>99</sup> Il derivato **109**, ottenuto in resa del 93% e non noto in letteratura, è stato completamente caratterizzato dal punto di vista chimico-fisico ed i parametri spettroscopici sono in accordo con la struttura proposta.

Una volta ottenuto il derivato **109** la sua trasformazione nel derivato **40** richiede condizioni sperimentali che consentano di rimuovere le funzioni acetaliche sia sull'unità riducente che sulla porzione acilica in modo da favorire l'emiacetalizzazione, attraverso la formazione dell'intermedio **158** (Schema 2.45) senza tuttavia scindere il legame glicosidico già esistente.



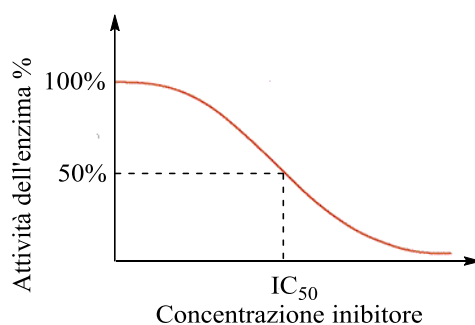
**Schema 2.45** – Reagenti e condizioni: a) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 2:3, MeONa-MeOH 0.33 M 0°C→t.a. (9 h); b) AcOH aq. all'80% 80°C (5 h).

Il riscaldamento con soluzioni acquose di AcOH è sufficiente a realizzare questa operazione. Il derivato **109** è stato quindi trattato con AcOH acquoso all'80% alla temperatura di 80°C. Trascorse 4 ore, concentrata la soluzione mediante coevaporazione con toluene, è stato ottenuto un grezzo sciropposo costituito esclusivamente dal saccaride riducente **40** (resa 95%). La successiva triturazione con Et<sub>2</sub>O ha permesso di ottenere il glicoconiugato **40** (resa 48%) come solido cristallino, che all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) si presenta come una miscela di anomeri α e β in rapporto 9:1 calcolato sulla base delle altezze dei segnali C-1 a δ 92.1 e 97.0 rispettivamente.

## 2.5 – Saggi enzimatici

Le attività inibitorie dei glicoconiugati **33α**, **33β**, **34β**, **37**, **38**, **39**, **40**, **41β** e **42β**, sintetizzati in questo lavoro di tesi, sono state valutate nei confronti dell'enzima *h*LDH-5 (Lee Biosolution, Inc.) nella reazione di conversione del piruvato a lattato. L'effetto di inibizione è stato determinato tramite misure di competizione col cofattore NADH e con il piruvato dalla Dott.ssa Granchi del gruppo di ricerca del Prof. Minutolo (Università di Pisa). In particolare, ogni composto, solubilizzato in DMSO, è stato testato in presenza di piruvato 200 μM, NADH 40 μM ed enzima *h*LDH-5 in tampone fosfato 100 mM (pH = 7.4). Dopo 15 minuti di incubazione, sono state effettuate le misure impiegando lo spettrofotometro Victor X3 Microplates Reader (PerkinElmer®). Poiché il NADH è fluorescente a λ = 340 nm, per monitorarne la quantità consumata e conseguentemente per verificare quanto il composto in esame è in grado di inibire l'enzima, sono state effettuate misure di fluorescenza (λ<sub>ex</sub> = 340 nm, λ<sub>em</sub> = 460 nm).

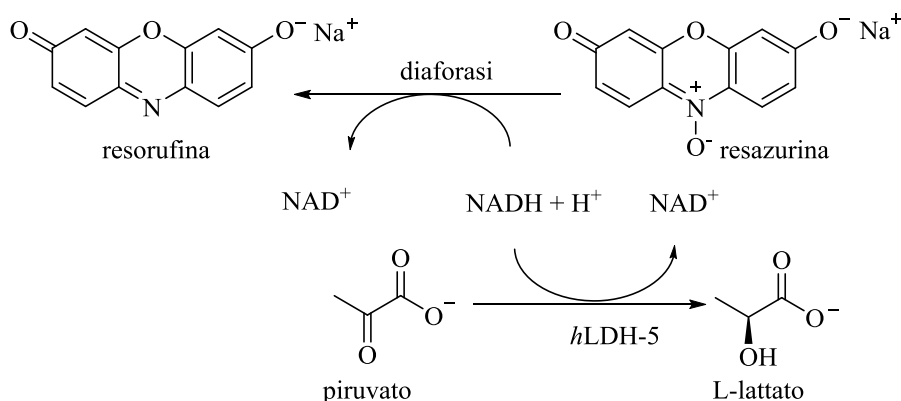
I saggi, condotti su una piastra per colture cellulari analizzando sette differenti concentrazioni del composto (analisi in duplicato per ogni concentrazione), hanno permesso di determinare il valore di IC<sub>50</sub> tramite una curva concentrazione-risposta. Tale curva mostra come varia l'attività % dell'enzima in funzione della concentrazione di inibitore (*Figura 2.13*). I valori di IC<sub>50</sub> sono stati calcolati impiegando come software GraphPad Prism (GraphPad – USA).



**Figura 2.13** – Curva concentrazione-risposta.

I composti testati che hanno mostrato un'elevata fluorescenza a  $\lambda = 340$  nm sono stati ulteriormente sottoposti ad un saggio accoppiato per evitare l'interferenza di tale fluorescenza con la misurazione dei valori di  $IC_{50}$ .

Tale saggio (*Schema 2.46*) ha previsto l'utilizzo di una seconda reazione nella quale l'enzima diaforasi converte il substrato resazurina nel composto resorufina utilizzando il NADH (non ossidato dall'enzima *hLDH-5*) come specie riducente; la resorufina che si forma è fluorescente a  $\lambda = 590$  nm ( $\lambda_{ex} = 560$  nm). Questa variazione di fluorescenza viene accompagnata anche da una variazione colorimetrica passando dal blu (forma ossidata, resazurina) al rosso (forma ridotta, resorufina).



**Schema 2.46** – Saggio accoppiato.

I composti sono stati testati sull'enzima in presenza di piruvato e NADH nelle condizioni classiche e, dopo 15 minuti di incubazione, nei pozzetti è stata aggiunta una soluzione contenente resazurina (15  $\mu$ M) e diaforasi. Le misure sono state eseguite

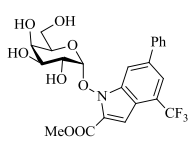
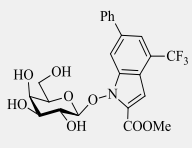
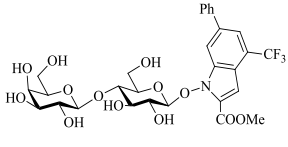
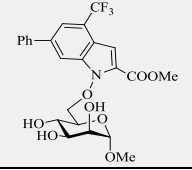
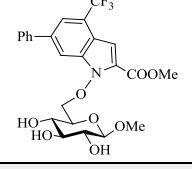
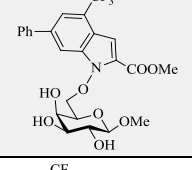
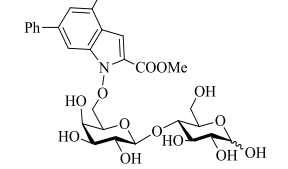
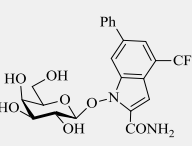
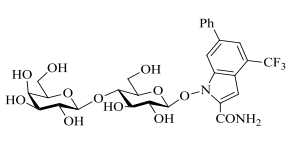
dopo ulteriori 30 minuti di incubazione. La quantità di resorufina prodotta è direttamente proporzionale alla quantità di NADH non ossidato dall'enzima *hLDH-5*. La fluorescenza misurata in questo secondo saggio è tanto più elevata quanto più efficace è stata l'inibizione del composto saggiato sull'enzima.

I valori di  $IC_{50}$  calcolati sulla base dei risultati dei saggi enzimatici effettuati sono riportati nella *Tabella 2.2*. Dai dati ottenuti, i composti **37**, **38** e **40** sono risultati inattivi. Tali glicoconiugati, aventi l'inibitore in posizione C-6, hanno fornito valori poco soddisfacenti a conferma di quanto riportato in una *review* di letteratura<sup>33</sup> in cui gli autori sostengono che l'agente citotossico in tale posizione diminuisce l'affinità della molecola per i trasportatori GLUT. I composti **42 $\beta$**  e **39**, seppur in grado di inibire l'enzima *hLDH-5*, presentano valori di  $IC_{50}$  troppo elevati mentre il glicoconiugato **41 $\beta$**  presenta un valore di  $IC_{50}$  meno attendibile a causa del fenomeno della fluorescenza. Quindi solo i glicoconiugati **33 $\alpha$** , **33 $\beta$**  e **34 $\beta$**  hanno mostrato un'interessante attività di inibizione nei confronti dell'enzima *hLDH-5 in vitro*.

I glicoconiugati **33 $\alpha$** , **33 $\beta$**  e **34 $\beta$**  che hanno mostrato un'attività di inibizione nei confronti dell'enzima *hLDH-5 in vitro* sono stati inviati al gruppo di ricerca del Prof. Hergenrother (University of Illinois, Urbana-Champaign) che ha effettuato saggi di citotossicità su cellule di tumore polmonare (A549). Dai risultati ottenuti il derivato **33 $\beta$**  presenta un valore di  $IC_{50} = 17.1 \pm 2.0 \mu M$ , **33 $\alpha$**  un valore di  $IC_{50} = 20.4 \pm 2.1 \mu M$  e **34 $\beta$**  un valore di  $IC_{50} > 100 \mu M$ .

Si può quindi ipotizzare che il trasportatore GLUT-1 (o GLUT-2), non specifico per il glucosio, sia in grado di trasportare all'interno della cellula glicoconiugati con unità monosaccaridiche diverse dal glucosio come i composti **33 $\alpha$**  e **33 $\beta$** . Viceversa, il glicoconiugato disaccaridico **34 $\beta$** , non venendo riconosciuto dal trasportatore, riesce più difficilmente a permeare all'interno della cellula.

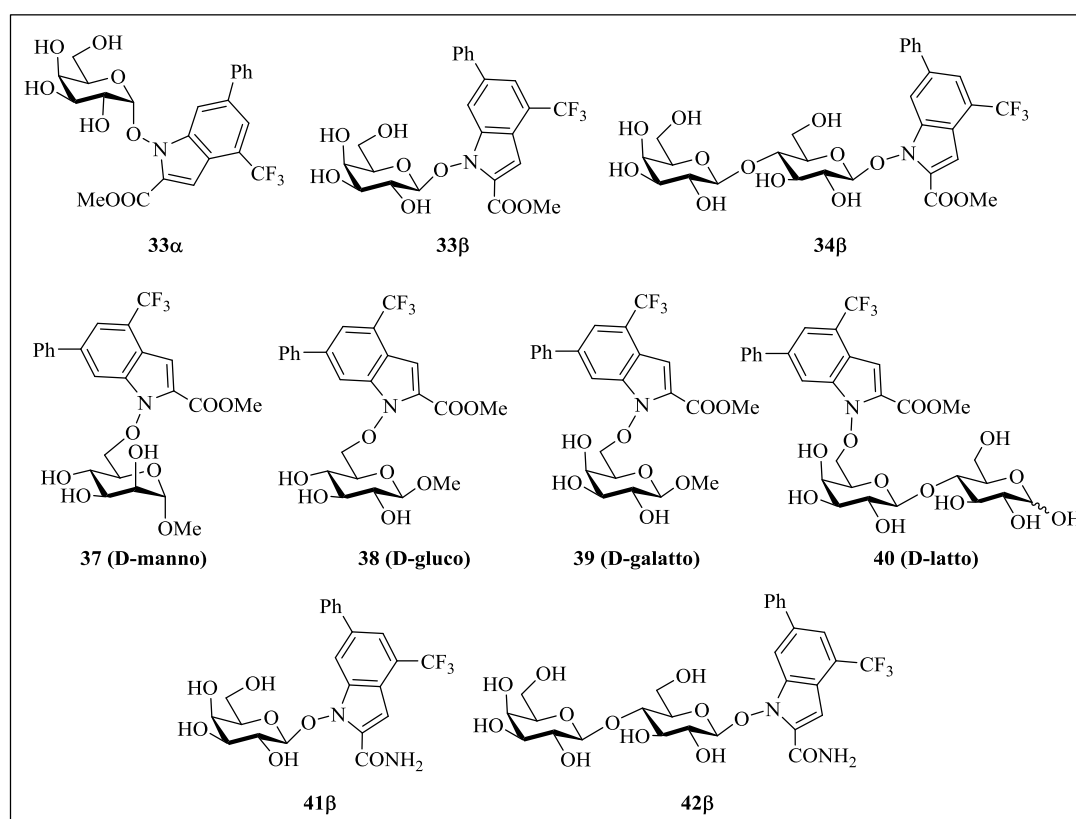
**Tabella 2.2** - Attività inibitoria (IC<sub>50</sub>, μM) dei derivati **33α**, **33β**, **34β**, **37**, **38**, **39**, **40**, **41β** e **42β** misurata *in vitro* sull'enzima hLDH-5.

| Composto   | Struttura   | Formula   | hLDH-5 IC <sub>50</sub> μM                                 |
|------------|---|---|--|
| <b>33α</b> |    | C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>8</sub>                | <b>63% 500 μM</b><br>(228.9 ± 16.3)                        |
| <b>33β</b> |    | C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>8</sub>                | <b>71% 500 μM</b><br>(246.0 ± 36.0)                        |
| <b>34β</b> |    | C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>13</sub>               | <b>54% 500 μM</b><br>(232.1 ± 46.8)                        |
| <b>37</b>  |   | C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>8</sub>                | <b>Inattivo</b><br><b>Fluorescente</b>                     |
| <b>38</b>  |  | C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>8</sub>                | <b>Inattivo</b><br><b>Fluorescente</b>                     |
| <b>39</b>  |  | C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>8</sub>                | <b>80% 500 μM</b><br>(100-300)<br><b>Fluorescente</b>      |
| <b>40</b>  |  | C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>13</sub>               | <b>Inattivo</b><br><b>Fluorescente</b>                     |
| <b>41β</b> |  | C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>  | <b>187.1 ± 13.4</b><br><b>Fluorescente</b>                 |
| <b>42β</b> |  | C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> | <b>64% 500 μM</b><br>(285.5 ± 23.6)<br><b>Fluorescente</b> |



## 2.6 – Conclusioni

Con l'ottenimento dei glicoconjugati **33 $\alpha$** , **33 $\beta$** , **34 $\beta$** , **37**, **38**, **39**, **40**, **41 $\beta$**  e **42 $\beta$**  (Figura 2.14) è stato raggiunto l'obiettivo prefissato in questo lavoro di tesi, volto alla sintesi di nuovi glicoconjugati contenenti l'unità *N*-idrossiindolica, dotata di azione antitumorale, legata in posizione anomERICA o in posizione C-6, a zuccheri mono- e disaccaridici. Ciò ha permesso di valutare come cambia il rapporto struttura-attività al variare del tipo di saccaride e della posizione di legame dell'agente citotossico.



**Figura 2.14** – Target sintetici ottenuti.

Su tutti i composti sintetizzati sono stati effettuati saggi enzimatici *in vitro* al fine di valutare l'attività inibitoria nei confronti dell'enzima *h*LDH-5 nella reazione di conversione del piruvato a lattato.

Solo i glicoconjugati **33 $\alpha$** , **33 $\beta$**  e **34 $\beta$**  hanno mostrato un'interessante attività di inibizione nei confronti dell'enzima *h*LDH-5 mentre i composti **37**, **38**, **39**, **40**, **41 $\beta$**  e **42 $\beta$**  hanno fornito un'inibizione poco soddisfacente.

I glicoconiugati più promettenti (**33 $\alpha$** , **33 $\beta$** , **34 $\beta$** ), sono stati inviati al gruppo di ricerca del Prof. Hergenrother (University of Illinois, Urbana-Champaign) che ha effettuato ulteriori saggi di citotossicità su cellule di tumore polmonare (A549). Dai risultati preliminari è emerso che i derivati monosaccaridici **33 $\alpha$**  e **33 $\beta$**  presentano valori di IC<sub>50</sub> soddisfacenti, mentre il derivato disaccaridico è poco attivo.

Sulla base dei risultati biologici ottenuti, si può ipotizzare che i composti **33 $\alpha$**  e **33 $\beta$**  (della serie D-galatto) riescono a permeare all'interno della cellula più facilmente del glicoconiugato **34 $\beta$** . Questi risultati, insieme ai dati ottenuti in ricerche precedenti, permettono di confermare che i trasportatori GLUT-1 e GLUT-2 non sono specifici per il glucosio perchè sono in grado di trasportare altre unità monosaccaridiche analoghe al glucosio. Viceversa il glicoconiugato **34 $\beta$** , per la sua natura disaccaridica, non può sfruttare efficacemente i trasportatori GLUT-1 e GLUT-2, quindi penetra con più difficoltà all'interno della cellula e risulta meno attivo.

Anche i glicoconiugati **33 $\alpha$**  e **33 $\beta$** , come il gluco-, manno- e gulo- glicoconiugati precedentemente sintetizzati e saggiati, si sono dimostrati estremamente efficaci nel determinare un innovativo “*doppio bersagliamento dell'effetto Warburg*”, andando ad aumentare drasticamente la concentrazione intracellulare di agente citotossico e andando ad inibire efficacemente l'enzima *hLDH-5*.

## 3 - Parte sperimentale

### 3.1 – Metodiche generali: reattivi, solventi e strumentazione

I punti di fusione sono stati determinati al microscopio su apparecchio Kofler, senza correzione. Le misure del potere ottico rotatorio sono state effettuate con PerkinElmer Polarimeter modello 241 ed ATAGO AP-300 Automatic Polarimeter, alla temperatura di 25°C.

Gli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono stati registrati con uno spettrometro Bruker Avance II 250 operante alla frequenza di 250.13 MHz per il protone e di 52.90 MHz per il carbonio, impiegando come riferimento interno  $\text{CD}_3\text{CN}$  nel caso della registrazione in  $\text{D}_2\text{O}$  e tetrametilsilano (TMS) in tutti gli altri casi. La determinazione dei parametri spettroscopici di tutti i composti preparati in questo lavoro di tesi è stata effettuata attraverso l'uso di tecniche NMR monodimensionali ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e bidimensionali (DEPT-135, COSY, HETCOR, HSQC). Nel caso della caratterizzazione spettroscopica di prodotti in miscela, le attribuzioni sono state basate sulle differenze delle intensità relative ai segnali  $^{13}\text{C}$  NMR o sui valori degli integrali relativi ai segnali protonici. Nell'attribuzione dei picchi sono state usate le seguenti abbreviazioni: s = singoletto; bs = singoletto slargato; d = doppietto; t = tripletto; bt = tripletto slargato, q = quartetto; qn = quintetto; dd = doppio doppietto; dt = doppio tripletto; dq = doppio quartetto.

Le TLC analitiche sono state effettuate impiegando fogli di silice supportata su alluminio di tipo Merck TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>. La rivelazione dei composti è stata effettuata sia usando una lampada UV (CAMAG,  $\lambda = 254$  nm) che mediante rivelazione chimica immergendo i fogli in una soluzione etanolica al 10% (v/v) di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e/o soluzione etanolica al 10% (m/v) di acido fosfomolibdico ( $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) e scaldando.

Le purificazioni cromatografiche sono state eseguite su gel di silice Kieselgel 60 Merk (230-400 *mesh*) per *flash*-cromatografia su colonna. Le miscele dei solventi usate nelle reazioni e nelle purificazioni cromatografiche sono riportate come v/v. Spesso le purificazioni *flash*-cromatografiche sono state eseguite utilizzando Isolera

Four Biotage<sup>®</sup>, un sistema automatizzato munito di *detector* UV a lunghezza d'onda variabile ( $\lambda = 200\text{-}400\text{ nm}$ ).

Come agenti anidrificanti sono stati impiegati  $\text{MgSO}_4$  o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidri.

Le operazioni coinvolgenti composti sensibili all'aria e all'umidità sono state condotte in atmosfera inerte, impiegando vetreria anidrificata per riscaldamento a fiamma o in stufa a  $120^\circ\text{C}$  per una notte. Le reazioni che richiedono un ambiente anidro sono state condotte in atmosfera di Ar o  $\text{N}_2$  in un pallone munito di chiusura con setto di gomma e le aggiunte successive, se necessarie, effettuate con una siringa. Se non diversamente specificato, i solventi ed i reagenti necessari sono stati impiegati come forniti dal produttore (Sigma-Aldrich, Fluka, Alfa Aesar) senza ulteriori purificazioni.

I solventi anidri come dimetilformammide (DMF), piridina, diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), 1,2-dimetossietano (DME), acetonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), metanolo (MeOH) e tetraidrofurano (THF) sono quelli commerciali, garantiti dai produttori (Fluka e Sigma-Aldrich), confezionati in bottiglie con tappo "Sure-Seal". Gli altri solventi anidri utilizzati nelle reazioni sono stati purificati come segue e conservati sotto atmosfera di Ar su setacci molecolari  $4\text{Å}$  attivati.

Il toluene ed il dietilere sono stati fatti rifluire su sodio e distillati prima dell'uso.

L'idruro di sodio (NaH) è stato impiegato al 60% in olio minerale e prima dell'uso è stato lavato con *n*-esano (due volte) ed  $\text{Et}_2\text{O}$  (una volta).

Le resine acide commerciali come Amberlite<sup>®</sup> IR-120 *hydrogen form*, Amberlite<sup>®</sup> IRC-50 *hydrogen form* e Amberlyst-15 sono state preventivamente lavate con MeOH e conservate in essiccatore munito di  $\text{CaCl}_2$ .

I setacci molecolari AW-300 (Alfa Aesar) ed i setacci molecolari  $4\text{Å}$  (Sigma-Aldrich) sono stati preventivamente attivati tramite riscaldamento in stufa per circa 12 ore a  $120^\circ\text{C}$  e successivamente raffreddati a temperatura ambiente in essiccatore munito di  $\text{CaCl}_2$ .

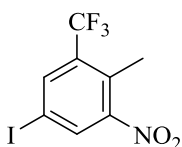
Il lattosio e l'acido *p*-toluensolfonico (TsOH) anidro commerciali (Sigma-Aldrich) sono stati essiccati per 8-12 ore a  $50^\circ\text{C}$  a pressione ridotta (0.01 mmHg) prima del loro utilizzo.

La 4-metilmorfolina *N*-ossido (NMO) impiegata è quella commerciale (Sigma-Aldrich) anidrificata in soluzione diclorometanica su  $\text{MgSO}_4$ .

## 3.2 – Preparazione del derivato *N*-idrossiindolico (NHI, 25)

### 3.2.1 – Preparazione del 5-iodo-2-metil-1-nitro-3-(trifluorometil)benzene (**44**)

In un pallone a due colli da 100 mL sono stati solubilizzati 8.23 g (36.6 mmoli, 1.5 eq) di *N*-iodosuccinimide (NIS) in 22.0 mL di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%) e la soluzione è stata mantenuta in agitazione magnetica a 0°C. Dopo 40 minuti è stata addizionata, goccia a goccia, una soluzione costituita da 5.00 g (24.4 mmoli, 1.0 eq) di 2-metil-3-nitrobenzotrifloruro (**43**) in 15.0 mL di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96%. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione prima a 5-10°C (5 ore) poi a temperatura ambiente (16 ore) ed infine gocciolata in 300 mL di acqua fredda. La soluzione ottenuta è stata estratta con AcOEt (2 × 300 mL). Le fasi organiche riunite, lavate prima con una soluzione satura di Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (2 × 300 mL) e successivamente con una soluzione satura di NaCl (2 × 300 mL), sono state infine anidrificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dopo filtrazione ed eliminazione del solvente a pressione ridotta, è stato ottenuto un grezzo che all'analisi <sup>1</sup>H NMR è risultato costituito esclusivamente dal derivato **44** (7.69 g, resa 95%).

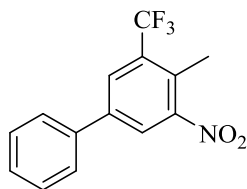


Il prodotto **44** è un solido giallo che presenta caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>37</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.19 (d, 1H, *J*<sub>meta</sub> 1.8 Hz, Ar-H), 8.15 (d, 1H, *J*<sub>meta</sub> 1.8 Hz, Ar-H), 2.50 (q, 3H, *J* 1.5 Hz, CH<sub>3</sub>). I parametri <sup>1</sup>H NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>37</sup>

### 3.2.2 – Preparazione del 4-metil-3-nitro-5-(trifluorometil)bifenile (**45**)

Sotto atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), in una fiala sono stati solubilizzati 59.4 mg (0.23 mmoli, 0.15 eq) di PPh<sub>3</sub> in una miscela 1:1 di toluene anidro ed etanolo assoluto (6.8 mL). Successivamente sono stati addizionati 10.2 mg (0.04 mmoli, 0.03 eq) di Pd(OAc)<sub>2</sub> e la soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 10 minuti sono stati aggiunti, in successione, 500 mg (1.51 mmoli, 1.0 eq) di **44**, 3.4 mL di una soluzione acquosa 2 M di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 295 mg (2.42 mmoli, 1.6 eq) di PhB(OH)<sub>2</sub> e la soluzione è stata lasciata in agitazione a 100°C per la notte. Dopo diluizione con acqua (40.0 mL), la miscela di reazione è stata estratta con AcOEt (2 × 50.0 mL). Le fasi organiche riunite, anidrificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate ed evaporate a pressione ridotta hanno fornito un grezzo di consistenza sciropposa (11.3 g) che,

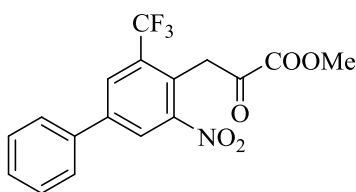
purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice (*n*-esano-AcOEt 99:1), ha permesso di isolare 400 mg di 4-metil-3-nitro-5-(trifluorometil)bifenile (**45**) (resa 94%), puro all'analisi  $^1\text{H}$  NMR.



Il prodotto **45** è un solido giallo che presenta caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>2</sup>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.10 (d, 1H,  $J_{\text{meta}}$  1.8 Hz, Ar-H), 8.07 (d, 1H,  $J_{\text{meta}}$  1.8 Hz, Ar-H), 7.58-7.61 (m, 2H, Ar-H), 7.43-7.53 (m, 3H, Ar-H), 2.60 (q, 3H,  $J_{\text{H,F}}$  1.4 Hz,  $\text{CH}_3$ ). I parametri  $^1\text{H}$  NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>2</sup>

### 3.2.3 – Preparazione del 3-nitro-5-(trifluorometil)bifenile-4-il)-2-oxo-3-propanoato di metile (**46**)

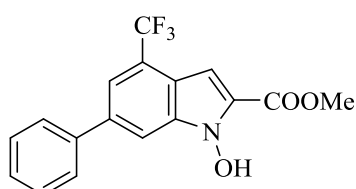
In un pallone a due colli da 100 mL sono stati addizionati, in atmosfera inerte, 1.20 g di *t*-BuOK (10.7 mmoli, 2.0 eq) e 17.4 mL di  $\text{Et}_2\text{O}$  anidro ed alla sospensione, raffreddata a  $0^\circ\text{C}$ , sono stati addizionati 1.7 mL di MeOH anidro. Dopo completa dissoluzione del solido, sono stati addizionati 1.26 g (10.7 mmoli, 2.0 eq) di dimetilossalato ( $\text{COOMe}$ )<sub>2</sub> e la miscela così ottenuta è stata mantenuta in agitazione a  $0^\circ\text{C}$ . Dopo 15 minuti è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione formata da 1.50 g (5.33 mmoli, 1.0 eq) di **45** in 6.9 mL di  $\text{Et}_2\text{O}$  anidro e la soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 12 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 9:1) ha evidenziato la completa scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.69) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.35. La miscela di reazione è stata acidificata ( $\text{pH} = 3$ ) con una soluzione acquosa di HCl 1 N e la soluzione è stata estratta con AcOEt ( $2 \times 50.0$  mL). Le fasi organiche riunite, anidificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate ed evaporate a pressione ridotta hanno fornito un grezzo (2.10 g) che è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo prima con *n*-esano-AcOEt 9:1 e successivamente con *n*-esano-AcOEt 8:2. È stato isolato il prodotto **46** (1.60 g, resa 82%) puro che, all'analisi  $^1\text{H}$  NMR, si è presentato come una miscela tra la forma chetonica e quella enolica in rapporto 9:1, calcolato sulla base degli integrali relativi ai segnali dei protoni aromatici a  $\delta$  8.45 e 8.23 rispettivamente.



Il prodotto **46** è un solido giallo avente  $R_f$  0.35 (*n*-esano-AcOEt 9:1) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>2</sup>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : *forma chetonica*: 8.45 (d, 1H,  $J_{\text{meta}}$  1.8 Hz, Ar-H), 8.19 (d, 1H,  $J_{\text{meta}}$  1.8 Hz, Ar-H), 7.65-7.49 (m, 5H, Ar-H), 4.71 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.98 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ); *forma enolica*: 8.23 (d, 1H,  $J_{\text{meta}}$  1.8 Hz, Ar-H), 8.12 (d, 1H,  $J_{\text{meta}}$  1.8 Hz, Ar-H), 7.65-7.49 (m, 5H, Ar-H), 6.81 (m, 1H,  $\text{CH}=\text{C}$ ), 6.20 (d, 1H,  $J_{\text{H,OH}}$  1.6 Hz), 3.92 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ). I parametri  $^1\text{H}$  NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>2</sup>

### 3.2.4 – Preparazione dell'1-idrossi-6-fenil-4-(trifluorometil)-1H-indolo-2-carbossilato di metile (**25**)

In un pallone a due colli da 25 mL, contenente setacci molecolari 4Å preventivamente attivati (265 mg) e sotto atmosfera inerte, sono stati addizionati 920 mg di  $\text{SnCl}_2$  anidro (4.85 mmoli, 2.5 eq) e 2.0 mL di 1,2-dimetossietano anidro (DME). La sospensione è stata raffreddata a 0°C ed è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione formata da 720 mg (1.94 mmoli, 1.0 eq) di **46** in DME anidro (1.8 mL). La soluzione è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente e, dopo 21 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 85:15) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.38) e la formazione di un prodotto largamente prevalente avente  $R_f$  0.20. Dopo filtrazione della miscela di reazione ed eliminazione del solvente a pressione ridotta, è stato ottenuto un grezzo (650 mg) purificato poi mediante *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo prima con *n*-esano-AcOEt 85:15 e successivamente con *n*-esano-AcOEt 4:1. È stato isolato il derivato indolico **25** (527 mg), puro all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR, con resa dell'81%.



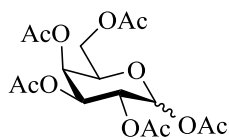
Il composto **25** è un solido giallo avente  $R_f$  0.20 (*n*-esano-AcOEt 85:15) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>2</sup>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 10.5 (bs, 1H, OH), 7.91-7.93 (m, 1H, Ar-H), 7.69-7.71 (m, 3H, Ar-H), 7.47-7.52 (m, 2H, Ar-H), 7.39-7.42 (m, 1H, Ar-H), 7.21 (dq, 1H,  $J_{\text{meta}}$  1.6, 1.0 Hz, Ar-H), 4.04 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 164.3 (C=O), 140.2, 138.4, 135.3, 134.2 (4 × Ar-C), 129.1, 128.1 (2 × Ar-CH), 127.5, 125.1

(2 × Ar-CH), 124.4 (q,  $J_{C-F}$  270.4 Hz, CF<sub>3</sub>), 125.1, 122.5 (q,  $J$  32.8 Hz, Ar-CH, Ar-C), 119.1 (q,  $J$  4.6 Hz, Ar-C), 111.3, 102.3 (2 × Ar-CH), 52.9 (OCH<sub>3</sub>). I parametri <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>2</sup>

### 3.3 – Preparazione di glicoconiugati anomericici

#### 3.3.1 – Preparazione del 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha,\beta$ -D-galattopiranosio (**92**)

In un pallone da 100 mL sono stati addizionati 2.50 g (13.9 mmoli, 1.0 eq) di D-galattosio commerciale (**90**), 15.0 mL di una miscela 2:1 di piridina e anidride acetica e la sospensione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 20 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 3:7) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza **90** ( $R_f$  0.02) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.71. L'eliminazione dei reagenti a pressione ridotta mediante coevaporazione con toluene (4 × 30.0 mL) ha fornito un grezzo (5.50 g) che è stato purificato mediante *flash*-cromatografia con il sistema Isolera Four Biotage® eluendo con *n*-esano-AcOEt 6:4. È stato isolato il 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\alpha,\beta$ -D-galattopiranosio (**91**, 4.99 g, resa 92%) che all'analisi <sup>13</sup>C NMR si è presentato come una miscela di anomeri **91 $\alpha$**  e **91 $\beta$**  in rapporto 7:3, calcolato sulla base delle altezze relative ai segnali C-1 a  $\delta$  89.6 e 92.0 rispettivamente.

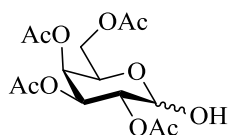


La miscela di anomeri **91 $\alpha$**  e **91 $\beta$**  è una schiuma bianca avente  $R_f$  0.71 (*n*-esano-AcOEt 3:7) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>58,59</sup> <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170.3, 170.1, 169.8, 169.3, 168.9 (5 × CH<sub>3</sub>CO,  $\alpha,\beta$ ), 92.0 (C-1,  $\beta$ ), 89.6 (C-1,  $\alpha$ ), 71.56, 70.7, 67.7, 66.7 (C-2, C-3, C-4, C-5,  $\beta$ ), 68.6, 67.3, 67.2, 66.3 (C-2, C-3, C-4, C-5,  $\alpha$ ), 61.1 (C-6,  $\alpha$ ), 60.9 (C-6,  $\beta$ ), 20.7 (5 × CH<sub>3</sub>CO,  $\alpha,\beta$ ).

In un pallone da 50 mL, munito di agitatore magnetico e refrigerante a bolle con tappo a CaCl<sub>2</sub>, sono stati solubilizzati 170 mg (1.85 mmoli, 1.2 eq) di NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·AcOH in 15.0 mL DMF anidra. Successivamente sono stati addizionati 600 mg (1.54 mmoli, 1.0 eq) di **91** e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a 60°C. Dopo 2 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 3:7) ha evidenziato la scomparsa del prodotto di partenza ( $R_f$  0.71) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.59. Dopo



eliminazione del solvente a pressione ridotta, il residuo è stato ripartito fra CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20.0 mL) ed una soluzione acquosa satura di NaCl (20.0 mL). Dopo separazione delle fasi, la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 30.0 mL). Le fasi organiche riunite, anidrificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e concentrate a pressione ridotta hanno fornito un grezzo (450 mg) che è stato purificato mediante *flash*-cromatografia con il sistema Isolera Four Biotage<sup>®</sup> eluendo con *n*-esano-AcOEt 1:1. È stato isolato il derivato **92** (401 mg, resa 75%) che all'analisi <sup>13</sup>C NMR si è presentato come una miscela di anomeri **92α** e **92β** in rapporto 4:1 calcolato sulla base delle altezze relative ai segnali C-1 a δ 89.9 e 95.1 rispettivamente.

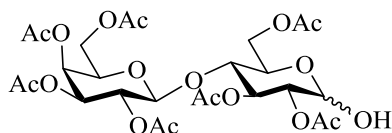


La miscela di anomeri **92α** e **92β** è una schiuma bianca avente R<sub>f</sub> 0.59 (*n*-esano-AcOEt 3:7) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>60,61</sup> <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 170.4, 170.2, 170.1, 169.9 (4 × CH<sub>3</sub>CO, α,β), 95.1 (C-1, β), 89.9 (C-1, α), 70.3, 70.1 (C-3, C-5, β), 68.1, 67.8 (C-2, C-4, β), 68.0, 67.7, 66.9, 65.4 (C-2, C-3, C-4, C-5, α), 63.3 (C-6, α), 61.1 (C-6, β), 20.3-20.1 (4 × CH<sub>3</sub>CO, α,β). I parametri <sup>13</sup>C NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>60,61</sup>

### 3.3.2 – Preparazione del 4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galattopiranosil)-2,3,6-tri-*O*-acetil-α,β-D-glucopiranosio (**95**)

In un pallone da 50 mL, munito di agitatore magnetico e refrigerante a bolle con tappo a CaCl<sub>2</sub>, sono stati solubilizzati 498 mg (5.41 mmoli, 3.7 eq) di NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·AcOH in 20.0 mL DMF anidra. Successivamente sono stati addizionati 1.00 g (1.47 mmoli, 1.0 eq) di 4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galattopiranosil)-1,2,3,6-tetra-*O*-acetil-α,β-D-glucopiranosio (**94**) commerciale, facilmente ottenibile per acetilazione convenzionale, anidride acetica-piridina 1:2 da D-lattosio (**93**) e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a 60°C. Dopo 9 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 2:8) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza (R<sub>f</sub> 0.56) e la formazione di un unico prodotto avente R<sub>f</sub> 0.44. Eliminato il solvente a pressione ridotta, il residuo è stato ripartito fra CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15.0 mL) ed una soluzione satura di NaCl (15.0 mL); la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 15.0 mL) e le fasi organiche riunite sono state anidrificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e concentrate a pressione ridotta. La

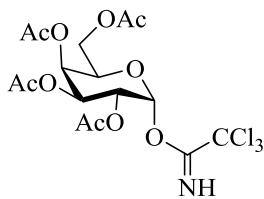
purificazione del grezzo (620 mg) mediante *flash*-cromatografia, utilizzando il sistema Isolera Four Biotage<sup>®</sup> ed eluendo con *n*-esano-AcOEt 9:1, ha fornito il derivato **95** (571 mg, resa 61%) che all'analisi <sup>13</sup>C NMR si è presentato come una miscela di anomeri **95α** e **95β** in rapporto 75:25 calcolato sulla base delle altezze relative ai segnali C-1 a δ 89.6 e 94.7 rispettivamente.



La miscela di anomeri **95α** e **95β** è una schiuma bianca avente  $R_f$  0.44 (*n*-esano-AcOEt 2:8) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>62</sup> <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 171.2, 170.4, 170.2, 170.1, 169.9, 169.6, 168.9 (7 × CH<sub>3</sub>CO, α,β), 100.7 (C-1', α,β), 94.7 (C-1, β), 89.6 (C-1, α), 76.1, 72.8, 72.5, 72.3, 71.2, 70.8, 70.3, 69.4, 68.8, 67.7, 66.4 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5', α,β), 61.7, 60.6, 60.5, 60.2 (C-6, C-6', α,β), 20.6-20.4 (7 × CH<sub>3</sub>CO, α,β). I parametri <sup>13</sup>C NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>62</sup>

### 3.3.3 – Preparazione del 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-galattopiranosil-tricloroacetimmidato (**88α**)

In un pallone da 25 mL sono stati solubilizzati, sotto atmosfera di Ar, 359 mg (1.03 mmoli, 1.0 eq) di **92** in 2.8 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro, sono stati addizionati 0.62 mL (6.18 mmoli, 6.0 eq) di CCl<sub>3</sub>CN e la soluzione è stata raffreddata a 0°C. Dopo 5 minuti, sono stati addizionati 81 μL di una miscela 1:9 di DBU-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro (0.056 mmoli di DBU, 0.05 eq) e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 1 ora, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 1:1) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.24) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.47. Eliminato il solvente a pressione ridotta, il grezzo (480 mg) è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo con *n*-esano-AcOEt 6:4. È stato isolato il tricloroacetimmidato **88α** (377 mg, resa 74%) puro all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.

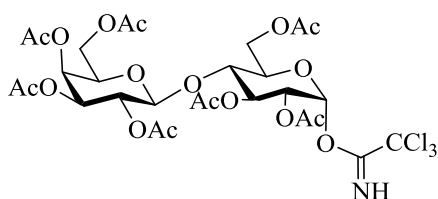


Il derivato (**88α**) è un solido schiumoso bianco avente  $R_f$  0.47 (*n*-esano-AcOEt 1:1) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>63,64</sup>  $[\alpha]_D^{25} +115$  ( $c$  1.0, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.56 (s, 1H, NH), 6.48 (d, 1H,  $J_{1,2}$  3.2 Hz, H-1), 5.43 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  2.8 Hz,  $J_{4,5}$  1.3 Hz, H-4), 5.47 (dd,  $J_{2,3}$  10.8

Hz, H-3), 5.23 (dd, 1H, H-2), 4.32 (ddd, 1H,  $J_{5,6a}$  6.8 Hz,  $J_{5,6b}$  6.5 Hz, H-5), 4.04 (dd,  $J_{6a,6b}$  11.2 Hz, H-6b), 3.93 (dd, 1H, H-6a), 2.04, 1.90, 1.89, 1.88 (4s, each 3H, CH<sub>3</sub>CO). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 170.2, 170.1, 170.0, 169.9 (4 × CH<sub>3</sub>CO), 160.8 (C=N), 93.4 (C-1), 90.7 (CCl<sub>3</sub>), 68.9 (C-5), 67.4 (C-4), 67.3 (C-2), 66.8 (C-3), 61.2 (C-6), 20.6-20.5 (4 × CH<sub>3</sub>CO). I parametri <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>63,64</sup>

### 3.3.4 – Preparazione del 4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galattopiranosil)-2,3,6-tri-*O*-acetil-α-D-glucopiranosil tricloroacetimidato (**89a**)

In un pallone da 25 mL sono stati solubilizzati, sotto atmosfera di Ar, 500 mg (0.79 mmoli, 1.0 eq) di 4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galattopiranosil)-2,3,6-tri-*O*-acetil-α,β-D-glucopiranosio (**95**) in 3.8 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro, sono stati addizionati 0.47 mL (4.74 mmoli, 6.0 eq) di CCl<sub>3</sub>CN e la soluzione è stata raffreddata a 0°C. Dopo 5 minuti, sono stati addizionati 61 μL di una miscela 1:9 di DBU-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro (0.043 mmoli di DBU, 0.05 eq) e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 5 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 3:7) ha evidenziato la scomparsa del prodotto di partenza ( $R_f$  0.38) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.65. Eliminato il solvente a pressione ridotta, il grezzo (545 mg) è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo con *n*-esano-AcOEt 4:6. È stato isolato il tricloroacetimidato **89a** (494 mg, resa 80%) puro all'analisi <sup>13</sup>C NMR.



Il derivato (**89a**) è una schiuma bianca avente  $R_f$  0.65 (*n*-esano-AcOEt 3:7) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>63,64</sup>  $[\alpha]_D^{25} +95$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 170.1-168.9 (7 × CH<sub>3</sub>CO), 160.7 (C=N), 101.0 (C-1'), 92.6 (C-1), 90.4 (CCl<sub>3</sub>), 75.7, 70.9, 70.7, 70.4, 69.7, 69.3, 68.8, 66.4 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'), 61.2, 60.5 (C-6, C-6'), 20.6-20.3 (7 × CH<sub>3</sub>CO). I parametri <sup>13</sup>C NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>63,64</sup>

### 3.3.5 – Procedure generali per la reazione di glicosilazione

**Metodo A:** [con TMSOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] - In uno *Schlenk* da 50 mL, sfiammato e sotto atmosfera inerte (Ar), sono stati solubilizzati il glicosil accettore **25** (1.00 mmoli, 1.0 eq) e l'appropriato glicosil donatore (1.30 mmoli, 1.3 eq) in 10.0 mL di toluene anidro. La soluzione è stata portata a secco ed il residuo lasciato sotto il vuoto della pompa meccanica per 2 ore in modo da eliminare eventuali tracce di acqua. Il residuo è stato poi solubilizzato in 10.0 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro e la soluzione è stata mantenuta in agitazione a 0°C sotto atmosfera inerte, in presenza di setacci molecolari attivati AW-300 (500 mg). Dopo 30 minuti, sono stati aggiunti 2.0 mL di una soluzione 0.1 M di TMSOTf in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro (0.20 mmoli di TMSOTf, 0.2 eq); la soluzione è stata lasciata in agitazione prima a 0°C (30 minuti) e successivamente a temperatura ambiente. Dopo aver verificato la scomparsa di **25** mediante analisi TLC, la miscela di reazione, diluita con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, è stata neutralizzata con Et<sub>3</sub>N e filtrata su strato di Celite. Dopo eliminazione del solvente a pressione ridotta, il grezzo è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice.

**Metodo B:** [con TMSOTf, CH<sub>3</sub>CN] - In uno *Schlenk* da 50 mL, sfiammato e sotto atmosfera inerte (Ar), sono stati addizionati il glicosil accettore **25** (1.00 mmoli, 1.0 eq) e l'appropriato glicosil donatore (1.30 mmoli, 1.3 eq) in 10.0 mL di toluene anidro. La soluzione è stata portata a secco ed il residuo lasciato sotto il vuoto della pompa meccanica per 2 ore in modo da eliminare eventuali tracce di acqua. Al residuo, sotto atmosfera inerte, sono stati addizionati 10.0 mL di CH<sub>3</sub>CN anidro, 500 mg di setacci molecolari attivati AW-300 e, raffreddato il sistema a 0°C, sono stati addizionati 2.0 mL di una soluzione 0.1 M di TMSOTf in CH<sub>3</sub>CN anidro (0.20 mmoli di TMSOTf, 0.2 eq). La miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione prima a 0°C (30 minuti) e successivamente a temperatura ambiente seguendo l'evolvere della reazione mediante analisi TLC. Evidenziata la scomparsa del glicosil accettore, la miscela di reazione è stata diluita con CH<sub>3</sub>CN, neutralizzata con Et<sub>3</sub>N e filtrata su strato di Celite. Eliminato il solvente a pressione ridotta, il grezzo è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice.

**Metodo C:** [con  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ] - In un pallone da 100 mL collegato al vuoto della pompa meccanica, l'appropriato glicosil donatore (1.50 mmoli, 1.5 eq) è stato preventivamente essiccato per 1 ora e successivamente sono stati aggiunti 25.7 mL di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro ed il glicosil accettore **25** (1.00 mmoli, 1.0 eq). La soluzione così ottenuta è stata trasferita, sotto atmosfera inerte, in uno *Schlenk* da 100 mL contenente setacci molecolari attivati AW-300 (500 mg) ed il sistema lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo raffreddamento a  $-10^\circ\text{C}$ , sono stati aggiunti 160  $\mu\text{L}$  (1.30 mmoli, 1.3 eq) di  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  e la sospensione è stata poi lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo aver verificato la scomparsa di **25** tramite analisi TLC, la miscela di reazione è stata diluita con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , neutralizzata con  $\text{Et}_3\text{N}$  e filtrata su strato di Celite. L'eliminazione del solvente a pressione ridotta ha fornito un grezzo che è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice.

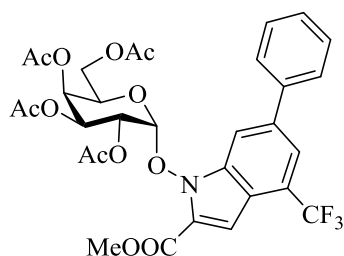
**3.3.5.1 – Preparazione dell'1-idrossi-6-fenil-4-(trifluorometil)-1H-indolo-2-metilcarbossilato-2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galattopiranoside (58 $\beta$ ) e dell'1-idrossi-6-fenil-4-(trifluorometil)-1H-indolo-2-metilcarbossilato-2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galattopiranoside (58 $\alpha$ )**

**Prova 1:** [con  $\text{TMSOTf}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ] – La reazione di glicosilazione è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale (*Metodo A*), conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 200 mg di setacci molecolari attivati AW-300, 100 mg (0.20 mmoli, 1.3 eq) di tricloroacetimidato **88 $\alpha$** , 52.3 mg (0.16 mmoli, 1.0 eq) del glicosil accettore **25**, 1.6 mL di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro e 0.4 mL di una soluzione 0.1 M di  $\text{TMSOTf}$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro (0.04 mmoli di  $\text{TMSOTf}$ , 0.2 eq). Dopo 4 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 7:3, doppia corsa) ha evidenziato la scomparsa di **25** ( $R_f$  0.66) e la formazione di due prodotti aventi  $R_f$  0.37 e 0.35. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, il grezzo ottenuto (120 mg) è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo con *n*-esano-AcOEt 7:3. Sono state isolate due frazioni che all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono risultate costituite rispettivamente dall'anomero **58 $\alpha$**  ( $R_f$  0.37, 17.7 mg, resa 17%) e dall'anomero **58 $\beta$**  ( $R_f$  0.35, 22.6 mg, resa 22%) puri.

**Prova 2:** [con  $\text{TMSOTf}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ] - La reazione di glicosilazione è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale (*Metodo B*), conducendo la reazione

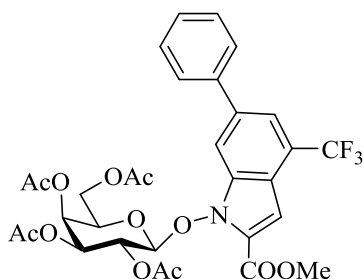
a temperatura ambiente ed utilizzando 200 mg di setacci molecolari attivati AW-300, 100 mg (0.20 mmoli, 1.3 eq) di tricloroacetimidato **88a**, 52.3 mg (0.16 mmoli, 1.0 eq) del glicosil accettore **25**, 1.6 mL di CH<sub>3</sub>CN anidro e 0.4 mL di una soluzione 0.1 M di TMSOTf in CH<sub>3</sub>CN anidro (0.04 mmoli di TMSOTf, 0.2 eq). Dopo 3 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 7:3, doppia corsa) ha evidenziato la scomparsa di **25** (R<sub>f</sub> 0.66) e la formazione di due prodotti aventi R<sub>f</sub> 0.37 e 0.35. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, il grezzo ottenuto (115 mg) è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo con *n*-esano-AcOEt 7:3. Sono state isolate due frazioni che all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono risultate rispettivamente costituite dall'anomero **58a** (R<sub>f</sub> 0.37, 33.8 mg, resa 32%) e dall'anomero **58b** (R<sub>f</sub> 0.35, 10.0 mg, resa 9%) puri.

**Prova 3:** [con BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] – La reazione di glicosilazione è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale (*Metodo C*), conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 400 mg di setacci molecolari attivati AW-300, 200 mg (0.40 mmoli, 1.5 eq) di tricloroacetimidato **88a**, 90.8 mg (0.28 mmoli, 1.0 eq) del glicosil accettore **25**, 7.0 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro e 44 µL di BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (0.36 mmoli, 1.3 eq). Dopo 2 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 7:3, doppia corsa) ha evidenziato la scomparsa di **25** (R<sub>f</sub> 0.66) e la formazione di due prodotti aventi R<sub>f</sub> 0.37 e 0.35. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, il grezzo ottenuto (185 mg) è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo con *n*-esano-AcOEt 7:3. Sono state isolate due frazioni che all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono risultate rispettivamente costituite dall'anomero **58a** (R<sub>f</sub> 0.37, 104 mg, resa 57%) e dall'anomero **58b** (R<sub>f</sub> 0.35, 5.30 mg, resa 3%) puri.



Il derivato **58a** è un solido giallo avente R<sub>f</sub> 0.37 (*n*-esano-AcOEt 7:3, doppia corsa); p.f. 56-67°C (sul cromatografato). <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN) δ: 7.99 (m, 1H, Ar-H), 7.86 (m, 1H, Ar-H), 7.80-7.74 (m, 2H, Ar-H), 7.55-7.40 (m, 3H, Ar-H), 7.30 (qd, 1H, *J* 1.0 Hz, *J* 1.6 Hz, Ar-H), 5.91 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 4.0 Hz, H-1), 5.61 (ddd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 3.0 Hz, *J*<sub>4,5</sub> 1.4 Hz, *J*<sub>4,6</sub> 0.6 Hz, H-4), 5.47 (dd, *J*<sub>2,3</sub> 11.2 Hz, H-2), 5.36 (dd, 1H, H-3), 5.02 (m, 1H, H-5), 4.05 (dd,

$J_{5,6b}$  3.3 Hz,  $J_{6a,6b}$  12.1 Hz, H-6b), 4.00 (dd, 1H,  $J_{5,6a}$  4.7 Hz, H-6a), 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.12, 2.11, 1.99, 1.61 (4s, each 3H, CH<sub>3</sub>CO). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$ : 171.2, 171.1, 170.8, 170.7 (4  $\times$  CH<sub>3</sub>CO), 160.6 (COOCH<sub>3</sub>), 140.4, 139.7, 138.0, 130.4 (4  $\times$  Ar-C), 130.1, 129.2, 128.5 (Ph-CH), 124.8-123.2 (CF<sub>3</sub> + Ar-C), 120.4 (Ar-CH), 117.2 (Ar-C), 113.3, 107.1 (2  $\times$  Ar-CH), 104.4 (C-1), 70.6 (C-5), 68.9 (C-4), 67.6 (C-2), 66.8 (C-3), 62.5 (C-6), 53.1 (OCH<sub>3</sub>), 21.2, 20.8, 20.7, 20.4 (4  $\times$  CH<sub>3</sub>CO).

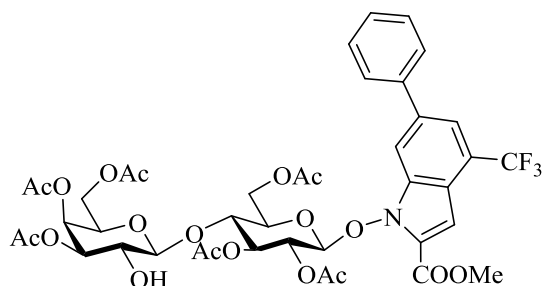


Il derivato **58β** è un solido giallo pallido avente  $R_f$  0.35 (*n*-esano-AcOEt 7:3, doppia corsa).  $[\alpha]_D^{25} + 26.3$  ( $c$  1.0, CHCl<sub>3</sub>); p.f. 139-143°C (sul cromatografato). <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$ : 8.12 (m, 1H, Ar-H), 7.84 (m, 1H, Ar-H), 7.75 (m, 1H, Ar-H), 7.71 (m, 1H, Ar-H), 7.54-7.40 (m, 3H, Ar-H), 7.23 (qd, 1H,  $J$  1.0 Hz,  $J$  1.7 Hz, Ar-H), 5.58 (d, 1H,  $J_{1,2}$  8.1 Hz, H-1), 5.40 (m, 2H, H-2, H-4), 5.27 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  9.1 Hz,  $J_{3,4}$  3.3 Hz, H-3), 4.10-3.98 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.18, 2.16, 1.98, 1.60 (4s, each 3H, CH<sub>3</sub>CO). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$ : 171.2, 171.1, 170.8, 170.7 (4  $\times$  CH<sub>3</sub>CO), 160.5 (COOCH<sub>3</sub>), 140.5, 139.8, 139.5, 130.4 (4  $\times$  Ar-C), 130.1, 129.1, 128.2 (Ph-CH), 124.1-123.2 (CF<sub>3</sub> + Ar-C), 120.3 (Ar-CH), 117.2 (Ar-C), 114.8, 106.8 (2  $\times$  Ar-CH), 106.2 (C-1), 72.1 (C-5), 71.3 (C-3), 68.4 (C-4), 68.1 (C-2), 62.4 (C-6), 52.9 (OCH<sub>3</sub>), 21.2, 20.8, 20.7, 20.4 (4  $\times$  CH<sub>3</sub>CO).

### 3.3.5.2 – Preparazione dell'1-idrossi-6-fenil-4-(trifluorometil)-1H-indolo-2-metilcarbossilato-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galattopiranosil)-2,3,6-tri-*O*-acetil-β-D-glucopiranoside (**59β**)

La reazione di glicosilazione è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale (*Metodo C*), conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 287 mg di setacci molecolari attivati AW-300, 175 mg (0.22 mmoli, 1.5 eq) di tricloroacetimidato **89a**, 50.0 mg (0.15 mmoli, 1.0 eq) del glicosil accettore **25**, 4.0 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro e 24  $\mu$ L di BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (0.20 mmoli, 1.3 eq). Dopo 2 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 1:1, doppia corsa) ha evidenziato la scomparsa di **25** ( $R_f$  0.76) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.45. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, il grezzo

ottenuto (202 mg) è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo con *n*-esano-AcOEt 1:1. È stato isolato l'anomero **59β** (93.0 mg, resa 65%) puro all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.



Il derivato **59β** è un solido avorio avente  $R_f$  0.45 (*n*-esano-AcOEt 1:1, doppia corsa).  $[\alpha]_D^{25} +49.4$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); p.f. 100-103°C (sul cromatografato).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 8.08 (m, 1H, Ar-H), 7.80 (m, 1H, Ar-H), 7.71-7.66 (m, 2H, Ar-H), 7.58-7.38 (m, 3H, Ar-H), 7.22 (qd, 1H,  $J$  1.0 Hz,  $J$  1.8 Hz, Ar-H), 5.57 (d, 1H,  $J_{1,2}$  8.0 Hz, H-1), 5.33 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  9.8 Hz,  $J_{3,4}$  8.7 Hz, H-3), 5.30 (dd, 1H,  $J_{3',4'}$  3.5 Hz,  $J_{4',5'}$  1.3 Hz, H-4'), 5.23 (dd, 1H, H-2), 5.03 (dd, 1H,  $J_{2',3'}$  10.4 Hz, H-3'), 4.90 (dd, 1H,  $J_{1',2'}$  7.8 Hz, H-2'), 4.59 (d, 1H, H-1'), 4.19 (dd, 1H,  $J_{5,6b}$  2.3 Hz,  $J_{6a,6b}$  12.1 Hz, H-6b), 4.13-4.02 (m, 4H, H-6a, H-5', H-6'a, H-6'b), 3.99 (dd, 1H,  $J_{4,5}$  9.9 Hz, H-4), 3.91 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.75 (ddd, 1H,  $J_{5,6a}$  5.6 Hz, H-5), 2.13, 2.09, 2.06, 2.02, 1.93, 1.89, 1.58 (7s, each 3H,  $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 171.1-170.2 ( $7 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ), 160.3 ( $\text{COOCH}_3$ ), 140.6, 139.8, 135.5, 130.4 ( $4 \times \text{Ar-C}$ ), 129.9, 128.9, 128.2 (Ph-CH), 123.9-122.9 ( $\text{CF}_3 + \text{Ar-C}$ ), 120.3 (Ar-CH), 117.3 (Ar-C), 114.9, 106.8 ( $2 \times \text{Ar-CH}$ ), 105.6 (C-1), 101.4 (C-1'), 76.9 (C-4), 73.4 (C-5), 72.7 (C-3), 71.5 (C-3', C-5'), 70.5 (C-2), 69.8 (C-2'), 68.0 (C-4'), 62.7 (C-6'), 62.0 (C-6), 52.8 ( $\text{COOCH}_3$ ), 21.1-20.4 ( $7 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ).

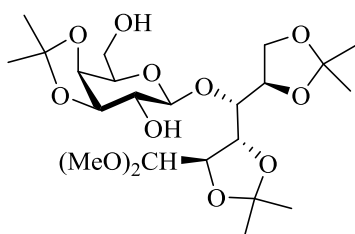
### 3.4 – Preparazione dei 6-*O*-tosil derivati saccaridici 103, 105 e 107

#### 3.4.1 – Preparazione del 4-*O*-(3',4'-*O*-isopropilidene- $\beta$ -D-galattopiranosil)-2,3:5,6-di-*O*-isopropilidene-aldeido-D-glucosio dimetile acetale (106)

In un pallone da 250 mL, sotto atmosfera inerte (Ar), sono stati solubilizzati 9.33 g (27.3 mmoli, 1.0 eq) di D-lattosio (**93**) e 390 mg (2.05 mmoli, 0.075 eq) di *p*-TsOH in 81.0 mL di 2,2-dimetossipropano (DMP); la soluzione è stata mantenuta in agitazione a 80°C monitorando mediante analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 4:6) la scomparsa del substrato di partenza. Dopo 5 ore, la miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, neutralizzata con 3.0 mL di trietilammina ( $\text{Et}_3\text{N}$ ), lasciata in



agitazione a temperatura ambiente per 10 minuti ed il solvente eliminato a pressione ridotta mediante coevaporazione con toluene ( $4 \times 50.0$  mL). Dall'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 4:6), il grezzo di reazione (16.3 g) è risultato costituito dai prodotti **108** ( $R_f$  0.47) e **106** ( $R_f$  0.26), dove **106** costituisce il prodotto maggioritario. Dopo rigorosa eliminazione dell'eccesso di  $\text{Et}_3\text{N}$  (12 ore a 0.1 mmHg), il grezzo è stato solubilizzato in 330 mL di una miscela MeOH-acqua 10:1 e la soluzione è stata lasciata in agitazione a  $80^\circ\text{C}$ . Dopo 2 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 4:6) ha evidenziato la completa conversione del prodotto **108** ( $R_f$  0.47) nel diolo **106** ( $R_f$  0.26). La purificazione *flash*-cromatografica (*n*-esano-AcOEt 1:1) su gel di silice del grezzo ottenuto (14 g), dopo eliminazione del solvente a pressione ridotta tramite coevaporazione con toluene ( $4 \times 50.0$  mL), ha fornito il diolo **106** (12.5 g, resa 90%) puro all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.



Il triacetone lattosio **106** è un solido cristallino avente  $R_f$  0.26 (*n*-esano-AcOEt 4:6) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>69</sup>  $[\alpha]_D^{25} +36.1$  (c 1.0;  $\text{CHCl}_3$ ); p.f.  $127-129^\circ\text{C}$ .  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 4.61 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  6.7 Hz,  $J_{2,3}$  7.9 Hz, H-2), 4.43 (d, 1H,  $J_{1,2'}$  8.3 Hz, H-1'), 4.37 (d, 1H, H-1), 4.22 (ddd, 1H,  $J_{4,5}$  2.7 Hz,  $J_{5,6a}$  5.0 Hz,  $J_{5,6b}$  7.0 Hz, H-5), 4.20 (dd, 1H,  $J_{6a,6b}$  8.8 Hz, H-6a), 4.08 (m, 1H,  $J_{2',3'}$  6.7 Hz, H-3'), 4.06 (m, 1H, H-4'), 3.51 (m, 1H, H-6b), 4.02 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  1.5 Hz, H-4), 4.01 (dd, 1H, H-6'b), 3.90 (dd, 1H,  $J_{6'a,6'b}$  11.3 Hz,  $J_{5',6'a}$  9.0 Hz, H-6'a), 3.89 (dd, 1H, H-3), 3.82 (m, 1H,  $J_{5',6'b}$  1.7 Hz, H-5'), 3.52 (dd, 1H, H-2'), 3.51, 3.49 (2s, each 3H,  $2 \times \text{OCH}_3$ -1), 1.50, 1.39 [2s, each 6H,  $2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_2$ ], 1.33, 1.32 [2s, each 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ].  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 110.2, 109.6, 108.2 [ $3 \times \text{C}(\text{CH}_3)_2$ ], 107.1 (C-1), 103.2 (C-1'), 79.3 (C-3'), 78.1 (C-3), 77.3 (C-5), 75.5 (C-4), 75.1 (C-2), 74.6 (C-5'), 74.0 (C-2'), 73.4 (C-4'), 64.3 (C-6), 62.3 (C-6'), 57.4, 54.2 ( $2 \times \text{OCH}_3$ -1), 28.0, 26.9, 26.1, 26.0, 25.5, 23.8 [ $3 \times \text{C}(\text{CH}_3)_2$ ]. I parametri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono in accordo con quanto riportato da Barili e coll.<sup>69</sup>

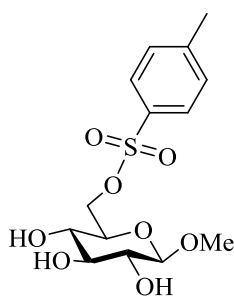
### 3.4.2 – Procedura generale di tosilazione al C-6 di derivati saccaridici

In un pallone da 25 mL, munito di agitatore magnetico e sotto atmosfera inerte (Ar), è stato solubilizzato l'appropriato zucchero (1.00 mmoli, 1.0 eq) in una miscela anidra

costituita da piridina-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in rapporto 1:1 (7.0 mL). Dopo raffreddamento della soluzione a 0°C, sono stati addizionati 324 mg (1.70 mmoli, 1.7 eq) di *p*-TsCl e la miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione a tale temperatura. Verificata la scomparsa del substrato di partenza e la formazione del prodotto desiderato tramite analisi TLC, è stato aggiunto MeOH (1.2 mL) per distruggere l'eccesso di *p*-TsCl e la soluzione è stata lasciata in agitazione per 10 minuti. L'eliminazione dei solventi tramite coevaporazione con toluene (4 × 10.0 mL) a pressione ridotta, ha fornito un grezzo che è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice.

### 3.4.2.1 – Preparazione del metil 6-*O*-*p*-toluensolfonile-β-D-glucopiranoside (**103**)

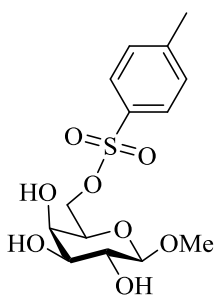
La reazione di tosilazione è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a 0°C ed utilizzando 500 mg (2.46 mmoli, 1.0 eq) di metil β-D-glucopiranoside emiidrato (**102**), 17.2 mL di una miscela piridina-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1 e 797 mg (4.18 mmoli, 1.7 eq) di *p*-TsCl. Trascorse 7.5 ore, l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza (R<sub>f</sub> 0.26) e la formazione di un unico prodotto avente R<sub>f</sub> 0.55. Dopo trattamento della miscela di reazione e purificazione *flash*-cromatografica su gel di silice (AcOEt-MeOH 95:5) del grezzo (1.75 g) è stato isolato il 6-*O*-tosil derivato **103** (802 mg, resa 94%) puro all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.



Il composto **103** è un solido cristallino bianco avente R<sub>f</sub> 0.55 (AcOEt-MeOH 9:1) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>67</sup> <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.80, 7.42 (sistema AA'XX', 4H, Ar-H), 4.33 (dd, 1H, *J*<sub>6a,6b</sub> 10.8 Hz, H-6b), 4.16 (dd, 1H, *J*<sub>5,6b</sub> 2.0 Hz, H-6a), 3.49 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 7.8 Hz, H-1), 3.42 (ddd, *J*<sub>5,6a</sub> 5.8 Hz, H-5), 3.41 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.33 (dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 8.3 Hz, H-4), 3.22 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 8.8 Hz, H-3), 3.11 (dd, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 9.1 Hz, H-2), 2.40 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 146.5 (Ar-CSO<sub>2</sub>), 133.9 (Ar-C), 131.0, 129.0 (Ar-CH), 104.9 (C-1), 77.5 (C-4), 74.7 (C-2), 74.6 (C-5), 70.9 (C-3), 70.6 (C-6), 57.2 (OCH<sub>3</sub>), 21.6 (Ar-CH<sub>3</sub>). I parametri <sup>1</sup>H NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>67</sup>

### 3.4.2.2 – Preparazione del metil 6-*O*-*p*-toluensolfonile-β-D-galattopiranoside (**105**)

La reazione di tosilazione è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a 0°C ed utilizzando 500 mg (2.57 mmoli, 1.0 eq) di metil β-D-galattopiranoside (**104**), 18.0 mL di una miscela piridina-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1 e 833 mg (4.37, 1.7 eq) di *p*-TsCl. Trascorse 23 ore, l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) ha evidenziato la formazione di un unico prodotto avente R<sub>f</sub> 0.52. Dopo trattamento della miscela di reazione e purificazione *flash*-cromatografica su gel di silice (AcOEt-MeOH 95:5) del grezzo di reazione (1.75 g) è stato isolato il 6-*O*-tosil derivato **105** (427 mg, resa 48%) puro all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.

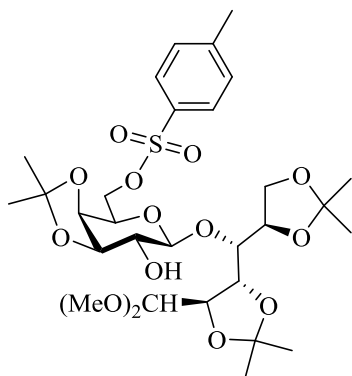


Il composto **105** è un solido cristallino bianco avente R<sub>f</sub> 0.52 (AcOEt-MeOH 9:1) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>68</sup> <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.80, 7.44 (sistema AA'XX', 4H, Ar-H), 4.21 (dd, 1H, *J*<sub>5,6b</sub> 5.0 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 10.4 Hz, H-6b), 4.17 (dd, 1H, *J*<sub>5,6a</sub> 6.8 Hz, H-6a), 4.08 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 7.6 Hz, H-1), 3.78-3.68 (m, 2H, H-4, H-5), 3.45-3.41 (m, 2H, H-2, H-3), 3.44 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.45 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 146.6 (Ar-CSO<sub>2</sub>), 134.2 (Ar-C), 131.1, 129.0 (Ar-CH), 105.6 (C-1), 74.4 (C-2), 73.6 (C-5), 72.0 (C-3), 70.8 (C-6), 70.0 (C-4), 57.2 (OCH<sub>3</sub>), 21.6 (Ar-CH<sub>3</sub>).

### 3.4.2.3 – Preparazione del 4-*O*-(6'-*O*-*p*-toluensolfonile-3',4'-*O*-isopropilidene-β-D-galattopiranosil)-2,3:5,6-di-*O*-isopropilidene-aldeido-D-glucosio dimetile acetale (**107**)

La reazione di tosilazione è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a 0°C ed utilizzando 1.28 g (2.51 mmoli, 1.0 eq) di diolo disaccaridico **106**, 17.6 mL di una miscela piridina-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1 e 815 mg (4.27, 1.7 eq) di *p*-TsCl. Trascorsi 3 giorni, l'analisi TLC (AcOEt) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza (R<sub>f</sub> 0.60) e la formazione di un unico prodotto avente R<sub>f</sub> 0.91. Dopo trattamento della miscela di reazione, il residuo è stato ripartito fra CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50.0 mL) e una soluzione satura di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50.0 mL) e la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 30.0 mL). Le fasi organiche riunite sono state anidificate su MgSO<sub>4</sub>, filtrate e concentrate a pressione ridotta. Il grezzo ottenuto (1.45 g) è stato purificato mediante *flash*-cromatografica su gel di silice eluendo con

*n*-esano-AcOEt 4:6. È stato isolato il 6'-*O*-tosil derivato **107** (1.20 g, resa 72%) puro all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.



Il composto **107** è un solido schiumoso bianco avente  $R_f$  0.91 (AcOEt) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>70</sup>  $[\alpha]_D^{25} +15.5$  (c 1.06;  $\text{CHCl}_3$ ); p.f. 55-59°C (sul cromatografato).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.80, 7.36 (sistema AA'XX', 4H, Ar-H), 4.40 (d, 1 H,  $J_{1',2'}$  8.1 Hz, H-1'), 4.38 (dd, 1H,  $J_{5',6'b}$  6.2 Hz,  $J_{6'a,6'b}$  12.1 Hz, H-6'b), 4.32 (dd, 1H,  $J_{5',6'a}$  6.4 Hz, H-6'a), 4.23 (m, 1 H, H-5), 4.15-3.91 (m, 8 H, H-3', H-4', H-5', H-1, H-2, H-3, H-6a, H-6b), 3.84 (dd, 1 H,  $J_{3,4}$  1.6 Hz,  $J_{4,5}$  4.7 Hz, H-4), 3.30 (ddd, 1 H,  $J_{2',3'}$  6.9 Hz,  $J_{2',\text{OH}}$  3.1 Hz, H-2'), 3.60 (d, 1 H, OH-2'), 3.38, 3.35 (2 s, each 3 H,  $2 \times \text{OCH}_3$ ), 2.44 (s, 3 H, Ar- $\text{CH}_3$ ), 1.39, 1.36, 1.32, 1.31, 1.29, 1.22 [6s, each 3H,  $3 \text{C}(\text{CH}_3)_2$ ].  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 145.6 (Ar- $\text{CSO}_2$ ) 133.3 (Ar-C), 131.1, 128.8 (Ar-CH), 110.6, 110.5, 109.7 [ $3 \times \text{C}(\text{CH}_3)_2$ ], 106.1 (C-1), 104.0 (C-1'), 80.0, 78.4, 77.9, 77.6 (C-2, C-3, C-5, C-3'), 76.3 (C-4), 74.4, 73.8 (C-2', C-4'), 71.3 (C-5'), 69.5 (C-6'), 66.0 (C-6), 56.4, 54.3 ( $2 \times \text{OCH}_3$ ), 28.2, 27.5, 27.0, 26.5, 26.4, 25.2 [ $3 \times \text{C}(\text{CH}_3)_2$ ], 21.7 (Ar- $\text{CH}_3$ ). I parametri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono in accordo con quanto riportato da Catelani e coll.<sup>70</sup>

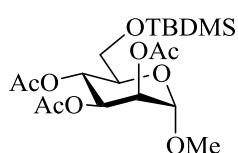
### 3.5 – Preparazione di mono- e disaccaridi selettivamente deprotetti al C-6 128-131

#### 3.5.1 – Preparazione del metil 2,3,4-tri-*O*-acetil- $\alpha$ -D-mannopiranoside (128)

In un pallone da 50 mL sono stati solubilizzati 1.00 g (5.15 mmoli, 1.0 eq) di metil  $\alpha$ -D-mannopiranoside (**132**) in 22.0 mL di piridina anidra, sono stati addizionati 931 mg (6.18 mmoli, 1.2 eq) di *tert*-butildimetilsililcloruro (TBDMSCl) e la soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 2 ore, l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.17) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.62. Concentrata la soluzione coevaporando con toluene ( $4 \times 20.0$  mL) a pressione ridotta, il grezzo di reazione è stato ripartito tra AcOEt (30.0 mL) e acqua (30.0 mL). Dopo separazione delle fasi, la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con AcOEt ( $2 \times 30.0$  mL) e le fasi organiche

riunite sono state anidrificate su  $\text{MgSO}_4$ , filtrate ed il solvente eliminato a pressione ridotta. Il grezzo (1.42 g), contenente metil 6-*O*-*tert*-butildimetilsilil- $\alpha$ -D-mannopiranoside (**133**), è stato impiegato nella reazione successiva senza ulteriori purificazioni.

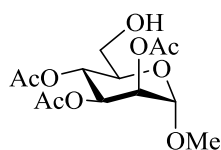
In un pallone da 100 mL, munito di agitatore magnetico, sono stati disciolti 1.42 g di 6-*O*-silil derivato **133** grezzo in 45.0 mL di una miscela anidride acetica-piridina 1:2 e la soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 5 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 3:7) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.34) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.79. Concentrata la soluzione coevaporando con toluene ( $4 \times 20.0$  mL) a pressione ridotta, è stato ottenuto un grezzo oleoso (1.74 g) che all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR è risultato costituito esclusivamente dal metil 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-*O*-*tert*-butildimetilsilil- $\alpha$ -D-mannopiranoside (**134**), poi impiegato nella reazione successiva senza ulteriori purificazioni.



Il derivato **134** è un sciroppo scuro avente  $R_f$  0.79 (*n*-esano-AcOEt 3:7) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>81</sup>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.22-5.13 (m, 2H, H-3, H-4), 5.10 (m, 1H, H-2), 4.58 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.8 Hz, H-1), 3.70-3.59 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 3.28 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 1.92, 1.88, 1.87 (3s, each 3H,  $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ), 0.80 [s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ], -0.04, -0.06 [2s, each 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ].  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.3, 170.2, 169.8 ( $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ), 98.6 (C-1), 71.5 (C-5), 70.0 (C-2), 69.8 (C-3), 66.8 (C-4), 62.6 (C-6), 55.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 26.1 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ], 21.7, 21.6, 21.0 ( $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ), 18.6 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ], -5.0, -5.1 [ $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ]. I parametri  $^1\text{H}$  NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>81</sup>

In un pallone da 100 mL, munito di refrigerante a bolle e tappo a  $\text{CaCl}_2$ , sono stati solubilizzati 1.74 g di **134** grezzo in 70.0 mL di AcOH acquoso al 70% e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a  $70^\circ\text{C}$ . Dopo 2 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 2:8) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza **134** ( $R_f$  0.83) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.47. Concentrata la soluzione coevaporando con toluene ( $4 \times 30.0$  mL) a pressione ridotta, il residuo ottenuto è stato

ripartito tra CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30.0 mL) ed acqua (30.0 mL) e, dopo separazione delle fasi, la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 30.0 mL). Le fasi organiche riunite, anidrificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e concentrate a pressione ridotta hanno fornito un grezzo (1.20 g) che è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo con *n*-esano-AcOEt 4:6. È stato isolato il derivato **128** (494 mg, resa 30% calcolata a partire da **132**) puro all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.

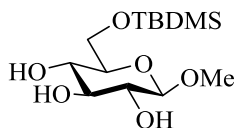


Il derivato **128** è un solido avorio avente R<sub>f</sub> 0.47 (*n*-esano-AcOEt 2:8) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>84</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.20 (dd, 1H, J<sub>2,3</sub> 3.4 Hz, J<sub>3,4</sub> 10.3 Hz, H-3), 5.08 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub> 1.6 Hz, H-2), 5.06 (dd, 1H, J<sub>4,5</sub> 9.7 Hz, H-4), 4.58 (d, 1H, H-1), 3.68 (ddd, 1H, J<sub>5,6a</sub> 4.6 Hz, J<sub>5,6b</sub> 2.4 Hz, H-5), 3.55 (dd, 1H, J<sub>6a,6b</sub> 12.6 Hz, H-6b), 3.48 (dd, 1H, H-6a), 3.26 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.68 (bs, 1H, OH), 1.99, 1.92, 1.85 (3s, each 3H, 3 × CH<sub>3</sub>CO). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 171.0, 170.4, 170.2 (3 × CH<sub>3</sub>CO), 98.8 (C-1), 70.9 (C-5), 69.9 (C-2), 69.3 (C-3), 67.7 (C-4), 61.6 (C-6), 55.5 (OCH<sub>3</sub>), 21.3, 21.1, 21.0 (3 × CH<sub>3</sub>CO). I parametri <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>84</sup>

### 3.5.2 – Preparazione del metil 2,3,4-tri-*O*-acetil-β-D-glucopiranoside (**129**)

In un pallone da 50 mL sono stati solubilizzati 1.00 g (4.92 mmoli, 1.0 eq) di metil β-D-glucopiranoside emiidrato (**102**) in 19.0 mL di piridina, sono stati addizionati 742 mg (4.92 mmoli, 1.0 eq) di TBDMSCl e la soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 21 ore, poiché l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) mostrava ancora la presenza del substrato di partenza (R<sub>f</sub> 0.14), sono stati addizionati 306 mg (2.03 mmoli, 0.4 eq) di TBDMSCl. Dopo 23 ore dall'ultima aggiunta, l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) ha evidenziato la completa scomparsa del substrato di partenza (R<sub>f</sub> 0.14) e la formazione di un unico prodotto avente R<sub>f</sub> 0.52. Concentrata la soluzione coevaporando con toluene (4 × 30.0 mL) a pressione ridotta, il residuo è stato ripartito tra AcOEt (30.0 mL) e acqua (30.0 mL). Dopo separazione delle fasi, la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con AcOEt (2 × 30.0 mL) e le fasi organiche riunite sono state anidrificate su MgSO<sub>4</sub>, filtrate ed il solvente eliminato a pressione ridotta. Il grezzo (1.18 g) contenente metil 6-*O*-*tert*-butildimetilsilil-β-D-

glucopiranoside (**135**) è stato poi impiegato nella reazione successiva senza ulteriori purificazioni.

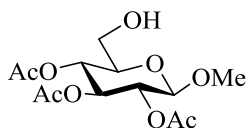


Il derivato **135** è un solido bianco avente  $R_f$  0.52 (AcOEt-MeOH 9:1) e caratteristiche chimico fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>80</sup>  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 4.82 (bs, 3H, OH), 4.08 (d, 1H,  $J_{1,2}$  7.5 Hz, H-1), 3.91 (dd, 1H,  $J_{5,6a}$  5.2 Hz,  $J_{6a,6b}$  11.8 Hz, H-6a), 3.74 (dd, 1H,  $J_{5,6b}$  2.8 Hz, H-6b), 3.46 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.32-3.25 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 3.19 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  8.1 Hz, H-2), 0.85 [s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ], 0.04 (s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 105.2 (C-1), 78.1, 78.0, 75.0, 71.3 (C-2, C-3, C-4, C-5), 64.0 (C-6), 57.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 26.4 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ], 19.3 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ], -5.0, -5.1 [ $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ]. I parametri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C NMR}$  sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>80</sup>

In un pallone da 100 mL, munito di agitatore magnetico, sono stati disciolti 1.18 g di 6-*O*-silyl derivato **135** grezzo in 45.0 mL di una miscela anidride acetica-piridina 1:2 e la soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 16 ore, l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza **135** ( $R_f$  0.52) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.82. Concentrata la soluzione coevaporando con toluene ( $4 \times 20.0$  mL) a pressione ridotta, è stato ottenuto un solido bianco (1.56 g) che all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C NMR}$  è risultato costituito esclusivamente dal metil 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-*O*-*tert*-butildimetilsilil- $\beta$ -D-glucopiranoside (**136**), poi impiegato nella reazione successiva senza ulteriori purificazioni.

In un pallone da 100 mL, munito di refrigerante a bolle e tappo a  $\text{CaCl}_2$ , sono stati solubilizzati 1.56 g di **136** grezzo in 70.0 mL di AcOH acquoso al 70% e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a  $70^\circ\text{C}$ . Trascorse 2 ore, l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza **136** ( $R_f$  0.82) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.65. Concentrata la soluzione coevaporando con toluene ( $4 \times 30.0$  mL) a pressione ridotta, il residuo ottenuto è stato ripartito tra  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30.0 mL) e acqua (30.0 mL) e, dopo separazione delle fasi, la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 20.0$  mL). Le fasi organiche riunite, anidrificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e concentrate a pressione ridotta hanno fornito

un residuo solido (930 mg) che è stato ricristallizzato da Et<sub>2</sub>O. È stato ottenuto il derivato **129** (570 mg, resa 36% calcolata a partire da **102**) puro all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.



Il derivato **129** è un solido avorio avente R<sub>f</sub> 0.65 (AcOEt-MeOH 9:1) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>85</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.08 (dd, 1H, J<sub>2,3</sub> 9.6 Hz, J<sub>3,4</sub> 9.5 Hz, H-3), 4.85 (dd, 1H, J<sub>4,5</sub> 10.2 Hz, H-4), 4.79 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub> 7.9 Hz, H-2), 4.30 (d, 1H, H-1), 3.60 (dd, 1H, J<sub>5,6b</sub> 2.2 Hz, J<sub>6a,6b</sub> 12.4 Hz, H-6b), 3.45 (dd, 1H, J<sub>5,6a</sub> 4.6 Hz, H-6a), 3.39 (bs, 1H, OH), 3.35 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.33 (m, 1H, H-5), 1.89, 1.88, 1.84 (3s, each 3H, 3 × CH<sub>3</sub>CO). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 170.8, 170.7, 170.0 (3 × CH<sub>3</sub>CO), 102.1 (C-1), 74.5 (C-3), 73.2 (C-5), 71.9 (C-2), 69.2 (C-4), 61.7 (C-6), 57.6 (OCH<sub>3</sub>), 21.1 (3 × CH<sub>3</sub>CO). I parametri <sup>1</sup>H NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>85</sup>

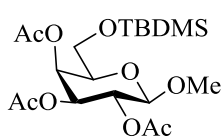
### 3.5.3 – Preparazione del metil 2,3,4-tri-O-acetil-β-D-galattopiranoside (**130**)

In un pallone da 50 mL sono stati solubilizzati 1.00 g (5.15 mmoli, 1.0 eq) di metil β-D-galattopiranoside (**104**) in 22.0 mL di piridina, sono stati addizionati 931 mg (6.18 mmoli, 1.2 eq) di TBDMSCl e la soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 2 ore, l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) ha mostrato la scomparsa del substrato di partenza (R<sub>f</sub> 0.14) e la formazione di un unico prodotto avente R<sub>f</sub> 0.59. Concentrata la soluzione coevaporando con toluene (4 × 30.0 mL) a pressione ridotta, il grezzo di reazione è stato ripartito tra AcOEt (30.0 mL) e acqua (30.0 mL). Dopo separazione delle fasi, la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con AcOEt (2 × 30.0 mL) e le fasi organiche riunite sono state anidificate su MgSO<sub>4</sub>, filtrate ed il solvente eliminato a pressione ridotta. Il grezzo (1.37 g) contenente metil 6-O-tert-butildimetilsilil-β-D-galattopiranoside (**137**) è stato poi impiegato nella reazione successiva senza ulteriori purificazioni.

In un pallone da 100 mL, munito di agitatore magnetico, sono stati disciolti 1.37 g di 6-O-silil derivato **137** grezzo in 45.0 mL di una miscela anidride acetica-piridina 1:2 e la soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 22 ore,

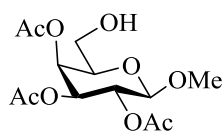


l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 3:7) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza **137** ( $R_f$  0.23) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.79. Concentrata la soluzione coevaporando con toluene ( $4 \times 20.0$  mL) a pressione ridotta, è stato ottenuto un olio giallo (1.81 g) che all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR è risultato costituito esclusivamente dal metil 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-*O*-*tert*-butildimetilsilil- $\beta$ -D-galattopiranoside (**138**), poi impiegato nella reazione successiva senza ulteriori purificazioni.

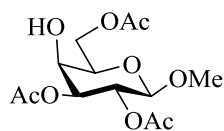


Il derivato **138** è uno sciroppo giallo avente  $R_f$  0.79 (*n*-esano-AcOEt 3:7) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>81,82</sup>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.44 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  3.4 Hz,  $J_{4,5}$  0.8 Hz, H-4), 5.12 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  7.8 Hz,  $J_{2,3}$  10.4 Hz, H-2), 5.01 (dd, 1H, H-3), 4.35 (d, 1H, H-1), 3.75-3.58 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 3.48 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.10, 2.03, 1.95 (3s, each 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 0.84 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 0.008, 0.007 (2s, each 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.8, 170.7, 170.2 ( $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ), 102.7 (C-1), 74.1 (C-3), 71.8 (C-5), 69.8 (C-2), 67.7 (C-4), 61.2 (C-6), 57.5 ( $\text{OCH}_3$ ), 26.3 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ], 21.4, 21.3, 21.2 ( $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ), 18.7 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ], -5.0, -5.1 [ $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ]. I parametri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>81,82</sup>

In un pallone da 100 mL, munito di refrigerante a bolle e tappo a  $\text{CaCl}_2$ , sono stati solubilizzati 1.81 g di **138** grezzo in 70.0 mL di AcOH acquoso al 70% e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a  $70^\circ\text{C}$ . Dopo 2 ore, l'analisi TLC (AcOEt) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza **138** e la formazione di due prodotti aventi rispettivamente  $R_f$  0.65 e 0.56. Concentrata la soluzione coevaporando con toluene ( $4 \times 30.0$  mL) a pressione ridotta, è stato ottenuto un residuo che è stato ripartito tra  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30.0 mL) e acqua (30.0 mL) e, dopo separazione delle fasi, la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 20.0$  mL). Le fasi organiche riunite, anidificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e concentrate a pressione ridotta hanno fornito un residuo solido (1.07 g) che è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo con *n*-esano-AcOEt 3:7. Sono stati isolati il 2,3,4-tri-*O*-acetil derivato **130** (533 mg, resa 33% calcolata a partire da **104**) e il 2,3,6-tri-*O*-acetil derivato **141** (274 mg, resa 17% calcolata a partire da **104**) puri all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.



Il derivato **130** è un solido bianco avente  $R_f$  0.56 (AcOEt) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>86,87</sup>  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 5.33 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  3.1 Hz,  $J_{4,5}$  1.1 Hz, H-4), 5.20-4.97 (m, 2H, H-2, H-3), 4.45 (d, 1H,  $J_{1,2}$  7.9 Hz, H-1), 3.78 (dt, 1H,  $J_{5,6a} = J_{5,6b}$  5.2 Hz, H-5), 3.60 (dd, 1H,  $J_{6a,6b}$  11.2 Hz, H-6b), 3.52 (dd, 1H, H-6a), 3.44 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.22 (bt, 1H, OH), 2.08, 2.00, 1.91 (3s, each 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 171.4, 171.0, 170.6 ( $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ), 102.6 (C-1), 74.2 (C-5), 72.1 (C-3), 70.0 (C-2), 68.5 (C-4), 60.8 (C-6), 57.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 21.1, 20.9, 20.7 ( $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ). I parametri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C NMR}$  sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>86,87</sup>

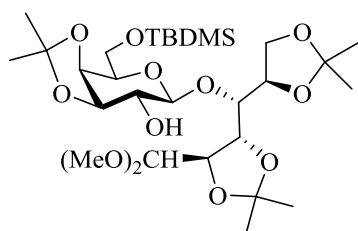


Il derivato **141** è un sciroppo avente  $R_f$  0.65 (AcOEt) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>82,86</sup>  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 5.03 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  7.9 Hz,  $J_{2,3}$  10.4 Hz, H-2), 4.86 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  3.2 Hz, H-3), 4.30 (d, 1H, H-1), 4.23 (dd, 1H,  $J_{5,6b}$  7.2 Hz,  $J_{6a,6b}$  11.4 Hz, H-6b), 4.13 (dd, 1H,  $J_{5,6a}$  5.2 Hz, H-6a), 3.96 (ddd, 1H,  $J_{4,5}$  1.2 Hz,  $J_{4,\text{OH}}$  5.7 Hz, H-4), 3.77 (ddd, 1H, H-5), 3.70 (d, 1H, OH), 3.40 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.00 (s, 6H,  $2 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ), 1.99 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 171.6, 171.1, 170.7 ( $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ), 102.4 (C-1), 74.1 (C-3), 73.0 (C-5), 69.9 (C-2), 67.4 (C-4), 63.6 (C-6), 57.0 ( $\text{OCH}_3$ ), 21.1, 21.0, 20.9 ( $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ). I parametri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C NMR}$  sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>82,86</sup>

### 3.5.4 – Preparazione del 4-*O*-[2'-*O*-acetil-3',4'-*O*-isopropilidene- $\beta$ -D-galattopiranosil]-2,3:5,6-di-*O*-isopropilidene-aldeido-D-glucosio dimetile acetale (**131**)

In un pallone da 25 mL sono stati solubilizzati 400 mg (0.79 mmoli, 1.0 eq) di triacetonnattosio (**106**) in 3.4 mL di piridina, sono stati addizionati 142 mg (0.94 mmoli, 1.2 eq) di TBDMSCl e la soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 22 ore, poiché l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 6:4) evidenziava ancora la presenza del substrato di partenza ( $R_f$  0.12), sono stati addizionati 60.0 mg (0.40 mmoli, 0.5 eq) di TBDMSCl. Dopo 2 ore dall'ultima aggiunta, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 6:4) ha mostrato la completa scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.12) e la formazione di un prodotto avente  $R_f$  0.51. Eliminato il solvente coevaporando con

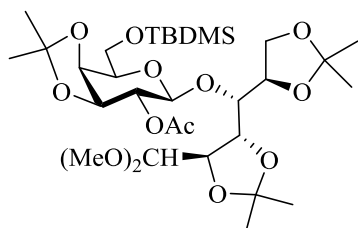
toluene ( $4 \times 30.0$  mL) a pressione ridotta, il residuo è stato ripartito tra AcOEt (20.0 mL) e acqua (20.0 mL). Dopo separazione delle fasi, la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con AcOEt ( $2 \times 20.0$  mL) e le fasi organiche riunite sono state anidificate su  $\text{MgSO}_4$ , filtrate ed il solvente eliminato a pressione ridotta. La purificazione *flash*-cromatografica su gel di silice del grezzo di reazione (471mg) eluendo con *n*-esano-AcOEt 3:7 ha fornito il 4-*O*-[6'-*O*-*tert*-butildimetilsilil-3',4'-*O*-isopropilidene- $\beta$ -D-galattopiranosil]-2,3:5,6-di-*O*-isopropilidene-*aldeido*-D-glucosio dimetile acetale (**142**) (369 mg, resa 75%) puro all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.



Il derivato **142** è un solido schiumoso bianco avente  $R_f$  0.51 (*n*-esano-AcOEt 6:4) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>88</sup>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.44 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  6.1 Hz,  $J_{2,3}$  7.7 Hz, H-2), 4.36 (d, 1H,  $J_{1',2'}$  8.1 Hz, H-1'), 4.33 (d, 1H, H-1), 4.25 (dt, 1H,  $J_{4,5}$  2.5 Hz,  $J_{5,6a} = J_{5,6b}$  6.6 Hz, H-5), 4.18 (dd, 1H,  $J_{3',4'}$  5.4 Hz,  $J_{4',5'}$  1.9 Hz, H-4'), 4.16 (dd, 1H,  $J_{6a,6b}$  8.8 Hz, H-6b), 4.05-3.94 (m, 3H, H-4, H-6a, H-3'), 3.88 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  1.6 Hz, H-3), 3.88 (m, 1H, H-6'b), 3.78-3.71 (m, 2H, H-5', H-6'a), 3.53 (dd, 1H,  $J_{2',3'}$  7.4 Hz, H-2'), 3.41, 3.39 (2s, each 3H,  $\text{OCH}_3$ -1), 1.49, 1.47 (2s, each 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ ), 1.36, 1.31 [2s, each 6H,  $2 \times (\text{CH}_3)_2\text{C}$ ], 0.86 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 0.04 [s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ].  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 110.7, 110.4, 108.9 [ $3 \times (\text{CH}_3)_2\text{C}$ ], 105.7 (C-1), 104.7 (C-1'), 79.5 (C-3'), 78.6 (C-3), 78.4 (C-5), 77.1 (C-4), 75.4 (C-2), 75.1 (C-2'), 74.3 (C-5'), 73.3 (C-4'), 65.3 (C-6), 62.1 (C-6'), 56.8, 53.5 ( $2 \times \text{OCH}_3$ -1), 28.9, 27.8, 27.0, 26.9 [ $2 \times (\text{CH}_3)_2\text{C}$ ], 26.4 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ], 26.3, 25.1 [ $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ ], 18.9 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ], -4.9, -5.0 [ $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ]. I parametri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>88</sup>

In un pallone da 50 mL, munito di agitatore magnetico, sono stati disciolti 310 mg (0.50 mmoli, 1.0 eq) di 6-*O*-silil derivato **142** grezzo in 6.0 mL di una miscela anidride acetica-piridina 1:2 e la soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 2 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 6:4) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.52) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.63. Concentrata la soluzione coevaporando con toluene ( $4 \times 20.0$  mL) a pressione ridotta,

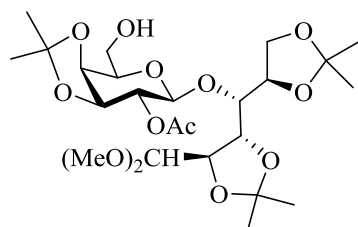
è stato ottenuto un olio giallo (331 mg) che all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR è risultato costituito esclusivamente dal 4-*O*-[2'-*O*-acetil-6'-*O*-*tert*-butildimetilsilil-3',4'-*O*-isopropilidene- $\beta$ -D-galattopiranosil]-2,3:5,6-di-*O*-isopropilidene-aldeido-D-glucosio dimetile acetale (**143**), impiegato poi nella reazione successiva senza ulteriori purificazioni.



Il derivato **143** è un olio giallo avente  $R_f$  0.63 (*n*-esano-AcOEt 6:4) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>88</sup>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.97 (dd, 1H,  $J_{1',2'}$  8.4 Hz,  $J_{2',3'}$  7.8 Hz, H-2'), 4.68 (d, 1H, H-1'), 4.41 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  6.1 Hz,  $J_{2,3}$  7.1 Hz, H-2), 4.31 (d, 1H, H-1), 4.25 (dt, 1H,  $J_{4,5}$  2.4 Hz,  $J_{5,6a} = J_{5,6b}$  7.0 Hz, H-5), 4.19 (dd, 1H,  $J_{3',4'}$  5.2 Hz,  $J_{4',5'}$  1.3 Hz, H-4'), 4.04 (dd, 1H, H-3'), 4.00 (bs, 1H, H-4), 3.93-3.82 (m, 4H, H-3, H-6a, H-6b, H-6'b), 3.78-3.67 (m, 2H, H-5', H-6'a), 3.37 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ -1), 2.08 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1.51, 1.43, [2s, each 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ ], 1.32 [s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ ], 1.29, 1.27 [2s, each 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ ], 0.86 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 0.03, 0.02 [2s, each 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ].  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.1 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 111.2, 110.6, 108.5 [ $3 \times (\text{CH}_3)_2\text{C}$ ], 105.6 (C-1), 101.0 (C-1'), 78.7 (C-5), 78.6 (C-3), 77.8 (C-3'), 75.4 (C-2), 74.3 (C-4), 73.6 (C-2', C-4'), 73.5 (C-5'), 65.1 (C-6), 61.8 (C-6'), 56.2, 53.6 ( $2 \times \text{OCH}_3$ -1), 28.4, 28.0, 26.9, 26.7, 26.6, 25.1 [ $3 \times (\text{CH}_3)_2\text{C}$ ], 26.4 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ], 21.5 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 18.8 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ], -5.00, -5.04 [ $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ]. I parametri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>88</sup>

In un pallone da 50 mL, sotto ambiente inerte (Ar), sono stati solubilizzati 331 mg di **143** grezzo in 4.6 mL di THF anidro. Alla soluzione, raffreddata a  $0^\circ\text{C}$ , sono stati addizionati 0.55 mL di una soluzione 1.0 M di TBAF in THF e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 3 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 1:1) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.69) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.28. Alla miscela di reazione, diluita con  $\text{Et}_2\text{O}$  (20.0 mL), è stata poi addizionata una soluzione satura di NaCl (20.0 mL) e, dopo separazione delle fasi, la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con  $\text{Et}_2\text{O}$  ( $2 \times 10.0$  mL). Le fasi organiche riunite, anidrificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e concentrate a

pressione ridotta hanno fornito un residuo solido (290 mg) che è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo con *n*-esano-AcOEt 4:6. È stato isolato il derivato **131** (252 mg, resa 92 % calcolata a partire da **142**) puro all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.



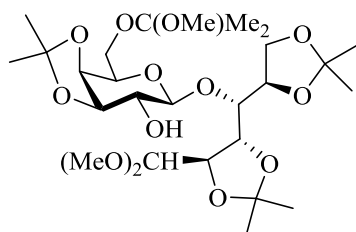
Il derivato **131** è un solido schiumoso bianco avente  $R_f$  0.28 (*n*-esano-AcOEt 1:1) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>89</sup>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 4.89 (dd, 1H,  $J_{1',2'}$  8.2 Hz,  $J_{2',3'}$  7.9 Hz, H-2'), 4.66 (d, 1H, H-1'), 4.35 (m, 2H, H-1, H-2), 4.25 (ddd, 1H,  $J_{4,5}$  2.3 Hz,  $J_{5,6a}$  6.4 Hz,  $J_{5,6b}$  6.2 Hz, H-5), 4.18 (m, 1H, H-3', H-4'), 3.99-3.81 (m, 5H, H-4, H-3, H-5', H-6a, H-6b), 3.65 (m, 2H, H-6'a, H-6'b), 3.42, 3.40 (2s, each 3H, 2  $\times$  OCH<sub>3</sub>-1), 2.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1.46, 1.44, 1.31, 1.30, 1.28, 1.27 [6s, each 3H, 3  $\times$  (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C].  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 170.4 (CH<sub>3</sub>CO), 111.0, 110.9, 108.3 [3  $\times$  (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C], 107.7 (C-1), 101.4 (C-1'), 78.9 (C-3), 78.4 (C-5), 78.3 (C-3'), 76.4 (C-2), 75.8 (C-5'), 74.9 (C-4), 74.7 (C-4'), 73.9 (C-2'), 65.3 (C-6), 62.4 (C-6'), 58.0, 54.3 (2  $\times$  OCH<sub>3</sub>-1), 28.3, 27.6, 26.7, 26.6, 26.4, 25.3 [3  $\times$  (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C], 21.2 (CH<sub>3</sub>CO). I parametri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>89</sup>

### 3.6 – Preparazione del disaccaride $\beta$ -D-talosaminico selettivamente deprotetto al C-6' (**146**)

#### 3.6.1 – Preparazione del 4-*O*-[3',4'-*O*-isopropilidene-6'-*O*-(1-metossi-1-metiletil)- $\beta$ -D-galattopiranosil]-2,3:5,6-di-*O*-isopropilidene-aldeido-D-glucosio dimetile acetale (**108**)

In un pallone da 1000 mL, munito di refrigerante a bolle e sotto atmosfera inerte, sono stati solubilizzati 20.0 g (58.4 mmoli, 1.0 eq) di D-lattosio (**93**), 1.11 g (5.84 mmoli, 0.1 eq) di *p*-TsOH in 169 mL di DMP e la soluzione è stata lasciata in agitazione a 80°C. Dopo 18 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 4:6) ha evidenziato la completa scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.06) e la formazione di due prodotti di cui uno minoritario (**108**,  $R_f$  0.47) e uno maggioritario (**106**,  $R_f$  0.26). La soluzione è stata raffreddata a temperatura ambiente, neutralizzata con Et<sub>3</sub>N (2.5 mL), lasciata in agitazione per 10 minuti ed infine concentrata a pressione ridotta coevaporando con toluene (3  $\times$  40.0 mL). Il grezzo è stato successivamente solubilizzato in 395 mL di

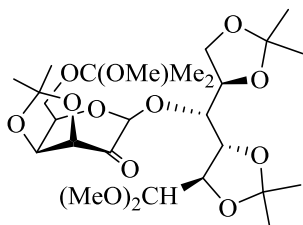
DMP, sono stati addizionati 1.10 g (5.84 mmoli, 0.1 eq) di *p*-TsOH e la soluzione è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente e sotto atmosfera inerte. Dopo 17 ore l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 4:6) ha evidenziato la presenza del diolo **106** come prodotto minoritario e del derivato **108** come prodotto maggioritario. La soluzione è stata neutralizzata con 5.0 mL di Et<sub>3</sub>N e concentrata coevaporando con toluene (4 × 30.0 mL) a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è stato ripartito tra CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL) e acqua (200 mL) e, separate le fasi, la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 150 mL). Le fasi organiche riunite sono state anidificate su MgSO<sub>4</sub>, filtrate ed il solvente eliminato a pressione ridotta. Il grezzo di reazione (30.5 g) è stato purificato mediante *flash*-cromatografia con il sistema Isolera Four Biotage<sup>®</sup> eluendo prima con *n*-esano-AcOEt 4:6 e successivamente con *n*-esano-AcOEt 3:7. Sono stati isolati il derivato **108** (14.9 g, resa 44%) ed il diolo **106** (6.35 g, resa 19%) entrambi puri all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.



Il prodotto **108** è uno sciroppo incolore e presenta caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>69</sup> <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN) δ: 4.40 (m, 1H, H-4), 4.39 (d, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> 8.1 Hz, H-1'), 4.39 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 6.9 Hz, H-1), 4.23 (m, 1H, H-5), 4.14 (dd, 1H, *J*<sub>3',4'</sub> 5.4 Hz, *J*<sub>4',5'</sub> 2.1 Hz, H-4'), 4.07 (dd, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 5.8 Hz, H-2), 4.03 (m, 1H, H-6b), 3.99 (m, 1H, H-6a), 3.95 (dd, 1H, *J*<sub>2',3'</sub> 7.3 Hz, H-3'), 3.85 (ddd, 1H, *J*<sub>5',6'a</sub> 2.0 Hz, *J*<sub>5',6'b</sub> 6.5 Hz, H-5'), 3.82 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 1.4 Hz, H-3), 3.58 (dd, 1H, *J*<sub>6'a,6'b</sub> 9.5 Hz, H-6'a), 3.51 (m, 1H, H-6'b), 3.38, 3.37 (2s, each 3H, 2 × OCH<sub>3</sub>-1), 3.33 (dd, 1H, H-2'), 3.14 (s, 3H, MIP-OCH<sub>3</sub>), 1.43, 1.39, 1.32, 1.31 [4s, each 3H, 2 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 1.28 [s, 12H, MIP-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN) δ: 110.5, 110.1, 109.0 [3 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 106.2 (C-1), 104.5 (C-1'), 100.7 [MIP-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 80.0 (C-3'), 78.5 (C-3), 78.0 (C-5), 77.8 (C-2), 76.1 (C-4), 74.8 (C-2'), 74.4 (C-4'), 73.0 (C-5'), 66.1 (C-6), 60.6 (C-6'), 56.3, 54.0 (2 × OCH<sub>3</sub>-1), 48.8 (MIP-OCH<sub>3</sub>), 28.4, 27.5, 27.0, 25.2, 24.7, 24.6 [3 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 26.5 [MIP-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. I parametri <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>69</sup>

### 3.6.2 – Preparazione del 4-*O*-[3',4'-*O*-isopropilidene-6'-*O*-(1-metossi-1-metiletil)- $\beta$ -*D*-lixo-esopiranosil-2'-ulosio]-2,3:5,6-di-*O*-isopropilidene-aldeido-*D*-glucosio dimetile acetale (**147**)

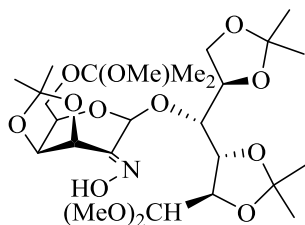
In un pallone da 500 mL e sotto atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), sono stati introdotti, 14.9 g (25.6 mmoli, 1.0 eq) di **108**, 320 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro, 4.20 g (35.8 mmoli, 1.4 eq) di 4-metilmorfolina *N*-ossido (NMO), preventivamente anidrificata su MgSO<sub>4</sub> in soluzione diclorometanica e 20.0 g di setacci molecolari 4 Å; la miscela risultante è stata mantenuta in agitazione magnetica a temperatura ambiente. Dopo 30 minuti, sono stati addizionati 450 mg (1.28 mmoli, 0.05 eq) di tetrapropilammonio perrutenato (TPAP) e la miscela, intensamente colorata in verde, è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 2.5 ore, l'analisi TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Me<sub>2</sub>CO 9:1) ha evidenziato la completa scomparsa del substrato di partenza (R<sub>f</sub> 0.50) e la formazione di un prodotto avente R<sub>f</sub> 0.53. La miscela di reazione è stata filtrata attraverso un triplo strato alternato di Celite-gel di silice-Celite. La soluzione, concentrata a pressione ridotta, ha fornito un grezzo (14.8 g) che all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR è risultato costituito esclusivamente dal 2'-cheto derivato **147**, impiegato poi senza ulteriori purificazioni nella reazione successiva.



Il 2'-cheto derivato **147** è uno sciroppo avente R<sub>f</sub> 0.53 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Me<sub>2</sub>CO 9:1) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>91</sup> <sup>1</sup>H NMR (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>):  $\delta$  5.20 (d, 1H,  $J_{1',3'}$  0.7 Hz,  $J_{2',3'}$  7.32 Hz, H-1'), 4.77 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  6.0 Hz,  $J_{2,3}$  7.3 Hz, H-2), 4.50-3.50 (m, 11H, H-3', H-4', H-5', H-6'a, H-6'b, H-1, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b), 3.44, 3.22 (2s, each 3H, 2  $\times$  OCH<sub>3</sub>-1), 3.17 (s, 3H, MIP-OCH<sub>3</sub>), 1.54, 1.40, 1.35, 1.32, 1.31, 1.20 [6s, each 3H, 3  $\times$  C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 1.42 [s, 6H, MIP-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. <sup>13</sup>C NMR (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 197.3 (C-2'), 110.9, 110.7, 108.2 [3  $\times$  C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 105.8(C-1), 100.9 (C-1'), 100.2 [MIP-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 78.4 (C-4'), 78.2 (C-3, C-3'), 77.8 (C-5); 72.2 (C-5'), 65.8 (C-6), 59.9 (C-6'), 53.5, 55.8 (2  $\times$  OCH<sub>3</sub>-1), 48.4 (MIP-OCH<sub>3</sub>), 27.7, 27.4, 26.7, 26.6, 26.2, 26.1 [3  $\times$  C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 24.5, 24.4 [MIP-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. I parametri <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>91</sup>

### 3.6.3 – Preparazione del 4-*O*-[2'-desossi-3',4'-*O*-isopropilidene-2'-idrossimmino-β-*D*-lixo-esopiranosil]-2,3:5,6-di-*O*-isopropilidene-aldeido-*D*-glucosio dimetile acetale [(*E*)-149]

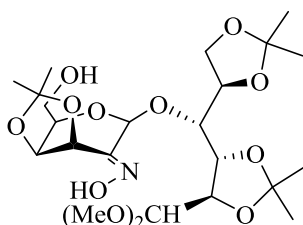
In un pallone a tre colli da 1000 mL, munito di refrigerante a bolle ed agitazione magnetica, sono stati solubilizzati 14.8 g (25.6 mmoli) di **147** grezzo in 680 mL di MeOH e la soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 30 minuti, sono stati addizionati 4.09 g (58.9 mmoli, 2.3 eq) di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 4.09 g (58.9 mmoli, 2.3 eq) di NH<sub>2</sub>OH·HCl e la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica a riflusso del solvente. Dopo 4 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 4:6) ha evidenziato la completa scomparsa del substrato di partenza (R<sub>f</sub> 0.46) e la formazione di un nuovo prodotto avente R<sub>f</sub> 0.59. La soluzione è stata concentrata a pressione ridotta ed il residuo è stato ripartito tra una soluzione acquosa satura di NaHCO<sub>3</sub> (50.0 mL) e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50.0 mL). La fase acquosa è stata poi ulteriormente estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 40.0 mL). Le fasi organiche riunite, anidrificate su MgSO<sub>4</sub>, filtrate e concentrate a pressione ridotta, hanno fornito un grezzo (17.5 g) che all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR è risultato costituito dal solo stereoisomero (*E*)-**148** impiegato poi senza ulteriori purificazioni nella reazione successiva.



Lo stereoisomero (*E*)-**148** è uno sciroppo semisolido avente R<sub>f</sub> 0.59 (*n*-esano-AcOEt 4:6) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>93</sup> <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN) δ: 5.46 (dd, 1H, *J*<sub>1',3'</sub> 0.7 Hz, *J*<sub>3',4'</sub> 7.9 Hz, H-3'), 5.40 (d, 1H, H-1'), 4.46 (dd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 6.2 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 7.6 Hz, H-2), 4.34 (d, 1H, H-1), 4.33 (dd, 1H, *J*<sub>4',5'</sub> 1.3 Hz, H-4'), 4.17 (m, 1H, H-5), 4.06 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 1.3 Hz, H-3), 4.02 (dd, 1H, *J*<sub>5,6b</sub> 6.0 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 8.4 Hz, H-6b), 3.97 (dd, 1H, *J*<sub>5,6a</sub> 6.2 Hz, H-6a), 3.87 (dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 6.2 Hz, H-4), 3.45 (m, 3H, H-5', H-6'a, H-6'b), 3.38, 3.37 (2s, each 3H, 2 × OCH<sub>3</sub>-1), 3.15 (s, 3H, MIP-OCH<sub>3</sub>), 1.45, 1.39, 1.33, 1.31, 1.30, 1.29 [6s, each 3H, 3 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 1.28 [s, 6H, MIP-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN) δ: 151.8 (C-2'), 111.3, 110.6, 109.3 [3 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 106.3 (C-1), 100.9 [MIP-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 100.6 (C-1'), 78.7 (C-3), 77.7, 77.6 (C-4, C-5), 75.9 (C-2), 73.9 (C-4'), 72.0 (C-5'), 66.9 (C-6), 65.4 (C-3'), 60.6 (C-6'), 56.1, 53.7 (2 × OCH<sub>3</sub>-1), 48.9 (MIP-OCH<sub>3</sub>), 27.6, 27.2, 27.0, 26.6, 25.9, 24.9 [3 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 24.8, 24.7 [MIP-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. I parametri <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>93</sup>



In un pallone a tre colli da 500 mL, munito di agitazione magnetica e refrigerante a bolle, è stato solubilizzato il grezzo contenente lo stereoisomero (*E*)-**148** (17.5 g) in 192 mL di una miscela MeOH-acqua 10:1; la soluzione è stata poi acidificata con 0.5 mL di AcOH glaciale e mantenuta in agitazione a 40°C. Dopo 24 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 3:7) ha evidenziato la completa scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.66) e la formazione di un prodotto avente  $R_f$  0.40. Dopo neutralizzazione della miscela di reazione per aggiunta di Et<sub>3</sub>N (3.0 mL), la soluzione è stata concentrata coevaporando con toluene (3 × 40.0 mL) a pressione ridotta. È stato ottenuto un residuo (13.3 g) che all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR è risultato costituito esclusivamente dallo stereoisomero (*E*)-**149**, impiegato poi senza ulteriori purificazioni nella reazione successiva.

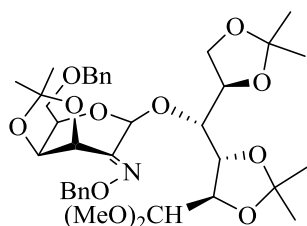


Lo stereoisomero (*E*)-**149** è una schiuma bianca avente  $R_f$  0.40 (*n*-esano-AcOEt 3:7) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>93</sup> <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$ : 5.46 (d, 1H,  $J_{3',4'}$  7.9 Hz, H-3'), 5.31 (s, 1H, H-1'), 4.63 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  6.6 Hz,  $J_{2,3}$  7.9 Hz, H-2), 4.37 (d, 1H, H-1), 4.26 (dd, 1H,  $J_{4',5'}$  1.8 Hz, H-4'), 4.19 (m, 1H, H-5), 4.05 (dd, 1H,  $J_{5,6b}$  6.0 Hz,  $J_{6a,6b}$  8.6 Hz, H-6b), 4.03 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  1.4 Hz, H-3), 3.99 (dd, 1H,  $J_{5,6a}$  6.3 Hz, H-6a), 3.90 (dd, 1H,  $J_{4,5}$  6.4 Hz, H-4), 3.66 (dd, 1H,  $J_{5',6'b}$  8.1 Hz,  $J_{6'a,6'b}$  11.6 Hz, H-6'b), 3.55 (dd, 1H,  $J_{5',6'a}$  4.4 Hz, H-6'a), 3.39 (m, 1H, H-5'), 3.40, 3.38 (2s, each 3H, 2 × OCH<sub>3</sub>), 3.10 (bs, 1H, OH-6), 2.70 (bs, 1H, N-OH), 1.47, 1.43, 1.39, 1.36, 1.32, 1.30 [6s, each 3H, 3 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$ : 151.4 (C-2'), 111.3, 110.2, 109.5 [3 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 107.2 (C-1), 100.9 (C-1'), 78.6 (C-3), 78.2 (C-4), 77.6 (C-5), 75.7 (C-2), 74.0 (C-5'), 73.5 (C-4'), 66.7 (C-6), 66.0 (C-3'), 61.8 (C-6'), 56.9, 53.8 (2 × OCH<sub>3</sub>), 27.4, 27.1, 27.0, 26.8, 25.9, 24.9 [3 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. I parametri <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>93</sup>

#### 3.6.4 – Preparazione del 4-*O*-[2'-benzilossima-6'-*O*-benzil 2'-desossi-3',4'-*O*-isopropilidene- $\beta$ -D-lixo-esopiranosil]-2,3:5,6-di-*O*-isopropilidene-aldeido-D-glucosio dimetile acetale [(*E*)-**150**]

In un pallone da 250 mL è stato solubilizzato il grezzo (*E*)-**149** (13.3 g) in 160 mL di una miscela THF+0.5% v/v di acqua. Successivamente sono stati addizionati 0.34

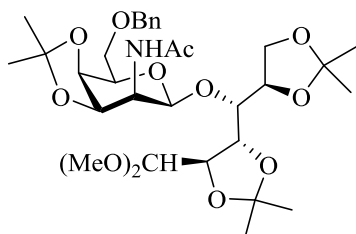
g (1.28 mmoli, 0.05 eq) di etere corona 18-*crown*-6 e, dopo raffreddamento della miscela a 0°C, sono stati aggiunti 11.5 g (205 mmoli, 8.0 eq) di KOH in polvere lasciando in agitazione a 0°C. Dopo 30 minuti, sono stati addizionati 12.2 mL (102 mmoli, 4.0 eq) di bromuro di benzile (BnBr) e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 5 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 6:4) ha mostrato la completa scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.16) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.47. Dopo raffreddamento a 0°C, sono stati addizionati 6.0 mL di MeOH e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per 10 minuti. Eliminati i solventi mediante evaporazione a pressione ridotta, il residuo è stato ripartito tra H<sub>2</sub>O (60.0 mL) e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60.0 mL) e la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 50.0 mL). Le fasi organiche riunite, anidrificate su MgSO<sub>4</sub>, filtrate e concentrate a pressione ridotta hanno fornito un grezzo (22.5 g) che è stato purificato mediante *flash*-cromatografia con il sistema Isolera Four Biotage® eluendo con *n*-esano-AcOEt 8:2. È stata isolata l'ossima benzilata (**E**)-**150** (13.0 g, resa 72% calcolata a partire dall'alcol **108**) pura all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.



Lo stereoisomero (**E**)-**150** è uno sciroppo avente  $R_f$  0.47 (*n*-esano-AcOEt 6:4) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>93</sup> <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.38-7.26 (m, 10H, Ar-H), 5.49 (d, 1H,  $J_{3',4'}$  7.6 Hz, H-3'), 5.49 (s, 1H, H-1'), 5.19, 5.02 (sistema AB, 2H,  $J_{A,B}$  12.7 Hz, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.63 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  6.8 Hz, H-2), 4.49, 4.56 (sistema AB, 2 H,  $J_{A,B}$  11.9 Hz, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.37 (d, 1H,  $J_{1,2}$  6.6 Hz, H-1), 4.31 (dd, 1H,  $J_{4',5'} < 0.5$  Hz, H-4'), 4.24 (m, 1H, H-5), 4.15-3.93 (m, 4H, H-3, H-4, H-6a, H-6b), 3.68 (m, 1H, H-6'a), 3.62 (dd, 1H,  $J_{6'a,6'b}$  9.5 Hz,  $J_{5',6'b}$  6.0 Hz, H-6'b), 3.50 (m, 1H, H-5'), 3.35, 3.34 (2s, each 3 H, 2 × OCH<sub>3</sub>), 1.53, 1.42, 1.38, 1.37, 1.34, 1.33 [6s, each 3H, 3 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 150.3 (C-2'), 137.9, 137.0 (2 × Ar-C), 128.2-127.5 (Ar-CH), 110.2, 110.0, 108.3 [3 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 104.8 (C-1), 99.5 (C-1'), 78.0, 77.4, 76.3, 76.4 (C-2, C-3, C-4, C-5), 76.8, 73.4 (2 × Ph-CH<sub>2</sub>), 73.1 (C-4'), 71.0 (C-5'), 68.8 (C-6'), 65.7 (C-6), 65.1 (C-3'), 55.0, 52.0 (2 × OCH<sub>3</sub>), 27.3, 26.6, 26.5, 26.1, 25.7, 24.7 [3 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. I parametri <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>93</sup>

### 3.6.5 – Preparazione 4-*O*-[2'-acetammido-6'-*O*-benzil-2'-desossi-3',4'-*O*-isopropilidene- $\beta$ -D-talopiranosil]-2,3:5,6-di-*O*-isopropilidene-aldeido-D-glucosio dimetile acetale (**151**)

In un pallone a tre colli da 1000 mL munito di refrigerante a bolle ed imbuto gocciolatore, sotto atmosfera inerte, sono stati sospesi 7.00 g di  $\text{LiAlH}_4$  (184 mmoli, 10.0 eq) in 230 mL di  $\text{Et}_2\text{O}$  anidro e, dopo raffreddamento della sospensione a  $0^\circ\text{C}$ , è stata gocciolata lentamente, nell'arco di 30 minuti, una soluzione ottenuta disciogliendo 12.9 g (18.5 mmoli, 1.0 eq) di ossima benzilata (**E**)-**150** in 55.0 mL di  $\text{Et}_2\text{O}$  anidro. La sospensione è stata portata a temperatura ambiente e, in seguito, è stata mantenuta in agitazione a riflusso del solvente. Dopo 20 ore, l'analisi TLC (AcOEt) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.76) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.15. Sono stati addizionati, in successione, acqua (10.0 mL), NaOH al 10% (10.5 mL) e acqua (40.0 mL) fino ad ottenere un precipitato bianco. Dopo filtrazione e lavaggio del solido con  $\text{Et}_2\text{O}$ , le fasi eteree riunite sono state concentrate a pressione ridotta. Il grezzo ottenuto (9.40 g) è stato sottoposto a *N*-acetilazione mediante addizione di 240 mL di MeOH e, a seguire, di 57.0 mL di anidride acetica. Trascorse 16 ore a temperatura ambiente, l'analisi TLC (AcOEt) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.15) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.60. La miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta, mediante coevaporazione con toluene ( $4 \times 40.0$  mL) ed il grezzo di reazione è stato purificato mediante *flash*-cromatografia con il sistema Isolera Four Biotage® eluendo con *n*-esano-AcOEt 2:8. È stata isolata la *N*-acetilammina **151**, a configurazione D-talo, (8.04 g, resa 68%) pura all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.

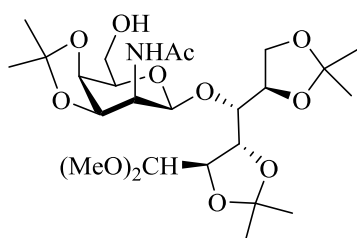


Il derivato **151** è uno sciroppo avente  $R_f$  0.60 (AcOEt) e caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>94</sup>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 7.39-7.28 (m, 5H, Ar-H), 6.36 (d, 1H,  $J_{2',\text{NH}}$  9.0 Hz, NH), 4.87 (d, 1H,  $J_{1',2'}$  2.5 Hz, H-1'), 4.51, 4.58 (sistema AB, 2H,  $J_{A,B}$  12.1 Hz, Ph- $\text{CH}_2$ ), 4.43 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  6.1 Hz,  $J_{2,3}$  7.0 Hz, H-2), 4.37 (m, 1H, H-2'), 4.33 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  1.4 Hz,  $J_{4,5}$  2.6 Hz, H-4), 4.30 (d, 1H, H-1), 4.22 (dd, 1H,  $J_{3',4'}$  7.0 Hz,  $J_{4',5'}$  3.8 Hz, H-4'), 4.20 (ddd, 1H,  $J_{5,6a}$  6.1 Hz,  $J_{5,6b}$  6.6 Hz, H-5), 3.98 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  7.0 Hz, H-3), 4.00-3.88 (m, 4H, H-5', H-3', H-6a, H-6b), 3.70 (dd, 1H,  $J_{5',6'a}$  5.4

Hz,  $J_{6'a,6'b}$  10.1 Hz, H-6'a), 3.63 (dd, 1H,  $J_{5',6'b}$  6.7 Hz, H-6'b), 3.30, 3.31 (2s, each 3H,  $2 \times \text{OCH}_3$ ), 1.88 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.43, 1.37, 1.31, 1.30, 1.28, 1.27 [6s, each 3H,  $3 \times \text{C}(\text{CH}_3)_2$ ].  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 170.4 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 139.6 (Ar-C), 129.6-128.5 (Ar-CH), 110.8, 110.0, 108.7 [ $3 \times \text{C}(\text{CH}_3)_2$ ], 106.2 (C-1), 100.1 (C-1'), 78.9, 78.4, 76.4, 76.2 (C-3', C-3, C-4, C-5), 73.7 (Ph- $\text{CH}_2$ ), 73.7, 72.8, 72.5 (C-2, C-4', C-5'), 69.8 (C-6'), 65.9 (C-6), 55.9, 54.1 ( $2 \times \text{OCH}_3$ ), 48.6 (C-2'), 28.1, 27.7, 26.9, 26.7, 26.4, 25.3 [ $3 \times \text{C}(\text{CH}_3)_2$ ], 23.5 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ). I parametri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>94</sup>

### 3.6.6 – Preparazione del 4-O-[2'-acetammido-2'-desossi-3',4'-O-isopropilidene- $\beta$ -D-talopiranosil]-2,3:5,6-di-O-isopropilidene-aldeido-D-glucosio dimetile acetale (146)

In un pallone da 25 mL, 300 mg (0.47 mmoli, 1.0 eq) di **151** sono stati solubilizzati in 8.5 mL di MeOH, sono stati addizionati 50.1 mg di Pd/C al 10% e la miscela di reazione è stata sottoposta ad agitazione magnetica sotto atmosfera di  $\text{H}_2$ . Dopo 24 ore, poiché l'analisi TLC (AcOEt) evidenziava ancora la presenza del substrato di partenza, sono stati addizionati 60.0 mg di Pd/C e la sospensione è stata mantenuta in agitazione sotto atmosfera di  $\text{H}_2$ . Dopo 4 giorni dall'inizio della reazione, la TLC (AcOEt) ha evidenziato la completa scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.60) e la formazione di un prodotto avente  $R_f$  0.30. La miscela di reazione è stata filtrata mediante un triplostrato alternato (Celite-gel di silice-Celite) e, dopo eliminazione del solvente a pressione ridotta, il grezzo (262 mg) è stato purificato mediante *flash*-cromatografia con il sistema Isolera Four Biotage® eluendo con AcOEt. È stato isolato l'alcol **146** (252 mg, resa 97%) puro all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.



Il derivato **146** è uno sciroppo avente  $R_f$  0.30 (AcOEt) e caratteristiche chimico-fisiche-analoghe a quelle riportate in letteratura.<sup>95</sup>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 6.71 (d, 1H,  $J_{2',\text{NH}'}$  9.4 Hz, NH), 4.56 (d, 1H,  $J_{1',2'}$  1.8 Hz, H-1'), 4.48 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  6.8 Hz,  $J_{2,3}$  7.4 Hz, H-2), 4.37 (m, 1H, H-2'), 4.35 (d, 1H, H-1), 4.35 (m, 1H, H-3'), 4.20 (m, 1H, H-5), 4.10 (m, 1H, H-4'), 3.95 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  1.4 Hz,  $J_{2,3}$  7.0 Hz, H-3), 3.94 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.89 (dd, 1H,  $J_{4,5}$  4.0 Hz, H-4), 3.82 (m, 1H, H-5'), 3.78 (m, 1H, H-6'b), 3.62 (m, 1H, H-6'a), 3.41,

3.40 (2s, each 3H, 2 × OCH<sub>3</sub>), 1.88 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.40, 1.35, 1.30, 1.29, 1.28, 1.25 [6s, each 3H, 3 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN) δ: 171.7 (CH<sub>3</sub>CO), 110.6, 110.3, 108.9 [3 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 107.5 (C-1), 100.5 (C-1'), 78.8 (C-3), 78.2 (C-5), 76.2 (C-2), 75.9 (C-4), 75.2 (C-3'), 73.9 (C-5'), 72.0 (C-4'), 65.7 (C-6), 62.1 (C-6'), 57.5, 54.9 (2 × OCH<sub>3</sub>), 49.0 (C-2'), 27.4, 26.9, 26.8, 26.2, 25.5, 25.4 [3 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 23.4 (CH<sub>3</sub>CO). I parametri <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>95</sup>

### 3.7 – Preparazione dei glicoconjugati mono- e disaccaridici protetti 110-113

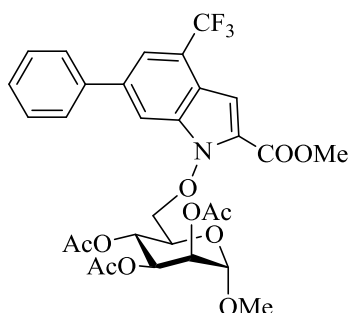
#### 3.7.1 – Procedura generale per la reazione di Mitsunobu

In un pallone a due colli da 50 mL, sotto atmosfera inerte, è stato solubilizzato l'appropriato zucchero (1.00 mmoli, 1.0 eq) in 20.0 mL di THF anidro, è stato poi addizionato il nucleofilo (NHI) **25** (1.30 mmoli, 1.3 eq) e, dopo raffreddamento a 0°C, sono stati aggiunti 918 mg (3.50 mmoli, 3.5 eq) di PPh<sub>3</sub> (preventivamente anidrificata in pistola, 1-1.5 ore a 0.1 mmHg) e 820 mg (3.50 mmoli, 3.5 eq) di DMEAD o in alternativa 0.69 mL (3.50 mmoli, 3.5 eq) di DIAD. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente, seguendo l'evolvere della reazione mediante analisi TLC. Dopo aver verificato la scomparsa del precursore saccaridico e la formazione del prodotto, la miscela è stata diluita con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (35.0 mL) ed è stata addizionata una soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub> (35.0 mL). Dopo separazione delle fasi, la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 25.0 mL). Le fasi organiche riunite, anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrate e concentrate a pressione ridotta hanno fornito un grezzo che è stato purificato mediante *flash*-cromatografia eluendo con l'opportuna miscela eluente.

#### 3.7.2 – Preparazione del mannoconjugato protetto 110

La reazione di Mitsunobu è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 60.0 mg (0.19 mmoli, 1.0 eq) dell'alcol **128**, 81.5 mg (0.24 mmoli, 1.3 eq) di derivato indolico **25**, 3.8 mL di THF anidro, 172 mg (0.65 mmoli, 3.5 eq) di PPh<sub>3</sub> e 129 µL (0.65 mmoli, 3.5 eq) di DIAD. Dopo 3 ore, mantenendo la soluzione in agitazione a

temperatura ambiente, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 1:1) ha evidenziato la scomparsa dell'alcol **115** ( $R_f$  0.21), la presenza di tracce del derivato indolico in eccesso ( $R_f$  0.60) e la formazione di un prodotto avente  $R_f$  0.58. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, il grezzo ottenuto (450 mg) è stato purificato attraverso doppia *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo con *n*-esano-AcOEt 7:3. È stato isolato il mannoconiugato **110** (54.3 mg, resa 46%), puro all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.

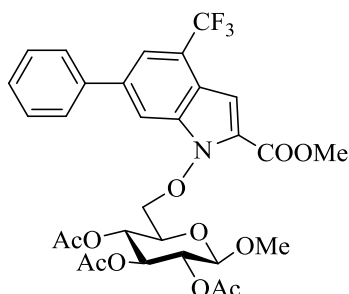


Il derivato **110** è un olio incolore avente  $R_f$  0.58 (*n*-esano-AcOEt 1:1).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 8.13 (m, 1H, Ar-H), 7.81 (m, 1H, Ar-H), 7.77-7.64 (m, 2H, Ar-H), 7.55-7.39 (m, 3H, Ar-H), 7.22 (qd, 1H, Ar-H), 5.33 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  10.2 Hz,  $J_{4,5}$  9.8 Hz, H-4), 5.23 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  6.2 Hz, H-3), 4.90 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  1.4 Hz, H-2), 4.86 (d, 1H, H-1), 4.68 (dd, 1H,  $J_{5,6b}$  5.6 Hz,  $J_{6a,6b}$  10.1 Hz, H-6b), 4.52 (dd, 1H,  $J_{5,6a}$  2.3 Hz, H-6a), 4.28 (ddd, 1H, H-5), 3.92 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.44 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ -1), 2.04, 2.02, 1.95 (3s, each 3H,  $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 171.0, 170.9, 170.8 ( $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ), 160.5 ( $\text{COOCH}_3$ ), 140.5, 139.4, 137.2, 130.7 ( $4 \times \text{Ar-C}$ ), 130.1, 129.1, 128.3 (Ph-CH), 124.3-123.3 ( $\text{CF}_3 + \text{Ar-C}$ ), 120.0 (Ar-CH), 117.6 (Ar-C), 112.7, 105.4 ( $2 \times \text{Ar-CH}$ ), 99.5 (C-1), 78.9 (C-6), 72.7 (C-2), 70.1 (C-3), 69.4 (C-5), 66.4 (C-4), 55.9 ( $\text{OCH}_3$ -1), 52.9 ( $\text{COOCH}_3$ ), 22.1, 21.0, 20.9 ( $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ).

### 3.7.3 – Preparazione del glucoconiugato protetto 111

La reazione di Mitsunobu è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 36.5 mg (0.11 mmoli, 1.0 eq) dell'alcol **129**, 50.0 mg (0.15 mmoli, 1.3 eq) del derivato indolico **25**, 2.3 mL di THF anidro, 105 mg (0.40 mmoli, 3.5 eq) di  $\text{PPh}_3$  e 93.4 mg (0.40 mmoli, 3.5 eq) di DMEAD. Dopo 4 ore, mantenendo la soluzione in agitazione a temperatura ambiente, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 1:1) ha evidenziato la scomparsa dell'alcol **129** ( $R_f$  0.20), la presenza di tracce del derivato indolico in eccesso ( $R_f$  0.60) e la formazione di un prodotto avente  $R_f$  0.53. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, il grezzo

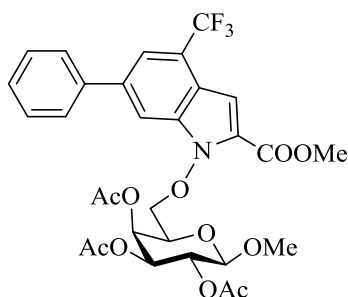
ottenuto (265 mg) è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo con *n*-esano-AcOEt 65:35. È stato isolato il glucoconiugato **111** (62.4 mg, resa 86%) puro all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.



Il derivato **111** è un solido giallo avente  $R_f$  0.53 (*n*-esano-AcOEt 1:1).  $[\alpha]_D^{25} - 11.5$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); p.f. 190-194°C (sul cromatografato).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 8.04 (m, 1H, Ar-H), 7.80 (m, 1H, Ar-H), 7.76 (m, 1H, Ar-H), 7.73 (m, 1H, Ar-H), 7.59-7.40 (m, 3H, Ar-H), 7.18 (qd, 1H,  $J$  0.9 Hz,  $J$  1.7 Hz, Ar-H), 5.27 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  9.8 Hz,  $J_{3,4}$  9.5 Hz, H-3), 5.10 (dd, 1H,  $J_{4,5}$  10.1 Hz, H-4), 4.93 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  8.0 Hz, H-2), 4.63 (dd, 1H,  $J_{5,6b}$  5.8 Hz,  $J_{6a,6b}$  10.8 Hz, H-6b), 4.56 (d, 1H, H-1), 4.49 (dd, 1H,  $J_{5,6a}$  2.1 Hz, H-6a), 4.10 (ddd, 1H, H-5), 3.91 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.33 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ -1), 2.02, 2.00, 1.95 (3s, each 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 170.9, 170.7, 170.4 ( $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ), 160.5 ( $\text{COOCH}_3$ ), 140.5, 139.5, 137.2, 130.4 ( $4 \times \text{Ar-C}$ ), 130.0, 129.1, 128.3 (Ph-CH), 124.3-123.3 ( $\text{CF}_3 + \text{Ar-C}$ ), 120.1 (Ar-CH), 117.5 (Ar-C), 112.5, 105.4 ( $2 \times \text{Ar-CH}$ ), 102.1 (C-1), 78.4 (C-6), 73.5 (C-3), 72.5 (C-5), 71.9 (C-2), 69.2 (C-4), 57.3 ( $\text{OCH}_3$ -1), 52.9 ( $\text{COOCH}_3$ ), 21.0-20.8 ( $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ).

### 3.7.4 – Preparazione del galattoconiugato protetto **112**

La reazione di Mitsunobu è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 60.0 mg (0.19 mmoli, 1.0 eq) dell'alcol **130**, 81.5 mg (0.24 mmoli, 1.3 eq) di derivato indolico **25**, 3.8 mL di THF anidro, 172 mg (0.65 mmoli, 3.5 eq) di  $\text{PPh}_3$  e 153 mg (0.65 mmoli, 3.5 eq) di DMEAD. Dopo 4 ore, mantenendo la soluzione in agitazione a temperatura ambiente, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 1:1) ha evidenziato la scomparsa dell'alcol **130** ( $R_f$  0.18), la presenza di tracce del derivato indolico in eccesso ( $R_f$  0.60) e la formazione di un prodotto avente  $R_f$  0.55. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, il grezzo ottenuto (483 mg) è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo con *n*-esano-AcOEt 7:3. È stato isolato il galattoconiugato **112** (80.6 mg, resa 68%) puro all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.

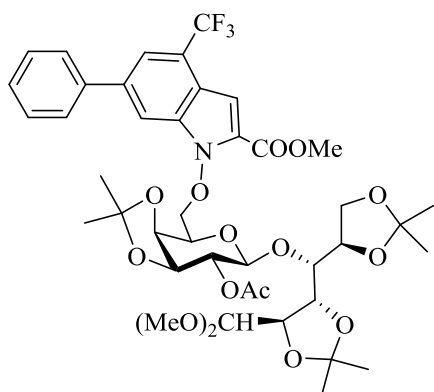


Il derivato **112** è un solido giallo avente  $R_f$  0.55 (*n*-esano-AcOEt 1:1); p.f. 169-174°C (sul cromatografato).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 7.99 (m, 1H, Ar-H), 7.78 (m, 1H, Ar-H), 7.77-7.72 (m, 2H, Ar-H), 7.54-7.38 (m, 3H, Ar-H), 7.18 (qd, 1H,  $J$  1.0 Hz,  $J$  1.7 Hz, Ar-H), 5.46 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  3.4 Hz,  $J_{4,5}$  1.1 Hz, H-4), 5.10 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  10.5 Hz, H-3), 5.03 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  7.8 Hz, H-2), 4.64 (dd, 1H,  $J_{5,6a}$  7.5 Hz,  $J_{6a,6b}$  9.9 Hz, H-6a), 4.62 (dd, 1H,  $J_{5,6b}$  3.1 Hz, H-6b), 4.51 (d, 1H, H-1), 4.35 (ddd, 1H, H-5), 3.91 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.35 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ -1), 2.07, 2.01, 1.92 (3s, each 3H,  $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 171.4, 170.9, 170.7 ( $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ), 160.5 ( $\text{COOCH}_3$ ), 140.5, 139.6, 137.2, 130.8 ( $4 \times \text{Ar-C}$ ), 130.0, 129.5, 128.3 (Ph-CH), 124.3-123.2 ( $\text{CF}_3 + \text{Ar-C}$ ), 120.0 (Ar-CH), 117.4 (Ar-C), 112.5, 105.4 ( $2 \times \text{Ar-CH}$ ), 102.5 (C-1), 78.9 (C-6), 71.7 (C-3), 71.6 (C-5), 69.7 (C-2), 69.1 (C-4), 57.5 ( $\text{OCH}_3$ -1), 52.9 ( $\text{COOCH}_3$ ), 20.9, 20.8, 20.7 ( $3 \times \text{CH}_3\text{CO}$ ).

### 3.7.5 – Preparazione del glicocongiugato disaccaridico protetto **113**

La reazione di Mitsunobu è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 85 mg (0.15 mmoli, 1.0 eq) dell'alcol disaccaridico **131**, 67.3 mg (0.20 mmoli, 1.3 eq) di derivato indolico **25**, 3.1 mL di THF anidro, 185 mg (0.70 mmoli, 3.5 eq) di  $\text{PPh}_3$  e 165 mg (0.70 mmoli, 3.5 eq) di DMEAD. Dopo 3.5 ore, mantenendo la soluzione in agitazione a temperatura ambiente, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 1:1) ha evidenziato la scomparsa dell'alcol **131** ( $R_f$  0.28), la presenza di tracce del derivato indolico in eccesso ( $R_f$  0.60) e la formazione di un prodotto avente  $R_f$  0.63. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, il grezzo ottenuto (467 mg) è stato purificato mediante *flash*-cromatografia su gel di silice eluendo con *n*-esano-AcOEt 7:3. È stato isolato il glicocongiugato disaccaridico **113** (99.8 mg, resa 75%) puro all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.





Il derivato **113** è un solido schiumoso giallo avente  $R_f$  0.63 (*n*-esano-AcOEt 1:1).  $[\alpha]_D^{25} - 14.1$  (*c* 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); p.f. 74-80°C (sul cromatografato).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 8.05 (m, 1H, Ar-H), 7.77 (m, 1H, Ar-H), 7.76-7.72 (m, 2H, Ar-H), 7.56-7.40 (m, 3H, Ar-H), 7.25 (qd, 1H,  $J$  0.9 Hz,  $J$  1.7 Hz, Ar-H), 4.92 (dd, 1H,  $J_{1',2'}$  8.3 Hz,  $J_{2',3'}$  7.6 Hz, H-2'), 4.79 (d, 1H, H-1'), 4.73 (dd, 1H,  $J_{5',6'b}$  6.5

Hz,  $J_{6'a,6'b}$  10.1 Hz, H-6'b), 4.68 (dd, 1H,  $J_{5',6'a}$  5.2 Hz, H-6'a), 4.39 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  5.6 Hz,  $J_{2,3}$  6.7 Hz, H-2), 4.30 (d, 1H, H-1), 4.29-4.21 (m, 2H, H-4', H-5'), 4.16 (dd, 1H,  $J_{3',4'}$  5.2 Hz, H-3'), 4.15-3.96 (m, 2H, H-3, H-5), 3.99 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  1.6 Hz,  $J_{4,5}$  3.1 Hz, H-4), 3.96 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.83 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.29, 3.24 (2s, each 3H,  $2 \times \text{OCH}_3$ -1), 2.06 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1.49, 1.38 [2s, each 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ], 1.28 [s, 6H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ], 1.27, 1.25 [2s, each 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ].  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 170.3 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 160.3 ( $\text{COOCH}_3$ ), 140.6, 139.8, 137.6, 131.4 ( $4 \times \text{Ar-C}$ ), 129.8, 128.9, 128.4 (Ph-CH), 124.7-123.5 ( $\text{CF}_3 + \text{Ar-C}$ ), 120.2 (Ar-CH), 117.3 (Ar-C), 112.3 (Ar-CH), 111.1, 110.8, 108.5 [ $3 \times \text{C}(\text{CH}_3)_2$ ], 106.1 (C-1), 105.6 (Ar-CH), 101.0 (C-1'), 78.7 (C-6'), 78.4 (C-5), 78.2 (C-3), 77.6 (C-3'), 76.7 (C-2), 76.0 (C-4), 74.7 (C-4'), 73.3 (C-2'), 70.5 (C-5'), 65.2 (C-6), 56.2, 54.5 ( $2 \times \text{OCH}_3$ -1), 52.8 ( $\text{COOCH}_3$ ), 28.1, 27.7, 26.8, 26.5, 26.3, 24.8 [ $3 \times (\text{CH}_3)_2\text{C}$ ], 21.1 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

### 3.8 – Tentativo di preparazione del glicoconjugato disaccaridico $\beta$ -D-talosaminico protetto **145**

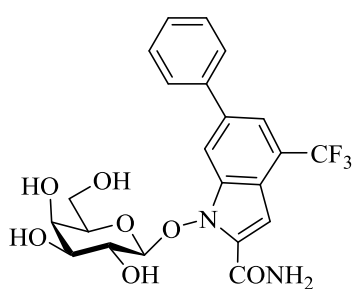
La reazione di Mitsunobu è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 87.9 mg (0.16 mmoli, 1.0 eq) dell'alcol disaccaridico **146**, 69.7 mg (0.21 mmoli, 1.3 eq) di derivato indolico **25**, 3.2 mL di THF anidro, 147 mg (0.56 mmoli, 3.5 eq) di  $\text{PPh}_3$  e 131 mg (0.56 mmoli, 3.5 eq) di DMEAD. Dopo 24 ore, mantenendo la soluzione in agitazione a temperatura ambiente, l'analisi TLC (AcOEt) ha evidenziato sia la presenza dell'alcol **146** ( $R_f$  0.25) che del derivato indolico **25** in eccesso ( $R_f$  0.75). La miscela di reazione è stata scaldata a 50°C e, dopo 6.5 ore a 50°C e 3 giorni

a temperatura ambiente, la TLC ha evidenziato una complessa miscela di prodotti difficilmente separabili. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, è stato ottenuto un grezzo (509 mg) che all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR è risultato costituito oltre che dai precursori **146** e **25**, da una miscela di prodotti difficilmente identificabili.

### 3.9 – Preparazione dei glicocongiugati ammidici deprotetti **41 $\beta$** e **42 $\beta$**

#### 3.9.1 – Preparazione del glicocongiugato ammidico monosaccaridico **41 $\beta$**

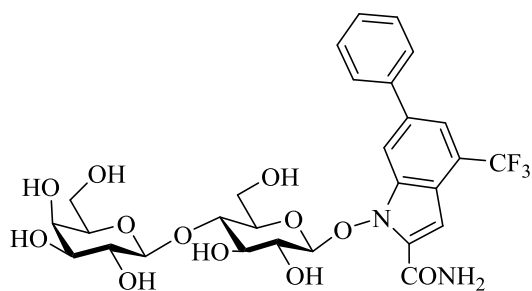
In un pallone da 25 mL sono stati solubilizzati 68.5 mg (0.10 mmoli, 1.0 eq) di **58 $\beta$**  in 2.0 mL di una soluzione costituita da  $\text{NH}_3\text{-MeOH}$  (7N) (1.0 mL) e MeOH (1.0 mL) e la miscela ottenuta è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 16 ore, poiché l'analisi TLC ( $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  8:2) mostrava ancora la presenza del substrato di partenza ( $R_f$  0.90), sono stati aggiunti 0.6 mL di soluzione  $\text{NH}_3\text{-MeOH}$  (7N)-MeOH 1:1. Dopo 3 ore dall'ultima aggiunta, l'analisi TLC ( $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  8:2) ha mostrato la completa scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.90) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.24. Concentrata la soluzione a pressione ridotta, è stato ottenuto un grezzo (48.0 mg, resa 98%) che, dopo triturazione con  $\text{Et}_2\text{O}$ , ha permesso di isolare l'ammide **41 $\beta$**  (25.1 mg, resa 51%) pura all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.



L'ammide **41 $\beta$**  è un solido avorio avente  $R_f$  0.24 ( $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  8:2); p.f. 161-166°C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD-D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 8.24 (bs, 1H, Ar-H), 7.76-7.70 (m, 3H, Ar-H), 7.55-7.43 (m, 3H, Ar-H), 7.18 (bs, 1H, Ar-H), 5.10 (d, 1H,  $J_{1,2}$  8.3 Hz, H-1), 3.96-3.79 (m, 3H, H-2, H-6a, H-6b), 3.77-3.57 (m, 1H, H-3, H-4, H-5).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD-CDCl}_3$ )  $\delta$ : 157.4 (C=O), 140.4, 139.3, 137.5, 132.3 (4  $\times$  Ar-C), 129.5, 128.7, 128.2 (Ph-CH), 125.1-123.8 ( $\text{CF}_3$  + Ar-C), 119.4 (Ar-CH), 118.1 (Ar-C), 113.5 (Ar-CH), 110.2 (C-1), 106.7 (Ar-CH), 76.5 (C-5), 74.4 (C-3), 72.5 (C-2), 69.8 (C-4), 62.0 (C-6).

### 3.9.2 – Preparazione del glicocongiugato ammidico disaccaridico 42β

In un pallone da 25 mL sono stati solubilizzati 65.7 mg (0.069 mmoli, 1.0 eq) di **59β** in 1.5 mL di una soluzione costituita da NH<sub>3</sub>-MeOH (7N) (1.0 mL) e MeOH (1.0 mL) e la miscela ottenuta è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 18 ore, poiché l'analisi TLC (CHCl<sub>3</sub>-MeOH 8:2) mostrava ancora la presenza del substrato di partenza (R<sub>f</sub> 0.95), sono stati aggiunti 0.2 mL di soluzione NH<sub>3</sub>-MeOH (7N)-MeOH 1:1. Dopo 1 ora dall'ultima aggiunta, l'analisi TLC (CHCl<sub>3</sub>-MeOH 8:2) ha evidenziato la completa scomparsa del substrato di partenza (R<sub>f</sub> 0.95) e la formazione di un unico prodotto avente R<sub>f</sub> 0.10. Concentrata la soluzione a pressione ridotta, è stato ottenuto un grezzo (42.9 mg, resa 96%) che, dopo triturazione con Et<sub>2</sub>O, ha permesso di isolare l'ammide **42β** (37.0 mg, resa 83%) pura all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.



L'ammide disaccaridica **42β** è un solido avorio avente R<sub>f</sub> 0.10 (CHCl<sub>3</sub>-MeOH 8:2); p.f. 139-143°C. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD-CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.32 (m, 1H, Ar-H), 7.79-7.75 (m, 3H, Ar-H), 7.55-7.43 (m, 3H, Ar-H), 7.21 (bs, 1H, Ar-H), 5.24 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> 7.9 Hz, H-1), 4.40 (d, 1H, J<sub>1,2'</sub> 7.6 Hz, H-1'), 3.98-3.48 (m, 12H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'a, H-6'b). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD-CDCl<sub>3</sub>) δ: 157.3 (C=O), 140.6, 139.8, 135.3, 130.6 (4 × Ar-C), 130.2, 129.1, 128.2 (Ph-CH), 124.3-122.8 (CF<sub>3</sub> + Ar-C), 120.3 (Ar-CH), 117.8 (Ar-C), 114.0, 109.2 (2 × Ar-CH), 104.4 (C-1, C-1'), 78.9 (C-4), 76.7 (C-5, C-3), 75.8 (C-5'), 74.1 (C-3'), 72.7 (C-2'), 72.1 (C-2), 69.8 (C-4'), 62.3 (C-6'), 61.0 (C-6).

### 3.10 – Preparazione dei glicocongiugati deprotetti 33α, 33β, 34β, 37-40

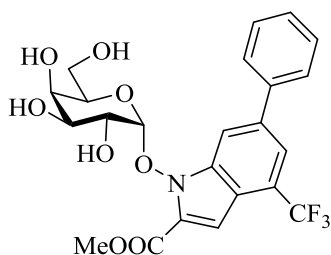
#### 3.10.1 – Procedura generale di desacetilazione

In un pallone da 100 mL è stato solubilizzato l'opportuno glicosil derivato (1.00 mmoli, 1.0 eq) in 46.0 mL di una miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 2:3. La soluzione è stata raffreddata a 0°C, sono stati addizionati 575 μL di una soluzione 0.33 M di MeONa in MeOH (0.19 mmoli di MeONa, 0.19 eq) e la miscela di reazione è stata lasciata in

agitazione a temperatura ambiente. Dopo aver verificato la scomparsa del substrato di partenza e la formazione di un unico prodotto tramite analisi TLC, la miscela di reazione è stata diluita con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e neutralizzata impiegando resina Amberlite® IR-120 *hydrogen form*. Dopo filtrazione, lavaggio della resina con MeOH ed eliminazione dei solventi a pressione ridotta è stato ottenuto il desiderato glicocongiugato grezzo che è stato purificato mediante triturazione con Et<sub>2</sub>O o ricristallizzazione dall'opportuno solvente o miscela di solventi.

### 3.10.2 – Preparazione del galattoconiugato anomeroico **33a**

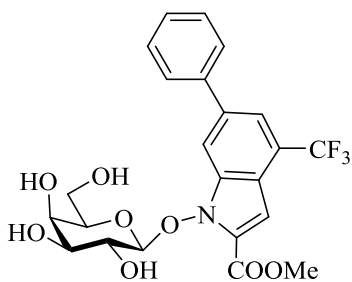
La reazione di desacetilazione è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 36.6 mg (0.055 mmoli, 1.0 eq) di **58a**, 2.5 mL di una miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 2:3 e 32 µL di una soluzione 0.33 M di MeONa in MeOH (0.011 mmoli di MeONa, 0.19 eq). Dopo 2 ore, l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) ha mostrato la scomparsa del substrato di partenza (R<sub>f</sub> 0.83) e la formazione di un unico prodotto avente R<sub>f</sub> 0.54. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, è stato ottenuto un grezzo (25.7 mg, resa 93%) che, dopo triturazione con Et<sub>2</sub>O, ha permesso di isolare il prodotto **33a**, (13.5 mg, resa 49%) puro all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.



Il prodotto **33a** è un solido giallo ocra avente R<sub>f</sub> 0.54 (AcOEt-MeOH 9:1); p.f. 156-162°C. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD-CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.41 (m, 1H, Ar-H), 7.86-7.62 (m, 3H, Ar-H), 7.48-7.33 (m, 3H, Ar-H), 7.27 (bs, 1H, Ar-H), 5.37 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> 3.9 Hz, H-1), 4.51 (m, 1H, H-5), 4.15 (m, 1H, H-4), 4.08 (dd, 1H, J<sub>2,3</sub> 10.6 Hz, H-2), 4.00 (dd, 1H, J<sub>3,4</sub> 2.8 Hz, H-3), 3.95 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.91 (bs, 1H, OH), 3.80-3.65 (m, 4H, H-6a, H-6b, 2 × OH), 3.36 (bs, 1H, OH). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD-CDCl<sub>3</sub>) δ: 161.5 (C=O), 140.6, 139.6, 137.5, 131.9 (4 × Ar-C), 129.7, 128.7, 128.0 (Ph-CH), 125.2-123.0 (CF<sub>3</sub> + Ar-C), 119.8 (Ar-CH), 118.1 (Ar-C), 113.4 (Ar-CH), 109.4 (C-1), 106.4 (Ar-CH), 75.1 (C-5), 70.4 (C-2), 69.9 (C-3), 69.3 (C-4), 61.9 (C-6), 52.8 (OCH<sub>3</sub>).

### 3.10.3 – Preparazione del galattoconiugato anomeroico 33β

La reazione di desacetilazione è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 59.5 mg (0.089 mmoli, 1.0 eq) di **58β**, 4.1 mL di una miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 2:3 e 51 μL di una soluzione 0.33 M di MeONa in MeOH (0.017 mmoli di MeONa, 0.19 eq). Dopo 2 ore, l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) ha mostrato la scomparsa del substrato di partenza (*R<sub>f</sub>* 0.83) e la formazione di un unico prodotto avente *R<sub>f</sub>* 0.52. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, è stato ottenuto un grezzo (42.8 mg, resa 97%) che, dopo triturazione con Et<sub>2</sub>O, ha permesso di isolare il prodotto **33β** (29.5 mg, resa 66%) puro all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.

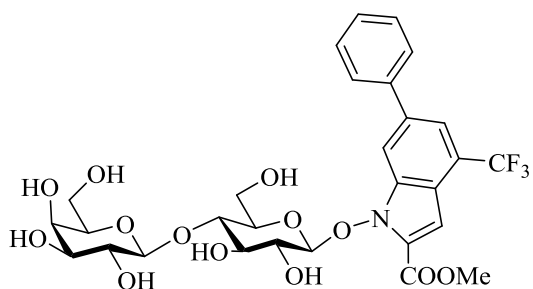


Il prodotto **33β** è un solido bianco avente *R<sub>f</sub>* 0.53 (AcOEt-MeOH 9:1); p.f. 204-210°C. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD-CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.24 (bs, 1H, Ar-H), 7.71 (m, 1H, Ar-H), 7.68-7.73 (2m, each 1H, Ar-H), 7.48-7.39 (m, 2H, Ar-H), 7.38-7.32 (m, 1H, Ar-H), 7.27 (qd, 1H, Ar-H), 5.09 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 8.1 Hz, H-1), 3.95 (m, 1H, H-2), 3.94 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.81 (dd, 1H, *J*<sub>5,6b</sub> 6.9 Hz, *J*<sub>6a,6b</sub> 11.0 Hz, H-6b), 3.67 (dd, 1H, *J*<sub>5,6a</sub> 5.5 Hz, H-6a), 3.62 (dd, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 9.4 Hz, *J*<sub>3,4</sub> 3.4 Hz, H-3), 3.60 (m, 1H, H-4), 3.49 (ddd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 0.8 Hz, H-5). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD-CDCl<sub>3</sub>) δ: 161.8 (C=O), 140.5, 139.5, 137.4, 132.1 (4 × Ar-C), 129.6, 128.9, 128.4 (Ph-CH), 125.4-123.6 (CF<sub>3</sub> + Ar-C), 119.7 (Ar-CH), 118.3 (Ar-C), 113.6 (Ar-CH), 110.3 (C-1), 106.8 (Ar-CH), 76.7 (C-5), 74.3 (C-3), 72.3 (C-2), 69.9 (C-4), 62.2 (C-6), 53.4 (OCH<sub>3</sub>).

### 3.10.4 – Preparazione del glicoconiugato anomeroico disaccaridico 34β

La reazione di desacetilazione è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 52.6 mg (0.055 mmoli, 1.0 eq) di **59β**, 2.5 mL di una miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 2:3 e 32 μL di una soluzione 0.33 M di MeONa in MeOH (0.011 mmoli di MeONa, 0.19 eq). Dopo 7 ore, poiché l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) mostrava ancora la presenza del substrato di partenza (*R<sub>f</sub>* 0.95) e la presenza di vari prodotti di parziale desacetilazione,

sono stati aggiunti 20  $\mu\text{L}$  di soluzione 0.33 M di MeONa in MeOH (0.007 mmoli di MeONa, 0.12 eq). Dopo 1 ora dall'ultima aggiunta, l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) ha mostrato la completa conversione del substrato di partenza ( $R_f$  0.83) in un unico prodotto avente  $R_f$  0.10. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, è stato ottenuto un grezzo (35.6 mg, resa 98%) che, dopo triturazione con Et<sub>2</sub>O, ha permesso di isolare il prodotto **59 $\beta$**  (26.7 mg, resa 74%) puro all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.

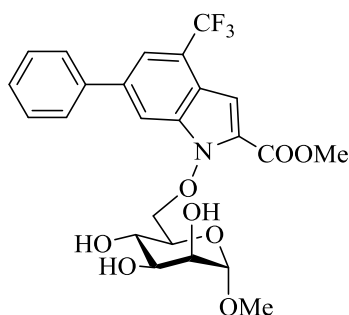


Il prodotto **59 $\beta$**  è un solido bianco avente  $R_f$  0.10 (AcOEt-MeOH 9:1); p.f. 197-202°C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.27 (m, 1H, Ar-H), 7.83-7.80 (m, 3H, Ar-H), 7.55-7.49 (m, 3H, Ar-H), 7.10 (bs, 1H, Ar-H), 5.78 (bd, 1H, *J* 5.0 Hz, OH), 5.14-5.01 (m, 2H, 2  $\times$  OH), 4.87-4.78 (m, 2H, H-1, OH), 4.69-4.61 (m, 2H, 2  $\times$  OH), 4.56-4.43 (m, 2H, H-1', OH), 4.31-4.16 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5'), 3.88 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.46-3.22 (m, 9H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-2', H-3', H-4', H-6'a, H-6'b). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 159.7 (C=O), 139.1, 139.0, 137.6, 130.0 (4  $\times$  Ar-C), 129.2, 128.2, 127.3 (Ph-CH), 124.0-121.8 (CF<sub>3</sub> + Ar-C), 118.8 (Ar-CH), 116.7 (Ar-C), 113.5, 112.8 (2  $\times$  Ar-CH), 107.7 (C-1), 103.7 (C-1'), 79.4 (C-4), 75.6 (C-5'), 74.8, 74.3 (C-5, C-3), 73.3, 73.2 (C-2, C-3'), 72.0 (C-2'), 70.5 (C-4'), 60.4, 60.3 (C-6', C-6), 52.4 (COOCH<sub>3</sub>).

### 3.10.5 – Preparazione del mannoconiugato deprotetto **37**

La reazione di desacetilazione è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 54.1 mg (0.085 mmoli, 1.0 eq) di **110**, 3.9 mL di una miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 2:3 e 49  $\mu\text{L}$  di una soluzione 0.33 M di MeONa in MeOH (0.016 mmoli di MeONa, 0.19 eq). Dopo 3.5 ore, l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) ha evidenziato la scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.81) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.69. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, è stato ottenuto un grezzo (41.8 mg, resa 96%) che, dopo ricristallizzazione

da Et<sub>2</sub>O-*n*-esano, ha permesso di isolare il prodotto **31** (31.9 mg, resa 73%) puro all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.



Il prodotto **37** è un solido giallo pallido avente R<sub>f</sub> 0.69 (AcOEt-MeOH 9:1); p.f. 58-63°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.95 (bs, 1H, Ar-H), 7.67-7.61 (m, 3H, Ar-H), 7.49-7.32 (m, 3H, Ar-H), 7.16 (bs, 1H, Ar-H), 4.81 (bs, 1H, H-1), 4.64 (dd, 1H, J<sub>5,6b</sub> 3.8 Hz, J<sub>6a,6b</sub> 9.4 Hz, H-6b), 4.53 (dd, 1H, J<sub>5,6a</sub> 1.8 Hz, H-6a), 4.19 (dd, 1H, J<sub>3,4</sub> 9.6 Hz, J<sub>4,5</sub> 9.4 Hz, H-4), 4.02 (bs, 1H, H-2), 3.93-3.75 (m, 5H, H-3, H-5, 3 × OH), 3.89 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.35 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>-1). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 161.2 (C=O), 140.6, 139.5, 136.8, 131.9 (4 × Ar-C), 129.7, 128.6, 128.1 (3 × Ph-CH), 124.8-122.7 (CF<sub>3</sub> + Ar-C), 120.1 (Ar-CH), 117.2 (Ar-C), 112.0, 106.4 (2 × Ar-CH), 101.9 (C-1), 78.1 (C-6), 72.1 (C-3), 71.2 (C-2), 71.0 (C-5), 67.5 (C-4), 55.9 (OCH<sub>3</sub>-1), 51.3 (COOCH<sub>3</sub>).

### 3.10.6 – Preparazione del glucoconiugato deprotetto **38**

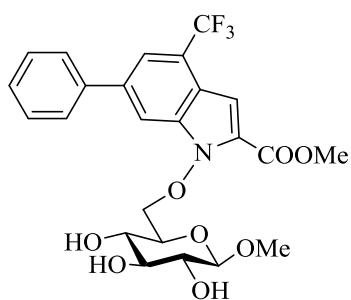
**Prova 1** (a partire da **103** e **25** con MeONa in DMF-MeOH) - In un pallone da 10 mL e sotto ambiente inerte (Ar), sono stati solubilizzati 48.1 mg (0.14 mmoli, 1.0 eq) di derivato indolico **25** in 0.65 mL di una soluzione anidra 0.33 M di MeONa in DMF-MeOH 8:2 (0.021 mmoli di MeONa, 1.5 eq) e la soluzione è stata poi mantenuta in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 2 ore è stata gocciolata una soluzione ottenuta disciogliendo 50.0 mg (0.14 mmoli, 1.0 eq) di 6-*O*-tosil derivato **103** in 0.3 mL di DMF anidra e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 21 ore, poiché l'analisi TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 95:5, doppia corsa) mostrava ancora la presenza dei due substrati di partenza, sono stati addizionati 10.0 mg (0.19 mmoli, 1.4 eq) di MeONa solido e dopo 5 ore dall'ultima aggiunta sono stati nuovamente addizionati 10.0 mg (0.19 mmoli, 1.4 eq) di MeONa. Dopo 4 giorni dall'inizio della reazione, l'analisi TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 95:5, doppia corsa) ha mostrato la scomparsa dei due substrati di partenza **103** e **25** (R<sub>f</sub> 0.23 e 0.90 rispettivamente) e la formazione di un prodotto avente R<sub>f</sub> 0.28. La miscela di reazione è stata neutralizzata con resina Amberlite® IRC-50 *hydrogen form* e, dopo filtrazione e lavaggio della resina con MeOH, sono stati eliminati i solventi a pressione ridotta.

Ottenuto il grezzo (45.3 mg), questo è stato purificato mediante TLC preparativa su gel di silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 95:5, doppia corsa). È stato isolato il glucoconiugato **38** (16.9 mg, resa 22%) come solido bianco, puro all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.

**Prova 2 (a partire da 103 e 25 con MeONa in DMF)** - In un pallone da 10 mL e sotto atmosfera inerte (Ar), sono stati solubilizzati 52.9 mg (0.16 mmoli, 1.1 eq) di derivato indolico **25** in 0.8 mL di DMF anidra, sono stati addizionati 42.6 mg (0.79 mmoli, 5.5 eq) di MeONa solido e la miscela è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 1 ora è stata addizionata una soluzione ottenuta disciogliendo 50.0 mg (0.14 mmoli, 1.0 eq) di 6-*O*-tosil derivato **103** in 0.7 mL di DMF anidra e successivamente la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 23 ore, poiché l'analisi TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 95:5, doppia corsa) mostrava ancora la presenza dei due substrati di partenza, la miscela di reazione è stata scaldata a 40°C e, dopo 2 ore, sono stati addizionati 7.80 mg (0.14 mmoli, 1.0 eq) di MeONa solido. Dopo 4.5 ore dall'ultima aggiunta, la miscela di reazione è stata neutralizzata con resina Amberlite® IRC-50 *hydrogen form*, filtrata ed il solvente eliminato a pressione ridotta. Il grezzo (45.2 mg) è stato purificato mediante *flash*-cromatografia (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Me<sub>2</sub>CO 6:4) e l'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR delle varie frazioni ha permesso di escludere la presenza del desiderato glicoconiugato **38**.

**Prova 3 (per desacetilazione di 111)** - La reazione di desacetilazione è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 51.8 mg (0.081 mmoli, 1.0 eq) di **111**, 3.7 mL di una miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 2:3 e 47 µL di una soluzione 0.33 M di MeONa in MeOH (0.016 mmoli di MeONa, 0.19 eq). Dopo 3.5 ore, l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) ha mostrato la scomparsa del substrato di partenza (R<sub>f</sub> 0.94) e la formazione di un unico prodotto avente R<sub>f</sub> 0.53. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, è stato ottenuto un grezzo (40.1 mg, resa 97%) che, dopo triturazione con Et<sub>2</sub>O, ha permesso di isolare il prodotto **38** (17.7 mg, resa 43%) puro all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.



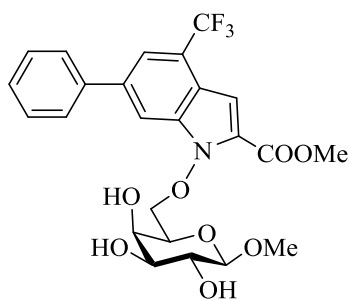


Il prodotto **38** è un solido bianco avente  $R_f$  0.53 (AcOEt-MeOH 9:1); p.f. 211-216°C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 8.10 (m, 1H, Ar-H), 7.70-7.62 (m, 3H, Ar-H), 7.50-7.38 (m, 3H, Ar-H), 7.15 (qd, 1H, Ar-H), 4.79 (dd, 1H,  $J_{5,6b}$  1.6 Hz,  $J_{6a,6b}$  10.5 Hz, H-6b), 4.58 (dd, 1H,  $J_{5,6a}$  6.3 Hz, H-6a), 4.18 (d, 1H,  $J_{1,2}$  7.7 Hz, H-1), 3.95 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.70 (ddd, 1H,  $J_{4,5}$  9.8 Hz, H-5), 3.41-3.30 (m, 2H, H-3, H-4), 3.36 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ -1), 3.24 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  9.4 Hz, H-2).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 161.2 (C=O), 141.0, 140.1, 137.8, 131.8 (4  $\times$  Ar-C), 130.1, 129.1, 128.4 (Ph-CH), 124.9-123.2 ( $\text{CF}_3$  + Ar-C), 119.9 (Ar-CH), 117.8 (Ar-C), 112.7 (Ar-CH), 105.8 (C-1), 105.4 (Ar-CH), 80.1 (C-6), 77.8, 71.3 (C-3, C-4), 75.5 (C-5), 74.9 (C-2), 57.5 ( $\text{OCH}_3$ -1), 52.7 ( $\text{COOCH}_3$ ).

### 3.10.7 – Preparazione del galattoconiugato deprotetto **39**

**Prova 1** (a partire da **105** e **25** con MeONa in DMF) - In una provetta in vetro Pyrex da 10 mL e sotto ambiente inerte (Ar), sono stati solubilizzati 52.9 mg (0.16 mmoli, 1.1 eq) di derivato indolico **25** in 0.8 mL di DMF anidra, sono stati addizionati 42.6 mg (0.79 mmoli, 5.5 eq) di MeONa solido e la miscela è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 1 ora è stata addizionata una soluzione ottenuta disciogliendo 50.0 mg (0.14 mmoli, 1.0 eq) di 6-*O*-tosil derivato **105** in 0.7 mL di DMF anidra e successivamente la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 4 giorni, l'analisi TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 95:5, doppia corsa) ha mostrato la scomparsa dei due substrati di partenza **105** e **25** ( $R_f$  0.42 e 0.90 rispettivamente) e la formazione di un prodotto avente  $R_f$  0.31. Eliminato il solvente a pressione ridotta, il residuo è stato ripartito fra AcOEt (20.0 mL) e una soluzione satura di NaCl (20.0 mL) e, separate le fasi, la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con AcOEt (2  $\times$  15.0 mL). Le fasi organiche riunite, anidificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate e concentrate a pressione ridotta hanno fornito un grezzo (45.0 mg) che è stato purificato mediante *flash*-cromatografia eluendo prima con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 9:1 poi con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 8:2. È stato isolato il derivato **39** (26.3 mg, resa 36%) puro all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.

**Prova 2 (per desacetilazione di 112)** – La reazione di desacetilazione è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 68.3 mg (0.11 mmoli, 1.0 eq) di **112**, 4.9 mL di una miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 2:3 e 62 µL di una soluzione 0.33 M di MeONa in MeOH (0.02 mmoli di MeONa, 0.19 eq). Trascorse 3 ore, l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) ha mostrato la scomparsa del substrato di partenza (R<sub>f</sub> 0.80) e la formazione di un unico prodotto avente R<sub>f</sub> 0.60. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, è stato ottenuto un grezzo (51.6 mg, resa 92%) che, dopo triturazione con Et<sub>2</sub>O, ha permesso di isolare il prodotto **39** (41.4 mg, resa 76%) puro all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.



Il prodotto **39** è un solido bianco avente R<sub>f</sub> 0.60 (AcOEt-MeOH 9:1); p.f. 190-204°C. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD-CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.99 (m, 1H, Ar-H), 7.68-7.62 (m, 3H, Ar-H), 7.47-7.32 (m, 3H, Ar-H), 7.24 (m, 1H, Ar-H), 4.74 (dd, 1H, J<sub>5,6b</sub> 3.7 Hz, J<sub>6a,6b</sub> 9.5 Hz, H-6b), 4.59 (dd, 1H, J<sub>5,6a</sub> 7.2 Hz, H-6a), 4.15 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> 7.6 Hz, H-1), 4.01 (m, 1H, H-5), 3.96 (m, 1H, H-3), 3.93 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.53 (m, 2H, H-2,H-4), 3.44 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>-1); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD-CDCl<sub>3</sub>) δ: 160.6 (C=O), 140.3, 139.4, 139.3, 131.7 (4 × Ar-C), 129.2, 128.3, 127.7 (Ph-CH), 124.7-123.3 (CF<sub>3</sub> + Ar-C), 119.6 (Ar-CH), 117.2 (Ar-C), 111.6, 105.8 (2 × Ar-CH), 104.5 (C-1), 79.0 (C-6), 73.5 (C-2), 72.5 (C-5), 71.3 (C-4), 69.5 (C-3), 57.2 (OCH<sub>3</sub>-1), 52.3 (COOCH<sub>3</sub>).

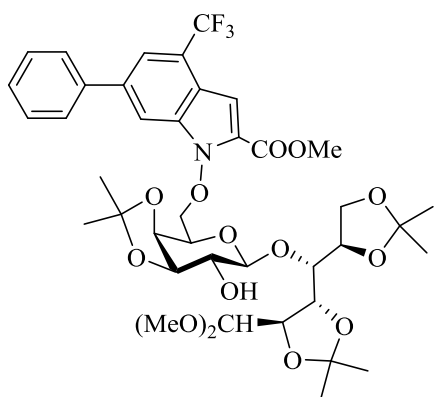
### 3.10.8 – Preparazione del glicocongiugato disaccaridico protetto 109

**Prova 1 (con MeONa in DMF)** - In una provetta in vetro Pyrex da 10 mL e sotto ambiente inerte (Ar), sono stati solubilizzati 50.0 mg (0.15 mmoli, 1.1 eq) di derivato indolico **23** in DMF anidra (0.8 mL), sono stati addizionati 40.3 mg (0.75 mmoli, 5.5 eq) di MeONa solido e la soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 1 ora è stata addizionata una soluzione preparata disciogliendo 89.8 mg (0.14 mmoli, 1.0 eq) di 6'-O-tosil derivato **107** in 0.7 mL di DMF anidra e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a 45°C. Dopo 23 ore, poiché l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 1:1) evidenziava ancora la presenza del substrato saccaridico di

partenza ( $R_f$  0.32) e del derivato indolico **25** ( $R_f$  0.55), sono stati addizionati 14.6 mg (0.28 mmoli, 2 eq) di MeONa solido. Dopo 8 giorni, la miscela di reazione è stata neutralizzata con resina Amberlite<sup>®</sup> IRC-50 *hydrogen form* e, dopo filtrazione, lavaggio della resina con MeOH ed eliminazione del solvente a pressione ridotta, è stato ottenuto un grezzo (98.0 mg) che all'analisi  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR è risultato costituito principalmente dai precursori **25** e **107**.

**Prova 2 (con NaH in DMF)** - In un pallone da 10 mL e sotto ambiente inerte (Ar), sono stati solubilizzati 20.0 mg (0.06 mmoli, 1.1 eq) di derivato indolico **25** in 0.6 mL di DMF anidra, sono stati addizionati 6.00 mg di NaH al 60% in olio minerale (3.60 mg di NaH, 0.15 mmoli, 2.5 eq) e la soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 30 minuti, sono stati aggiunti 35.9 mg (0.054 mmoli, 1.0 eq) di 6'-*O*-tosil derivato **107** e la sospensione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente. Dopo 4 ore, poiché l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 1:1) evidenziava la presenza del substrato saccaridico ( $R_f$  0.32) e del derivato indolico **25** ( $R_f$  0.55), sono stati addizionati 20.0 mg (0.054 mmoli, 1.0 eq) di tetrabuttilammonio ioduro (TBAI) e, dopo 17 ore dall'ultima aggiunta, la miscela è stata scaldata a 50°C. Dopo 10 giorni dall'inizio della reazione, alla miscela è stato addizionato MeOH (1.0 mL) per distruggere l'eccesso di NaH ed il sistema è stato lasciato in agitazione per 20 minuti. La soluzione è stata neutralizzata con resina Amberlite<sup>®</sup> IRC-50 *hydrogen form* e, dopo filtrazione, lavaggio della resina con MeOH ed eliminazione del solvente a pressione ridotta, è stato ottenuto un grezzo che è stato ripartito tra Et<sub>2</sub>O (15.0 mL) ed acqua (15.0 mL). Dopo separazione delle fasi, la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con Et<sub>2</sub>O (2 × 15.0 mL) e le fasi organiche riunite, anidificate su MgSO<sub>4</sub>, filtrate e concentrate a pressione ridotta, hanno fornito un grezzo (45.9 mg) che all'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 1:1) si è presentato come una complessa miscela di prodotti difficilmente separabili. Un tentativo di separazione dei prodotti mediante TLC preparativa (*n*-esano-AcOEt 1:1, doppia corsa) su gel di silice ha fornito varie frazioni che analizzate mediante spettroscopia NMR hanno permesso di escludere la presenza del desiderato glicoconjugato **109**.

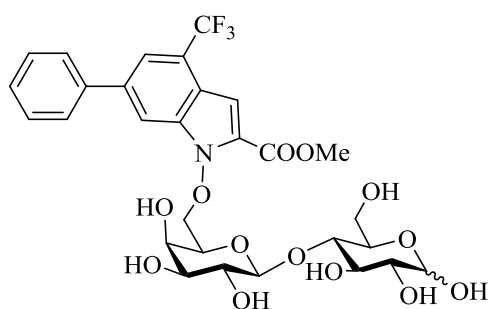
**Prova 3 (per desacetilazione di 113)** - La reazione di desacetilazione è stata effettuata secondo quanto descritto nella procedura generale, conducendo la reazione a temperatura ambiente ed utilizzando 75.4 mg (0.087 mmoli, 1.0 eq) di disaccaride **113**, 4.0 mL di una miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 2:3 e 50 µL di una soluzione 0.33 M di MeONa in MeOH (0.017 mmoli di MeONa, 0.19 eq). Dopo 8 ore, l'analisi TLC (*n*-esano-AcOEt 1:1) ha mostrato la scomparsa del substrato di partenza (R<sub>f</sub> 0.63) e la formazione di un unico prodotto avente R<sub>f</sub> 0.43. Dopo trattamento della miscela di reazione secondo quanto descritto nella procedura generale, è stato ottenuto un grezzo (67.0 mg, resa 93%) che all'analisi <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR è risultato costituito esclusivamente dal glicocongiugato **109**



Il prodotto **109** è un solido bianco avente R<sub>f</sub> 0.43 (*n*-esano-AcOEt 1:1); p.f. 69-73°C (sul cromatografato). <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN) δ: 8.03 (m, 1H, Ar-H), 7.79 (bs, 1H, Ar-H), 7.76-7.71 (m, 2H, Ar-H), 7.54-7.39 (m, 3H, Ar-H), 7.23 (qd, 1H, *J* 1.0 Hz, *J* 1.7 Hz, Ar-H), 4.70 (dd, 1H, *J*<sub>5',6'b</sub> 6.9 Hz, *J*<sub>6'a,6'b</sub> 9.4 Hz, H-6'b), 4.63 (dd, 1H, *J*<sub>5',6'a</sub> 5.0 Hz, H-6'a), 4.51 (d, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> 8.1 Hz, H-1'), 4.46 (dd, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 5.9 Hz, *J*<sub>2,3</sub> 7.2 Hz, H-2), 4.30 (dd, 1H, *J*<sub>4',5'</sub> 2.2 Hz, H-5'), 4.29 (d, 1H, H-1), 4.23 (dd, 1H, *J*<sub>3',4'</sub> 5.5 Hz, H-4'), 4.15 (m, 1H, H-5), 4.14-4.00 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-3'), 4.03 (dd, 1H, *J*<sub>3,4</sub> 1.6 Hz, H-3), 3.94 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.88 (dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 4.0 Hz, H-4), 3.55 (bs, 1H, OH-2), 3.43 (m, 1H, H-2'), 3.27, 3.20 (2s, each 3H, 2 × OCH<sub>3</sub>-1), 1.46, 1.37, 1.33, 1.29, 1.27, 1.26 [6s, each 3H, 3 × (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C]. <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN) δ: 160.4 (COOCH<sub>3</sub>), 140.7, 139.8, 137.5, 131.4 (4 × Ar-C), 130.0, 129.1, 128.6 (Ph-CH), 124.7-123.3 (CF<sub>3</sub> + Ar-C), 120.3 (Ar-CH), 117.5 (Ar-C), 112.6 (Ar-CH), 110.7, 110.5, 109.0 [3 × (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C], 106.2 (C-1), 105.5 (Ar-CH), 104.4 (C-1'), 80.0 (C-3), 78.6 (C-6'), 78.5 (C-3'), 78.3 (C-4), 77.8 (C-5), 74.5 (C-4'), 74.4 (C-2'), 72.6 (C-2), 71.0 (C-5'), 65.9 (C-6), 56.3, 54.2 (2 × OCH<sub>3</sub>-1), 52.9 (COOCH<sub>3</sub>), 28.4, 27.5, 27.0, 26.5, 26.3, 25.0 [3 × (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C].

### 3.10.9 – Preparazione del glicocongiugato disaccaridico deprotetto **40**

In un pallone da 25 mL, munito di refrigerante a bolle e tappo a  $\text{CaCl}_2$ , 59.4 mg (0.072 mmoli, 1.0 eq) di **109** sono stati solubilizzati in 1.3 mL di AcOH acquoso all'80% e la soluzione è stata lasciata in agitazione a  $80^\circ\text{C}$ . Dopo 4 ore, l'analisi TLC (AcOEt-MeOH 9:1) ha mostrato la scomparsa del substrato di partenza ( $R_f$  0.98) e la formazione di un unico prodotto avente  $R_f$  0.10. Concentrata la soluzione coevaporando con toluene ( $4 \times 25.0$  mL) a pressione ridotta, il grezzo ottenuto (45.2 mg, resa 95%) è stato successivamente triturato con  $\text{Et}_2\text{O}$  per dare il glicocongiugato disaccaridico **40** (22.6 mg, resa 48%) che all'analisi  $^{13}\text{C}$  NMR si è presentato come una miscela di anomeri **40 $\alpha$**  e **40 $\beta$**  in rapporto 9:1, calcolato sulla base delle altezze relative ai segnali C-1 a  $\delta$  92.1 e 97.0 rispettivamente. Gli spettri hanno consentito di attribuire completamente i segnali dell'anomero **40 $\alpha$** , mentre per l'anomero **40 $\beta$**  è stato possibile assegnare solo i segnali presenti nello spettro  $^{13}\text{C}$  NMR.



La miscela di anomeri **40 $\alpha$**  e **40 $\beta$**  è un solido bianco avente  $R_f$  0.10 (AcOEt-MeOH 9:1); p.f.  $139\text{-}157^\circ\text{C}$ .  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) **anomero  $\alpha$** : 8.15 (m, 1H, Ar-H), 7.92-7.83 (m, 3H, Ar-H), 7.57-7.41 (m, 3H, Ar-H), 7.15 (m, 1H, Ar-H), 6.40 (d, 1H,  $J_{1,\text{OH}}$  4.6 Hz, OH-1), 5.23 (d, 1H,  $J$  7.2 Hz, OH), 4.92 (m, 2H,  $2 \times$  OH), 4.83 (d, 1H,  $J_{1,2}$  5.1 Hz, H-1), 4.72-4.67 (m, 2H,  $2 \times$  OH), 4.58-4.47 (m, 3H, H-6'a, H-6'b, OH), 4.34 (d, 1H,  $J_{1',2'}$  7.2 Hz, H-1'), 4.12 (bt, 1H, H-5'), 3.91 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.78-3.48 (m, 5H, H-2, H-3, H-6a, H-6b, H-3'), 3.40-3.20 (m, 4H, H-4, H-5, H-4', H-2').  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) **anomero  $\alpha$** : 159.0 (C=O), 138.8, 138.2, 135.8, 129.2 ( $4 \times$  Ar-C), 129.3, 128.1, 127.6 (Ph-CH), 123.5-122.3 ( $\text{CF}_3$  + Ar-C), 118.8 (Ar-CH), 115.9 (Ar-C), 111.8, 104.1 ( $2 \times$  Ar-CH), 104.0 (C-1'), 92.1 (C-1), 82.2 (C-4), 79.4 (C-6'), 72.7 (C-2'), 72.3 (C-5'), 72.0 (C-5), 71.7 (C-3), 70.3 (C-4'), 69.8 (C-2), 68.9 (C-3'), 60.7 (C-6), 52.4 ( $\text{COOCH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) **anomero  $\beta$** : 159.0 (C=O), 138.8, 138.4, 136.3, 129.2 ( $4 \times$  Ar-C), 127.6, 127.1, 127.0 (Ph-CH), 123.5-122.3 ( $\text{CF}_3$  + Ar-C), 117.5 (Ar-CH), 114.5 (Ar-C), 111.8, 104.1 ( $2 \times$  Ar-CH), 104.0 (C-1'), 97.0 (C-1), 81.8 (C-4),

79.4 (C-6'), 74.8 (C-3, C-5), 72.7, 72.6, 72.3 (C-2', C-5', C-2), 70.3 (C-4'), 68.9 (C-3'),  
59.5 (C-6), 52.2 (COOCH<sub>3</sub>).

## Bibliografia

- <sup>1</sup> Nelson, D. L.; Cox, M. M. in “*I principi di biochimica di Lehninger*” 5° Ed. italiana, **2010**, Zanichelli, p. 531 e p. 618.
- <sup>2</sup> Granchi, C.; Roy, S.; Giacomelli, C.; Macchia, M.; Tuccinardi, T.; Martinelli, A.; Lanza, M.; Betti, L.; Giannaccini, G.; Lucacchini, A.; Funel, N.; Léon, L. G.; Giovannetti, E.; Peters, G. J.; Palchauri, R.; Calvaresi, E. C.; Hergenrother, P. J.; Minutolo, F. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1599-1612.
- <sup>3</sup> Warburg, O. *Science* **1956**, *123*, 309-314.
- <sup>4</sup> Fantin, V. R.; St-Pierre, J.; Leader, P. *Cancer Cell* **2006**, *9*, 425-434.
- <sup>5</sup> Granchi, C.; Paterni, I.; Rani, R.; Minutolo, F. *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 1967-1991.
- <sup>6</sup> Kim, J. W.; Gao, P.; Dang, C. V. *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 291-298.
- <sup>7</sup> Kroemer, G.; Pouyssegur, J. *Cancer Cell* **2008**, *13*, 472-482.
- <sup>8</sup> Granchi, C.; Bertini, S.; Macchia, M.; Minutolo, F. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 672-697.
- <sup>9</sup> Kopperschläger, G.; Kirchberger, J. *J. Chromatogr. B* **1996**, *684*, 25-49.
- <sup>10</sup> Granchi, C.; Minutolo, F. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1318-1350.
- <sup>11</sup> Dhup, S.; Dadhich, R. K.; Porporato, P. E.; Sonveaux, P. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 1319-1330.
- <sup>12</sup> Feron, O. *Radiother. Oncol.* **2009**, *92*, 329-333.
- <sup>13</sup> PDB: *Protein Data Bank*.
- <sup>14</sup> doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00168.
- <sup>15</sup> Choi, S. R.; Beeler, A. B.; Pradhan, A.; Blake Watkins, E.; Rimoldi, J. M.; Tekwani, B.; Avery, M. A. *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 292-300.
- <sup>16</sup> Thornburg, J. M.; Nelson, K. K.; Clem, B. F.; Lane, A. N.; Arumugam, S.; Simmons, A.; Eaton, J. W.; Telang, S.; Chesney, J. *Breast Cancer Res.* **2008**, *10*, R84.
- <sup>17</sup> Vander Jagt, D. L.; Deck, L. M.; Royer, R. E. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 479-498.
- <sup>18</sup> Deck, L. M.; Royer, R. E.; Chamblee, B. B.; Hernandez, V. M.; Malone, R. R.; Torres, J. E.; Hunsaker, L. A.; Piper, R. C.; Makler, M. T.; Vander Jagt, D. L. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3879-3887.
- <sup>19</sup> Cameron, A.; Read, J.; Tranter, R.; Winter, V. J.; Sessions, R. B.; Leo Brady, R.; Vivas, L.; Easton, A.; Kendrick, H.; Croft, S. L.; Barros, D.; Lavandera, J. L.; Martin,

- J. J.; Risco, F.; García-Ochoa, S.; Gamo, F. J.; Sanz, L.; Leon, L.; Ruiz, J. R.; Gabarró, R.; Mallo, A.; Gómez de las Heras, F. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 31429-31439.
- <sup>20</sup> Ward, R. A.; Brassington, C.; Breeze, A. L.; Caputo, A.; Critchlow, S.; Davies, G.; Goodwin, L.; Hassall, G.; Greenwood, R.; Holdgate, G. A.; Mrosek, M.; Norman, R. A.; Pearson, S.; Tart, J.; Tucker, J. A.; Vogtherr, M.; Whittaker, D.; Wingfield, J.; Winter, J.; Hudson, K. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3285-3306.
- <sup>21</sup> GlaxoSmithKline Llc: WO 061557 (**2012**).
- <sup>22</sup> Manerba, M.; Vettraino, M.; Fiume, L.; Di Stefano, G.; Sartini, A.; Giacomini, E.; Buonfiglio, R.; Roberti, M.; Recanatini, M. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 311-317.
- <sup>23</sup> Kotlyar, A. B.; Randazzo, A.; Honbo, N.; Jin, Z. Q.; Karliner, J. S.; Cecchini, G. *FEBS Letters* **2010**, *584*, 159-165.
- <sup>24</sup> Moorhouse, A. D.; Spiteri, C.; Sharma, P.; Zloh, M.; Moses, J. E. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 230-232.
- <sup>25</sup> Kohlmann, A.; Zech, S. G.; Li, F.; Zhou, T.; Squillace, R. M.; Commodore, L.; Greenfield, M. T.; Lu, X.; Miller, D. P.; Huang, W. S.; Qi, J.; Thomas, R. M.; Wang, Y.; Zhang, S.; Dodd, R.; Liu, S.; Xu, R., Xu, Y.; Miret, J. J.; Rivera, V.; Clackson, T.; Shakespeare, W. C.; Zhu, X.; Dalgarno, D. C. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1023-1040.
- <sup>26</sup> Dragovich, P. S.; Fauber, B. P.; Corson, L. B.; Ding, C. Z.; Eigenbrot, C.; Ge, H.; Giannetti, A. M.; Hunsaker, T.; Labadie, S.; Liu, Y.; Malek, S.; Pan, B.; Peterson, D.; Pitts, K.; Purkey, H. E.; Sideris, S.; Ultsch, M.; VanderPorten, E.; Wei, B.; Xu, Q.; Yen, I.; Yue, Q.; Zhang, H.; Zhang, X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3186-3194.
- <sup>27</sup> Fauber, B. P.; Dragovich, P. S.; Chen, J.; Corson, L. B.; Ding, C. Z.; Eigenbrot, C.; Giannetti, A. M.; Hunsaker, T.; Labadie, S.; Liu, Yichin; Liu, Yingchun; Malek, S.; Peterson, D.; Pitts, K.; Sideris, S.; Ultsch, M.; VanderPorten, E.; Wang, J.; Wei, B.; Yen, I.; Yue, Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5533-5539.
- <sup>28</sup> Fauber, B. P.; Dragovich, P. S.; Chen, J.; Corson, L. B.; Ding, C. Z.; Eigenbrot, C.; Labadie, S.; Malek, S.; Peterson, D.; Purkey, H. E.; Robarge, K.; Sideris, S.; Ultsch, M.; Wei, B.; Yen, I.; Yue, Q.; Zhou, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5683-5687.
- <sup>29</sup> Università di Pisa: WO 092753 (**2013**).
- <sup>30</sup> Granchi, C.; Roy, S.; De Simone, A.; Salvetti, I.; Tuccinardi, T.; Martinelli, A.; Macchia, M.; Lanza, M.; Betti, L.; Giannaccini, G.; Lucacchini, A.; Giovannetti, E.; Sciarrillo, R.; Peters, G. J.; Minutolo, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5398-5407.
- <sup>31</sup> Granchi, C.; Roy, S.; Mottinelli, M.; Nardini, E.; Campinoti, F.; Tuccinardi, T.; Lanza, M.; Betti, L.; Giannaccini, G.; Lucacchini, A.; Martinelli, A.; Macchia, M.; Minutolo, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 7331-7336.
- <sup>32</sup> Granchi, C.; Calvaresi, E. C.; Tuccinardi, T.; Paterni, I.; Macchia, M.; Martinelli, A.; Hergenrother, P. J.; Minutolo, F. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6588-6596.
- <sup>33</sup> Calvaresi, E. C.; Hergenrother, P. J. *Chemical Science* **2013**, *4*, 2319-2333.



- <sup>34</sup> Granchi, C.; Fancelli, D.; Minutolo, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4915-4925.
- <sup>35</sup> Calvaresi, E. C.; Granchi, C.; Tuccinardi, T.; Di Bussolo, V.; Huigens, R. W.; Yeon Lee, H.; Palchaudhuri, R.; Macchia, M.; Martinelli, A.; Minutolo, F.; Hergenrother, P. *J. ChemBioChem* **2013**, *14*, 2263-2267.
- <sup>36</sup> Di Bussolo, V.; Calvaresi, E. C.; Granchi, C.; Del Bino, L.; Frau, I.; Dasso Lang, M. C.; Tuccinardi, T.; Macchia, M.; Martinelli, A.; Hergenrother, P. J.; Minutolo, F. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 19944-19954.
- <sup>37</sup> Hume, E. W.; Tokunaga, T.; Nagata, R. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3605-3611.
- <sup>38</sup> Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483.
- <sup>39</sup> Entwistle, I. D.; Gilkerson, T.; Johnstone, A. W. R.; Telford, R. P. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 213-215.
- <sup>40</sup> Nicolaou, K. C.; Estrada, A. A.; Freestone, G. C.; Lee, S. H., Alvarez-Mico, X. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6088-6114.
- <sup>41</sup> Granchi, C. *PhD Thesis* **2011**, Università di Pisa.
- <sup>42</sup> Fügedi, P. in “*The Organic Chemistry of Sugars*” 1°Ed., Ed. Levi, D. E.; Fügedi, P. **2005**, Taylor & Francis Group, p. 89.
- <sup>43</sup> Toshima, K.; Tatsuta, K. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1503-1531.
- <sup>44</sup> Green, L. G.; Ley, S. V. in “*Carbohydrate in Chemistry and Biology*” Ed. Ernst, B.; Hart, G. W.; Sinaÿ, P. 1°Ed., **2000**, Wiley-VCH, p. 427.
- <sup>45</sup> Nigudkar, S. S.; Demchenko, A. V. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2687-2704.
- <sup>46</sup> Demchenko, A. V. in “*Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*” 1°Ed., **2008**, Wiley-VCH, p.5 e p.10.
- <sup>47</sup> Lemieux, R. U.; Hendriks, K. B.; Stick, R. V.; James, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4056-4062.
- <sup>48</sup> Satoh, H.; Hansen, H. S.; Manabe, S.; van Gunsteren, W. F.; Hünenberger, P. H. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 1783-1797.
- <sup>49</sup> Vankar, Y. D.; Vankar, P. S.; Behrendt, M.; Schmidt, R. R. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 9985-9992.
- <sup>50</sup> Chao, C. S.; Lin, C. Y.; Mulani, S.; Hung, W. C.; Mong, K. K. T. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12193-12202.
- <sup>51</sup> Yang, Y.; Zhang, X.; Yu, B. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 1331-1355.
- <sup>52</sup> Koenigs, W.; Knorr, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957-981.
- <sup>53</sup> Oscarson, S. in “*Carbohydrate in Chemistry and Biology*” Ed. Ernst, B.; Hart, G. W.; Sinaÿ, P. 1°Ed., **2000**, Wiley-VCH, p. 93.
- <sup>54</sup> Pougny, J. R.; Sinaÿ, P. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *45*, 4073-4076.

- <sup>55</sup> Schmidt, R. R.; Michel, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 731-732.
- <sup>56</sup> Schmidt, R. R.; Jung, K. H. in "Carbohydrate in Chemistry and Biology" Ed. Ernst, B.; Hart, G. W.; Sinaÿ, P. 1<sup>o</sup>Ed.; **2000**, Wiley-VCH, p. 5.
- <sup>57</sup> Schmidt, R. R.; Michel, J. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 821-824.
- <sup>58</sup> Ella-Menye, J. R.; Nie, X.; Wang, G. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1743-1753.
- <sup>59</sup> Liu, Z.; Byun, H. S.; Bittman, R. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2974-2977.
- <sup>60</sup> Pilgrim, W.; Murphy, P. V. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6747-6755.
- <sup>61</sup> Andersen, S. M.; Heuckendorff, M.; Jensen, H. H. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 944-947.
- <sup>62</sup> Tietze, L. F.; Schuster, H. J.; Krewer, B.; Schuberth, I. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 537-543.
- <sup>63</sup> Koeman, F. A. W.; Meissner, J. W. G.; van Ritter, H. R. P.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. G. *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 1-25.
- <sup>64</sup> Cheng, H.; Cao, X.; Xian, M.; Fang, L.; Cai, T. B.; Ji, J. J.; Tunac, J. B.; Sun, D.; Wang, P. G. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 645-652.
- <sup>65</sup> Andersson, M.; Oscarson, S. *Glycoconj. J.* **1992**, *9*, 122-125.
- <sup>66</sup> Robyt, J. F. in "Essentials of Carbohydrate Chemistry" 1<sup>o</sup>Ed., **1998**, Springer, p. 81.
- <sup>67</sup> Haque, M. E.; Kikuchi, T.; Kanemitsu, K.; Tsuda, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 1016-1029.
- <sup>68</sup> Tsuda, Y.; Nishimura, M.; Kobayashi, T.; Sato, Y.; Kanemitsu, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *3*, 2883-2887.
- <sup>69</sup> Barili, P. L.; Catelani, G.; D'Andrea, F.; De Rensis, F.; Falcini, P. *Carbohydr. Res.* **1997**, *298*, 75-84.
- <sup>70</sup> Catelani, G.; Corsaro, A.; D'Andrea, F.; Mariani, M.; Pistarà, V.; Vittorino, E. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 2349-2358.
- <sup>71</sup> Mitsunobu, O.; Yamada, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, *40*, 2380-2382.
- <sup>72</sup> Kumara Swamy, K. C.; Bhuvan Kumar, N. N.; Balaraman, E.; Pavan Kumar K. V. *P. Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551-2651.
- <sup>73</sup> But, T. Y. S.; Toy, P. H. *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 1340-1355.
- <sup>74</sup> Fletcher, S. *Org. Chem. Front.* **2015**, *2*, 739-752.
- <sup>75</sup> Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, *1*, 1-28.
- <sup>76</sup> Huges, D. L.; Reamer, R. A.; Bergan J. J.; Grabowski, E. J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6487-6491.
- <sup>77</sup> Reynolds, A. J.; Kassiou, M. *Curr. Org. Chem.* **2009**, *13*, 1610-1632.

- <sup>78</sup> Hagiya, K.; Muramoto, N.; Misaki, T.; Sugimura, T. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 6109-6114.
- <sup>79</sup> Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. in “*Protective groups in organic synthesis*” 4<sup>o</sup>Ed., **2007**, Wiley-Interscience.
- <sup>80</sup> Chung, M. K.; Orlova, G.; Goddard, J. D.; Schlaf, M.; Harris, R.; Beveridge, T. J.; White, G.; Ross Hallett, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10508-10518.
- <sup>81</sup> Komiotis, D.; Agelis, G.; Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Antonakis, K. *J. Carbohydr. Chem.* **2006**, *25*, 441-450.
- <sup>82</sup> Kiefel, M. J.; Beisner, B.; Bennett, S.; Holmes, I. D.; von Itzstein, M. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1314-1320.
- <sup>83</sup> Esposto, C. Tesi di Laurea **2011**, Università di Pisa.
- <sup>84</sup> Horrobin, T.; Tran, C. H.; Crout, D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, *6*, 1069-1080.
- <sup>85</sup> Terreni, M.; Salvetti, R.; Linati, L.; Fernandez-Lafuente, R.; Fernández-Lorente, G.; Bastida, A.; Guisan, J. M. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1615-1621.
- <sup>86</sup> Kováč, P.; Sokoloski, E. A.; Glaudemans, C. P. J. *Carbohydr. Res.* **1984**, *128*, 101-109.
- <sup>87</sup> Agnihotri, G.; Misra, A. K. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 2420-2425.
- <sup>88</sup> Kogelberg, H.; Meyer, B. *Carbohydr. Res.* **1990**, *201*, 161-173.
- <sup>89</sup> Barili, P. L.; Catelani, G.; D’Andrea, F.; Mastroilli, E. *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, *16*, 1001-1010.
- <sup>90</sup> Ley, S. V.; Norman, J.; Griffith, W. P.; Marsden, S. P. *Synthesis* **1994**, *7*, 639-666.
- <sup>91</sup> Attolino, E.; Catelani, G.; D’Andrea, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *23*, 5279-5292.
- <sup>92</sup> Barili, P. L.; Berti, G.; Catelani, G.; D’Andrea, F.; Di Bussolo, V. *Carbohydr. Res.* **1996**, *290*, 17-31.
- <sup>93</sup> Attolino, E.; Bonaccorsi, F.; Catelani, G.; D’Andrea, F.; Křenek, K.; Bezouška, K.; Křen, V. *J. Carbohydr. Chem.* **2008**, *27*, 156-171.
- <sup>94</sup> Attolino, E.; Catelani, G.; D’Andrea, F.; Nicolardi, M. *J. Carbohydr. Chem.* **2004**, *23*, 179-190.
- <sup>95</sup> Barili, P. L.; Berti, G.; Catelani, G.; D’Andrea, F.; Puccioni, L. *J. Carbohydr. Chem.* **2000**, *19*, 79-91.
- <sup>96</sup> Gragnani, T. *PhD Thesis* **2014**, Università di Pisa.
- <sup>97</sup> The regent of the University of Michigan: US 0275070 (**2014**).
- <sup>98</sup> Csomós, P.; Fodor, L.; Mándity, I.; Bernáth, G. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 4983-4989.
- <sup>99</sup> Haines, A. H. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1981**, *39*, 13-70.