



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE

CICLO XXI

COORDINATORE Prof. Gilli Gastone

**SINTESI E PROPRIETA' BIOLOGICHE
DI LIGANDI GLICOSIDICI MULTIVALENTI**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM / 06

Dottorando
Dott.sa Moni Lisa

I° Tutore
Prof. Marra Alberto

II° Tutore
Prof. Dondoni Alessandro

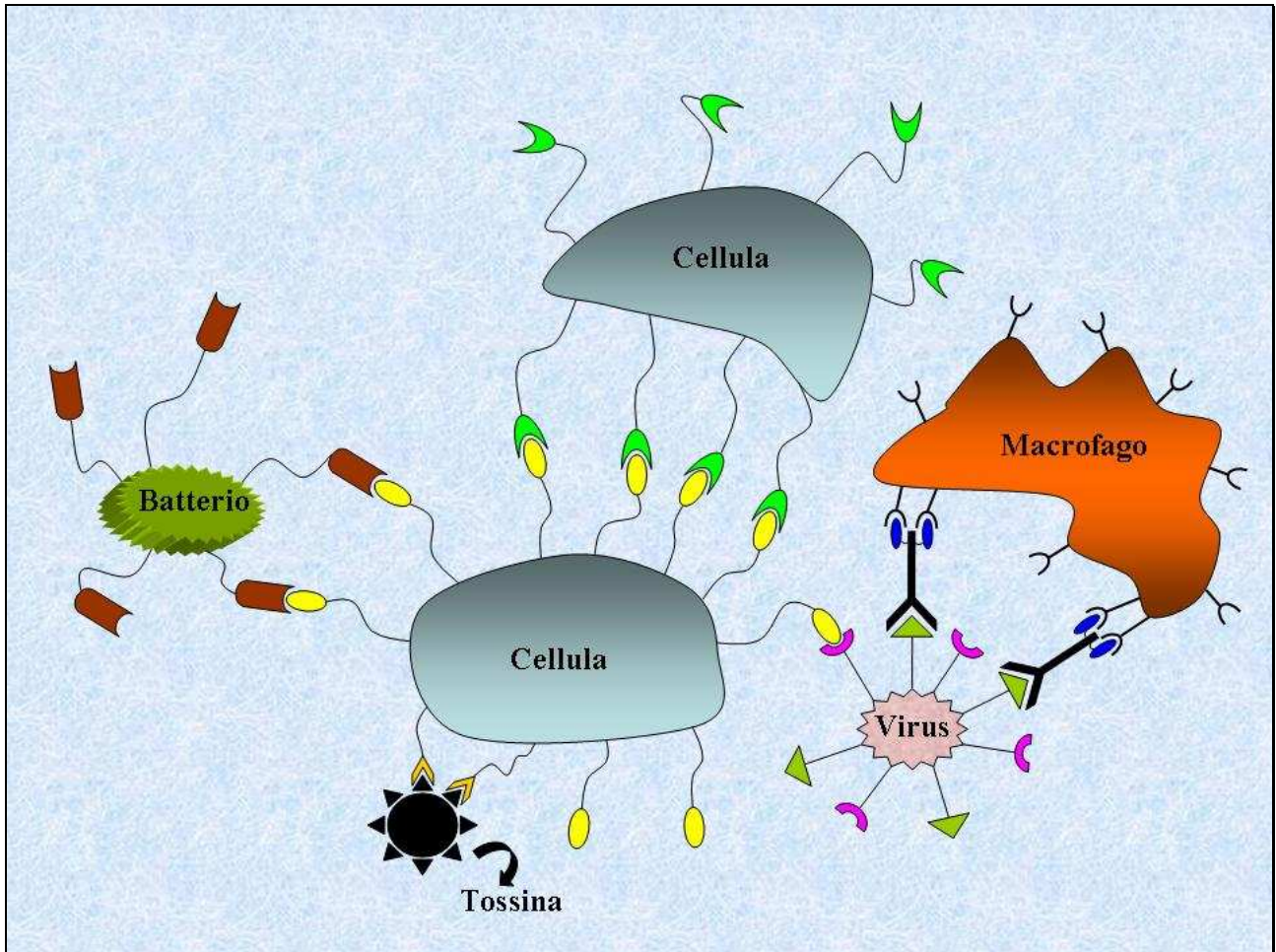
Anni Accademici 2006/2009

INDICE

	Pagina
ABSTRACT (ITALIANO)	3
ABSTRACT (INGLESE)	4
CAPITOLO 1: LA MULTIVALENZA	5
1.1 La multivalenza: aspetti generali.	5
1.2 Aspetti termodinamici.	6
1.3 Caratteristiche delle interazioni multivalenti nel mondo biologico.	11
1.4 Ruolo dei carboidrati e l'effetto <i>cluster</i> glicosidico.	14
1.5 <i>Click chemistry</i> : una potente arma per la realizzazione di sistemi multivalenti	20
1.6 Bibliografia.	22
CAPITOLO 2: I CALIXARENI	27
2.1 Le origini	27
2.2 Conformazione dei Calix[4]areni	30
2.3 Sintesi dei Calix[4]areni	32
2.4 Calixareni come <i>scaffold</i> multivalenti	34
2.5 Bibliografia.	39
CAPITOLO 3: CLUSTERS DI ACIDO SIALICO COME INIBITORI VIRALI	41
3.1 Introduction	41
3.2 Synthesis of multivalent sialosides	44
3.3 Biological assays	52
3.4 Conclusions	54

3.5 Experimental Section	55
3.6 References	77
CAPITOLO 4: GLYCOCLUSTERS PER ARRAY DI DNA	84
4.1 Introduction	84
4.2 Synthesis of C-galactosyl calix[4]arenes derivatives	85
4.3 Synthesis and characterization of glycocluster-oligonucleotide hybrids	88
4.4 Preparation of DNA-based glycoarrays to probe lectin-carbohydrate interactions	90
4.5 Conclusions	98
4.6 Experimental Section	98
4.7 References	116
CAPITOLO 5: GLYCOCLUSTERS PER NANOPARTICELLE DI TiO₂	120
5.1 Introduzione	120
5.2 Sintesi di calix[4]areni bifunzionali.	124
5.3 Sintesi e caratterizzazione di <i>glycoclusters</i> supportati su nanoparticelle di TiO ₂	127
5.4 Conclusioni	137
5.5 Parte sperimentale	137
5.6 Bibliografia	146

CAPITOLO 1: LA MULTIVALENZA



1.1 La multivalenza: aspetti generali

Le interazioni multivalenti sono caratterizzate dal simultaneo attacco di due o più ligandi di una entità (una molecola o una superficie) con due o più recettori di un'altra entità. La valenza di una entità è il numero di connessioni separate dello stesso tipo che si possono formare attraverso una interazione tipo *host-guests* con entità che possiedono funzionalità complementari. Quindi la valenza del complesso non è altro che il numero di singole interazioni tra le due entità. Queste interazioni sono comunemente di tipo non covalente, come ad esempio legami ad idrogeno, legami

di coordinazione metallo-ligando, interazioni idrofobiche, ioniche e forze di Van der Waals, e sono contraddistinte da una bassa energia e bassa specificità, ma diventano efficaci e specifiche quando un grande numero di legami si forma contemporaneamente.¹

La multivalenza riveste un ruolo molto importante sia nel campo dei fenomeni di riconoscimento molecolare, quindi nei processi biologici e patogeni,² ma anche nel campo della scoperta e sintesi di nuovi materiali.^{1b,3}

Essa infatti governa le interazioni tra proteine e piccole molecole, tra proteine o anticorpi e le membrane cellulari, e tra virus e cellule. In particolare negli ultimi anni è cresciuto notevolmente l'interesse per le interazioni proteina-carboidrato in quanto tali interazioni regolano processi importanti come il legame del virus dell'influenza alla membrana delle cellule dell'epitelio bronchiale,⁴ o il processo di riconoscimento fra carboidrati e lectine (proteine che riconoscono e si legano ai carboidrati) che sta alla base dei fenomeni di riconoscimento cellulare.⁵

1.2 Aspetti termodinamici

Per interazione multivalente, o anche detta polivalente, s'intende un'interazione fra N siti recettoriali e N ligandi distribuiti su due specie con ordine di valenza N , che avviene con una energia libera di associazione chiamata ΔG_N^{poly} . Nella Figura 1 sono schematizzati la nomenclatura proposta, le relazioni fra le energie libere e le costanti di inibizione per le interazioni di sistemi mono- e polivalenti.^{1a}


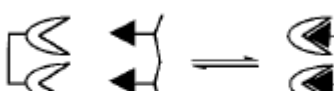
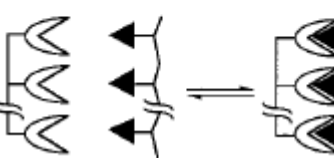
Recettore	Ligando	Complesso		ΔG_{tot}	K_{total}	ΔG_{avg}	K_i
			monovalente	ΔG^{mono}	K^{mono}	ΔG^{mono}	K^{mono}
			polivalente (bivalente)	ΔG_2^{bi}	K_2^{bi}	$\Delta G_{\text{avg}}^{\text{bi}}$	$K_{\text{avg}}^{\text{bi}}$
			polivalente (N -valente)	ΔG_N^{poly}	K_N^{poly}	$\Delta G_{\text{avg}}^{\text{poly}}$	$K_{\text{avg}}^{\text{poly}}$

Figura 1

In un'interazione monovalente quindi la differenza di energia libera che interviene è chiamata ΔG^{mono} , mentre quando N recettori monovalenti interagiscono con N ligandi monovalenti questa sarà $N\Delta G^{\text{mono}}$.

In un'interazione polivalente la media della differenza dell'energia libera di interazione, $\Delta G_{\text{avg}}^{\text{poly}}$, tra un singolo ligando ed un singolo recettore è uguale invece a $\Delta G_N^{\text{poly}}/N$. In teoria questo valore può essere maggiore, minore o uguale alla differenza di energia libera di un'analogia interazione monovalente (ΔG^{mono}) (Eq. 1).

$$\Delta G_{\text{avg}}^{\text{poly}} = \alpha \Delta G^{\text{mono}} \quad \text{Eq. 1}$$

In accordo con la biochimica classica, le interazioni polivalenti in cui $\Delta G_{\text{avg}}^{\text{poly}}$ è maggiore di ΔG^{mono} , presentano cooperatività positiva (sinergismo), quelle in cui è minore, presentano invece cooperatività negativa (interferenza), mentre le interazioni polivalenti in cui i due valori coincidono non presentano cooperatività (effetto additivo). Il coefficiente che lega i due termini nell'Eq. 1, α , è chiamato grado di cooperatività.⁶ Gli studiosi sono comunque concordi sul fatto che questo parametro ed il concetto in generale di cooperatività, sebbene spieghi perfettamente dal punto di vista termodinamico alcuni fenomeni biochimici molto importanti come nel caso dell'interazione tra l'ossigeno e l'emoglobina,⁷ mal si adatta a descrivere le interazioni polivalenti. Stoodart scrive in una recente *review*³ sull'argomento, che “la multivalenza e la cooperatività sono due fenomeni distinti. La cooperatività descrive come il legame di un singolo ligando possa influenzare l'affinità verso il recettore di successive altre interazioni, ed è facilmente valutata considerando singoli e consecutivi legami di ligandi monovalenti.” Mentre, come ribadiscono Huskens e Reinholdt,^{1b} “le interazioni multivalenti sono fundamentalmente diverse da quelle monovalenti, e i metodi tradizionalmente utilizzati per verificare sperimentalmente la natura della cooperatività nelle interazioni monovalenti, come il grafico di Hill e Scatchard, falliscono quando vengono applicati ad interazioni multivalenti, come ha dimostrato il Prof. Ercolani”.⁸

Whitesides,^{1a} per cercare di ottenere un'analisi quantitativa del guadagno energetico presente in un'interazione polivalente, ha proposto un nuovo parametro, che fosse una estensione del parametro α . Basandosi sull'idea che per stabilire la natura della cooperatività fosse necessario ed indispensabile fare una comparazione qualitativa tra l'interazione polivalente e l'analogia monovalente, Whitesides ha introdotto il parametro β (Eq. 2), definito come il rapporto fra la costante di affinità del ligando polivalente con il recettore polivalente (K_N^{poly}), e la costante di affinità del ligando monovalente analogo con lo stesso recettore (K^{mono}).

$$\beta = K_N^{\text{poly}} / K^{\text{mono}} \quad \text{Eq. 2}$$

Questo parametro è molto utile in tutti quei casi in cui il numero N di interazioni è sconosciuto, ad esempio nei fenomeni che coinvolgono sistemi biologici (un virus, la membrana cellulare).

Il parametro ΔG_N^{poly} è costituito, secondo la seconda legge della termodinamica, da una componente entalpica (ΔH_N^{poly}), ed una entropica (ΔS_N^{poly}), vedi Eq. 3.

$$\Delta G_N^{\text{poly}} = \Delta H_N^{\text{poly}} - T\Delta S_N^{\text{poly}} \quad \text{Eq. 3}$$

In prima approssimazione il valore ΔH_N^{poly} è la somma dei contributi entalpici di N interazioni monovalenti, $N\Delta H^{\text{mono}}$. Comunque questo valore può essere maggiore o minore a seconda delle interazioni intorno al sito attivo. In alcune circostanze infatti il legame di un ligando ad un recettore con una data entalpia può far sì che il successivo ligando interagisca con il recettore con maggior entalpia; questo significa che il valore $\Delta H_{\text{avg}}^{\text{poly}}$ è negativo, e quindi più favorevole del valore di ΔH^{mono} . Tale interazione è entalpicamente vantaggiosa, ed un esempio è rappresentato dal legame fra la tossina pentamerica del colera e cinque unità di GM1 sulla superficie cellulare.⁹

Se invece il legame di un ligando al suo recettore interferisce con il successivo, l'entalpia dell'interazione polivalente è meno favorevole di quella aspettata per N interazioni monovalenti analoghe. Questa interazione è entalpicamente sfavorevole e può accadere quando la formazione di multiple interazioni ligando-recettore tra due entità polivalenti necessita conformazioni molecolari energeticamente sfavorevoli.

Sebbene le considerazioni sull'entalpia di legame per le interazioni polivalenti siano facili da definire dal punto di vista qualitativo, altrettanto non si può dire quando si affronta la questione dal punto di vista quantitativo.

Consideriamo per esempio un recettore bivalente (Figura 2): se i due siti recettoriali sono indipendenti, il legame di due ligandi monovalenti **2** al recettore **1** avviene con una entalpia di legame doppia ($2\Delta H^{\text{mono}}$).

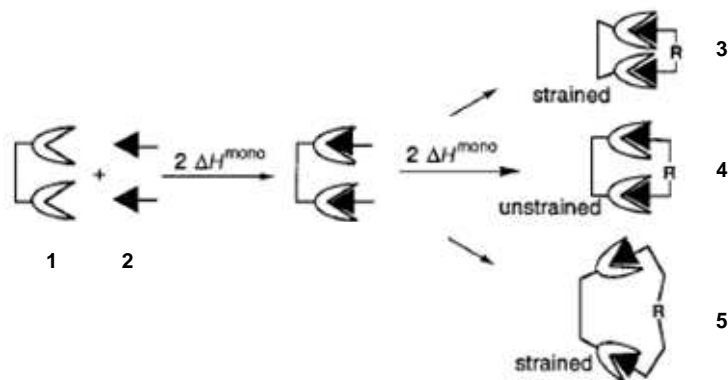


Figura 2

Per il ligando dimerico **4** (Fig. 2), nel quale le due unità che prendono parte all'interazione sono collegate da un gruppo rigido R che fissa le due unità nella stessa geometria di **1**, l'entalpia di legame è di nuovo il doppio dell'entalpia di una interazione monovalente analoga: $\Delta H_2^{bi} = 2\Delta H^{mono}$. Se la geometria del gruppo R (**3** e **5**) non si adatta perfettamente alla geometria spaziale di **1**, l'interazione può anche avvenire, ma a prezzo di una distorsione conformazionale di uno dei due *partners* o entrambi. Sebbene sia possibile, usando programmi di meccanica molecolare, stimare il cambiamento di entalpia introdotto dalla distorsione di R per adattarsi quando è troppo lungo, è difficile valutare l'entalpia di distorsione quando il recettore è ad esempio una proteina.

L'entropia^{1a} di una interazione polivalente ΔS_N^{poly} può essere considerata come la somma dei contributi traslazionali, rotazionali e conformazionali dell'associazione tra ligandi e recettori, più il contributo dato dal cambiamento di entropia del solvente circostante (Eq. 4).

$$\Delta S_N^{poly} = \Delta S_{trans,N}^{poly} + \Delta S_{rot,N}^{poly} + \Delta S_{conf,N}^{poly} + \Delta S_{solv,N}^{poly} \quad \text{Eq. 4}$$

L'entropia traslazionale di una molecola è determinata dalla libertà di muoversi indipendentemente nello spazio; il valore di ΔS_{trans} è proporzionale al logaritmo della massa M, ed inversamente proporzionale al logaritmo della sua concentrazione. L'entropia rotazionale invece, ΔS_{rot} , è costituita dalla libertà di una particella di ruotare attorno a tre assi cartesiane, e dipende proporzionalmente al logaritmo del prodotto fra i suoi tre principali momenti di inerzia I. I valori di ΔS_{trans} e ΔS_{rot} per una particella dipendono quindi solo debolmente dalla sua massa e dimensioni. Così in prima approssimazione i contributi entropici traslazionali e rotazionali di tutte le particelle (ligandi, recettori, o complessi ligandi-recettori) sono uguali. Nel caso in cui due particelle interagiscono fra loro, si ha in totale una perdita di tre gradi di libertà traslazionali e tre rotazionali. Se ignoriamo la differenza di massa tra le particelle, il costo totale di entropia traslazionale e rotazionale dell'associazione, sia che essa sia monovalente che polivalente, è in prima approssimazione lo stesso purchè tali particelle abbiano la stessa concentrazione. In realtà nella biologia, le concentrazioni delle molecole possono variare anche più di 12 ordini di grandezza (da mM a fM).

Anche se spesso l'entropia traslazionale è proporzionale solo al logaritmo della concentrazione, un così vasto intervallo porta con sé la consapevolezza che la concentrazione delle particelle è essenziale per stimare l'importanza dell'entropia traslazionale. Questo contributo cresce tanto quanto diminuisce la concentrazione.

Per spiegare più chiaramente l'importanza dei vari contributi entropici, facciamo un esempio prendendo come modello l'interazione tra due entità bivalenti (Figura 3). Il costo totale di entropia

di associazione di due recettori monovalenti (Figura 3, caso (a)) è dato dalla somma dei contributi riportata di seguito. Se i due ligandi ed i due recettori sono legati tra di loro con un braccio rigido,

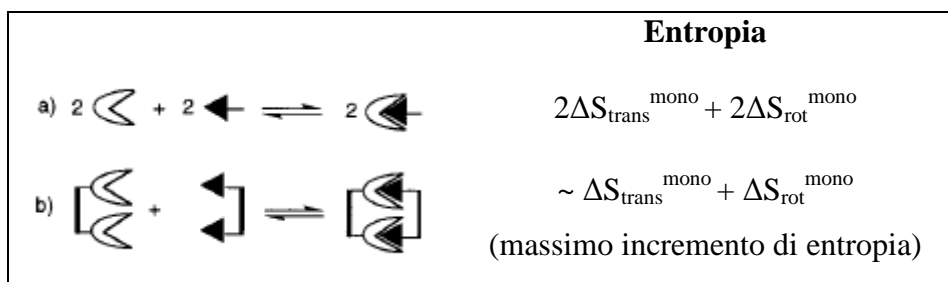


Figura 3

cioè attorno al quale non siano possibili torsioni dei legami, e che posiziona le due entità in modo tale da far combaciare perfettamente i punti di interazione, il costo entropico totale dell'associazione di queste due specie bivalenti è approssimativamente $\Delta S_{\text{trans}} + \Delta S_{\text{rot}}$, cioè metà del costo entropico dell'associazione di due paia di molecole indipendenti, e quindi uguale a quello di una interazione monovalente (Figura 3, caso (b)). Questo si spiega grazie al fatto che una volta che si è formata la prima interazione recettore-ligando tra le due entità bivalenti, la seconda avviene attraverso interazioni intramolecolari senza ulteriori costi entropici, nè traslazionali e rotazionali, né tanto meno conformazionali. Quindi nel caso che non ci siano ulteriori costi entalpici, la seconda interazione avviene con una variazione più grande di energia libera rispetto alla prima interazione. Questo tipo di interazioni presentano un contributo di differenza di entropia conformazionale pari a zero, e sono favorite dal punto di vista entropico.

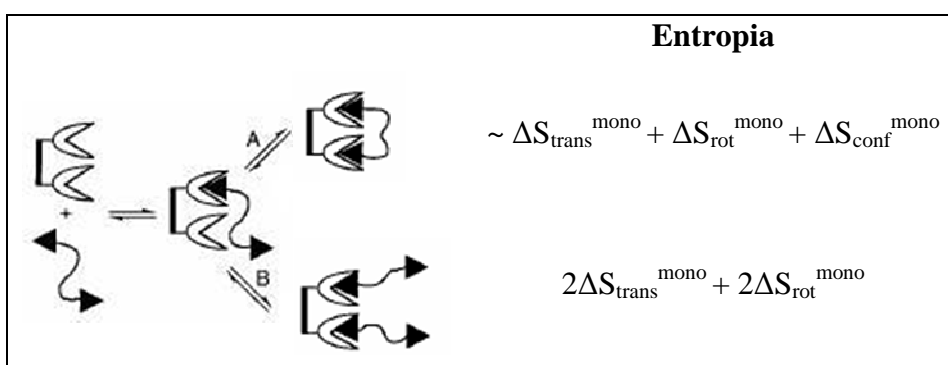


Figura 4

Nella realtà un fenomeno di complessazione ha quasi sempre il contributo di entropia conformazionale ΔS_{conf} minore di zero, cioè sfavorevole, in quanto i ponti di interconnessione fra i gruppi funzionali delle molecole non sono mai rigidi, ma bensì flessibili. Il caso finora affrontato è quindi poco realistico. Se questo costo conformazionale è minore della somma del costo traslazionale e rotazionale, allora il costo entropico di un'associazione fra due entità bivalenti sarà

minore rispetto a quella fra due entità monovalenti, ed l'interazione sarà ancora entropicamente favorita (Figura 4, caso A).

Nel caso in cui invece il costo conformazionale della seconda interazione sia maggiore di quello traslazionale e rotazionale (Figura 4, caso B), l'interazione intramolecolare non potrà mai avvenire perchè sfavorita entropicamente rispetto all'interazione intermolecolare del recettore con un altro ligando bivalente.

E' interessante quindi vedere come l'entalpia e l'entropia possano avere effetti di compensazione sull'affinità di interazioni polivalenti: se da un lato la flessibilità conformazionale aumenta il costo entropico conformazionale di una interazione e quindi la sfavorisce, è anche vero che la stessa flessibilità aumenta la probabilità che tutte le interazioni ligando-recettore possano avvenire senza tensioni di legame.

L'ultimo contributo all'entropia totale di un'interazione è il cambiamento in entropia delle molecole di solvente circostanti, ΔS_{solv} . Nel caso delle interazioni biologiche il sistema in cui avviene l'interazione è di solito acquoso, ed in questo caso il contributo maggiore è rappresentato dallo spostamento delle molecole d'acqua organizzate sulle facce esposte delle particelle biologiche (proteine, enzimi, membrane, ecc.) con conseguente aumento dell'entropia. Lo studio quantitativo del contributo entropico dato dal solvente in un'interazione è stato affrontato da molti ricercatori, ed in letteratura si trovano un vasto numero di *reviews* sull'argomento.¹⁰ In generale si può dire che questo contributo entropico per unità di ligando è simile sia che si tratti di un sistema monovalente che polivalente, a patto che il braccio di legame fra le unità di ligando non cambi conformazione o interagisca con la superficie del recettore in modo tale da cambiare anche la sua interazione con le molecole di solvente. Concludendo si può dire quindi che al valore totale di ΔS viene aggiunto un contributo negativo di ΔS per ogni interazione ligando-recettore, sia che esse avvengano in un sistema monovalente che polivalente.

1.3 Caratteristiche delle interazioni multivalenti nel mondo biologico

I sistemi biologici, come è stato già detto in precedenza, spesso utilizzano interazioni multivalenti. Questo può essere spiegato grazie ad alcuni vantaggi funzionali che tali interazioni comportano. Innanzitutto la forza di un'interazione multivalente può essere molto più grande di quello che può essere ottenuto da una singola interazione fra un ligando di basso peso molecolare ed una proteina, senza contare l'intervento di cooperatività. Questo è stato ampiamente dimostrato spiegando i guadagni energetici che possono intervenire nelle interazioni multivalenti, rispetto a quelle monovalenti. Ancora più importante è il fatto che in un sistema multivalente può essere notevolmente variata l'intensità del segnale, cambiando semplicemente il numero di coppie ligando-

recettore che intervengono nell'interazione. Questa capacità di modulazione è particolarmente importante se pensiamo alla complessità della risposta biologica, per la quale non può essere sufficiente il sistema “on” e “off” caratteristico dell'interazione tra un singolo ligando e un singolo sito recettoriale. Un esempio perfetto è quello della risposta immunitaria mediata da anticorpi dei macrofagi nei confronti di organismi patogeni¹¹ (Figura 5).

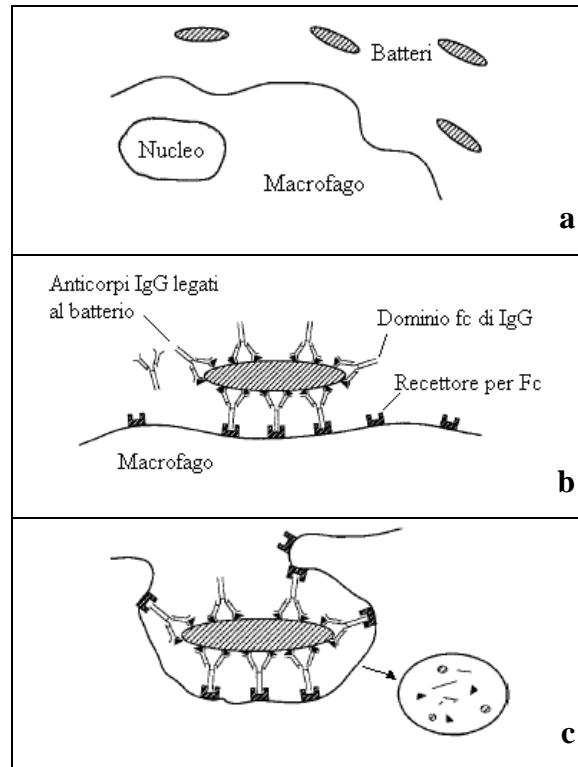


Figura 5

Gli anticorpi sono molecole specializzate nel riconoscimento e successiva interazione, con sostanze estranee all'organismo (il non-sè) chiamate antigeni, ad esempio un batterio o un virus. Solitamente la maggior parte dei batteri presenta sulla propria superficie svariati determinanti antigenici o epitopi, cioè porzioni a cui si legano gli anticorpi. Soltanto dopo questa interazione antigene-anticorpo, il macrofago può legarsi attraverso i suoi recettori alla coda degli anticorpi (Figura 5b) ed internalizzare per endocitosi il batterio, che poi sarà distrutto (Figura 5c). L'interazione di un singolo anticorpo però non è in grado di causare l'ingestione del patogeno da parte del macrofago, evento reso possibile invece dall'interazione di due o più anticorpi. In questo modo si evita che l'interazione non specifica di un anticorpo ad un target non-polivalente, ad esempio un costituente dell'organismo (il sè), provochi una forte adesione e quindi la risposta immunitaria.

Un altro importante vantaggio portato dalla multivalenza, è la possibilità di indurre cambiamenti conformazionali macroscopici delle cellule. Nella Figura 6 vediamo infatti come molte deboli

interazioni fra due cellule riescono a far entrare in intimo contatto le due superfici rispetto ad una singola e forte interazione.

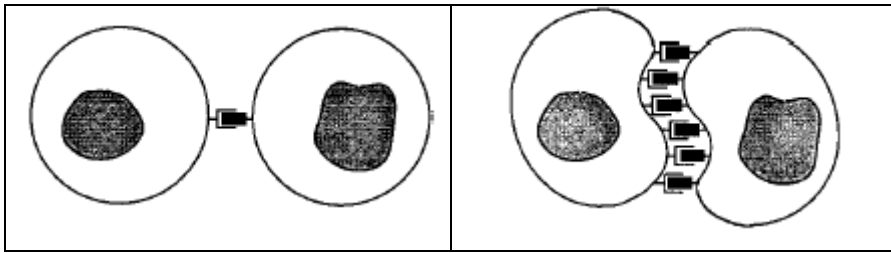


Figura 6

E' quello che succede nel fenomeno di adesione tra i neutrofili, cellule del sistema immunitario, e particolari proteine chiamate selectine o molecole di adesione presenti sulla superficie delle cellule endoteliali dei vasi sanguigni.¹² (Figura 7)

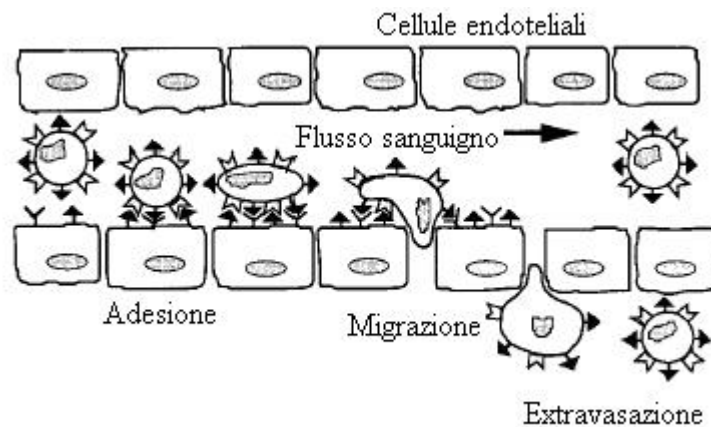


Figura 7

In seguito ad uno stimolo infiammatorio si verifica un'interazione tra endotelio e cellule (Figura 7): in questa prima fase i neutrofili interagiscono in modo polivalente, attraverso unità tetrasaccaridiche chiamate sLe^x (Sialil Lewis X), con le selectine presenti in molteplici copie sull'endotelio, determinando un fenomeno detto "rolling", cioè i neutrofili "rotolano" sulla parete vasale, cambiando la loro forma da sferica ad appiattita, e formando interazioni che portano alla fuoriuscita dal comparto vascolare e alla migrazione nel tessuto in cui si sta sviluppando la risposta immunitaria.

La natura infine utilizza la multivalenza anche per prevenire in modo efficace interazioni biologiche indesiderate. Uno degli esempi più famosi è quello dei fluidi secreti dalle cellule endoteliali polmonari di molti mammiferi ricchi di mucine, glicoproteine che possiedono sulla loro superficie un elevato numero di unità di acido sialico. L'acido sialico è un particolare carboidrato coinvolto in una serie di interazioni molto importanti, tra cui l'infezione di cellule umane da parte dei virus dell'influenza A e B,⁴ argomento che verrà approfondito in seguito. Queste mucine, ed in

particolare l' α 2macroglobulina, possono legarsi al virus dell'influenza inibendone l'interazione con le cellule, ed impedendo così l'infezione virale (Figura 8).

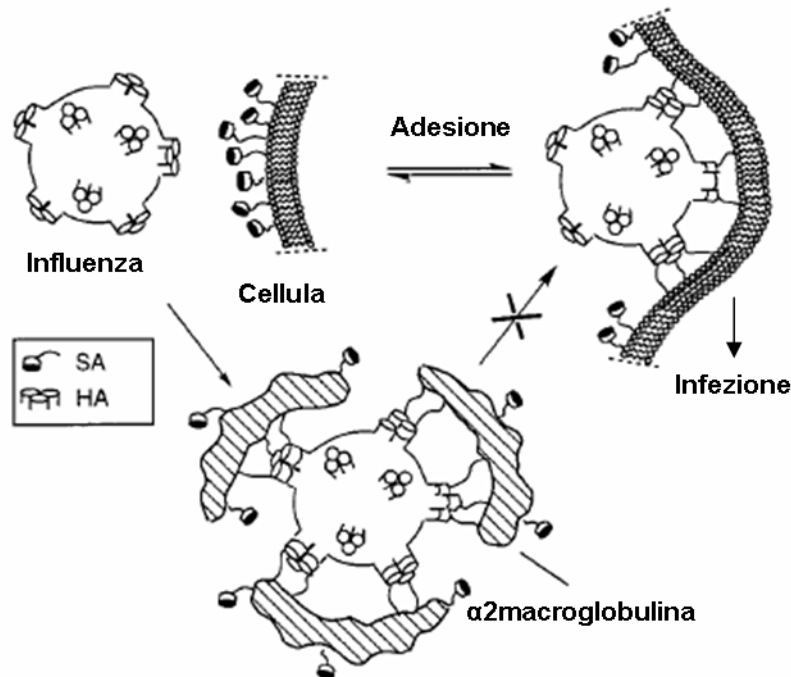


Figura 8

1.4 Ruolo dei carboidrati: l'effetto *cluster glicosidico*.

Come già dimostrato nei precedenti paragrafi le interazioni multivalenti più studiate ed interessanti sono quelle tra carboidrati e proteine, interazioni che stanno alla base di molti ed importanti fenomeni biologici.¹³ Per questo motivo lo studio delle interazioni carboidrato-proteina ha acquisito sempre di più negli anni una posizione di rilievo nel panorama scientifico internazionale. Per capire quanto grande sia il ruolo giocato dai carboidrati,¹⁴ basti pensare che la maggior parte delle cellule ne sono ricoperte sulla superficie, e la presenza di questi carboidrati, come quelli presenti sulle glicoproteine circolanti nel sangue, è modulata a seconda dello stato fisiologico in cui la cellula si trova, come ad esempio nelle diverse fasi del processo di crescita o nel processo di trasformazione oncologica. Inoltre le proteine ed i carboidrati, grazie alla presenza di più gruppi funzionali (nella maggior parte dei casi gruppi ossidrilici) su ciascuna unità monomerica, interagendo in modo multivalente e con diverse combinazioni fra di loro, sono capaci di diversificare l'interazione, e quindi la risposta biologica. Infatti ad ogni complesso di interazione corrisponde potenzialmente uno specifico messaggio biologico, in modo tale da ampliare il più possibile lo spettro di risposta biologica partendo da un numero limitato di monomeri.

Le proteine capaci di legarsi non covalentemente ai carboidrati, escludendo gli enzimi e le immunoglobuline, sono chiamate generalmente lectine.⁵ Le lectine riconoscono e legano in modo

reversibile e con alta specificità mono- e oligosaccaridi, non hanno attività catalitica, ed al contrario degli anticorpi, non sono prodotte in seguito ad una risposta immunitaria. Ogni lectina contiene tipicamente due o più siti di legame per i carboidrati, e per questo motivo sono considerate entità polivalenti. Grazie a questa caratteristica, riescono per esempio ad interagire con più cellule contemporaneamente, formando dei veri e propri ponti tra di esse (*cross-linking*), che ne determinano la precipitazione, un fenomeno più conosciuto come agglutinazione cellulare. L'agglutinazione degli eritrociti, o emoagglutinazione, è una delle caratteristiche più singolari di queste proteine, ed è sfruttato di *routine* nei saggi per la loro identificazione e caratterizzazione. Le lectine possono inoltre formare legami con polisaccaridi o glicoproteine presenti in soluzione, determinando la loro precipitazione.

Sono state trovate nei più svariati organismi, da virus e batteri a piante ed animali, e rappresentano un gruppo eterogeneo di proteine, nel quale varia molto la grandezza, la struttura e la combinazione dei loro siti di legame. Anche se la loro scoperta risale a più di 100 anni fa, la loro importanza e quindi l'interesse nei loro confronti è cresciuto a partire dagli anni sessanta.¹⁵

I siti di legame delle lectine possono essere rappresentati come delle leggere depressioni della superficie della proteina, caratteristica che le differenzia molto dagli enzimi dove di solito il sito attivo è una vera e propria tasca, nella quale deve entrare il ligando. Le interazioni fra carboidrati e lectine sono essenzialmente costituite da legami ad idrogeno ed interazioni idrofobiche; in alcuni casi giocano un ruolo importante anche legami di coordinazione con ioni metallici.¹⁶ Generalmente i legami ad idrogeno sono formati tra gruppi ossidrilici, e gruppi NH, OH o atomi di ossigeno della proteina. Quando due ossidrilici adiacenti di un monosaccaride interagiscono con un atomo differente dello stesso aminoacido (ad esempio i due ossigeni della funzione carbossilica dell'acido glutammico o aspartico), formano un legame ad idrogeno bidentato,¹⁷ molto comune nei complessi carboidrato-proteina (Figura 9).

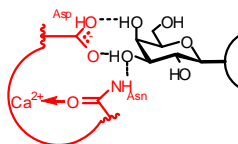


Figura 9

Un tipo differente di legame ad idrogeno caratteristico in questi complessi è il legame cooperativo, nel quale il gruppo ossidrilico agisce simultaneamente da donatore e accettore (Figura 9). Per quanto riguarda le interazioni di van der Waals invece, sebbene siano piuttosto deboli, sono di solito molto numerose ed insieme apportano un contributo fondamentale all'interazione. Infatti anche se i carboidrati in generale sono molecole altamente polari, la disposizione sterica dei gruppi

ossidrili può creare delle zone idrofobiche sulla superficie dello zucchero, che a loro volta possono formare legami con le regioni lipofile della proteina. Uno degli esempi più comuni è l'allineamento e l'adesione dell'anello del monosaccaride alle catene laterali di aminoacidi aromatici, come la fenilalanina, la tirosina o il triptofano, oppure l'interazione fra il metile del gruppo acetamido presente negli *N*-acetil amino zuccheri e i residui aromatici delle lectine. Nella Figura 10 vediamo un esempio in cui sono mostrati tutti i tipi di legame ora enunciati, l'interazione fra l'acido sialico e la lectina WGA¹⁸ (*wheat germ agglutinin*). Oltre ai legami ad idrogeno in cui gli atomi di ossigeno si comportano a seconda delle volte come accettori o donatori,

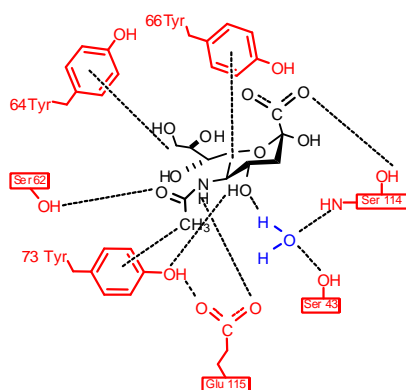


Figura 10

si possono evidenziare diverse interazioni di van der Waals tra l'anello del carboidrato e la porzione aromatica della tirosina 66, o tra il metile del gruppo acetamido e la tirosina 73. Una terza tirosina (Tyr64) interagisce con la catena di glicerolo dell'acido sialico. Inoltre in questo esempio si vede come l'interazione fra il carboidrato e la proteina sia mediata da una molecola di acqua. Infatti le piccole dimensioni, l'abilità di agire sia come donatore che accettore nei legami ad idrogeno, fanno sì che l'acqua possa agire come "calcinà", che in un certo senso contribuisce a rendere più stabile l'interazione. Lo studio più approfondito delle interazioni carboidrato-proteina ha rivelato che la presenza di molecole d'acqua nel complesso di interazioni multivalenti è un fenomeno comune,¹⁹ suggerendo così l'importante ruolo che ricopre l'acqua nei processi di riconoscimento.

Tutte queste interazioni, come è stato già dimostrato nei paragrafi precedenti, sono contraddistinte da una bassa energia e bassa specificità, ma diventano efficaci e specifiche quando un grande numero di legami si forma contemporaneamente. L'attacco simultaneo di recettori multipli presenti su una struttura biologica (ad esempio le molte copie di una proteina presenti sulla superficie di un virus) a ligandi multipli situati su un'altra struttura (ad esempio gli oligosaccaridi delle glicoproteine di membrana cellulare) porta ad un incremento dell'affinità di legame molto maggiore di quanto si potrebbe attendere in base al semplice aumento di concentrazione del ligando monovalente. Quindi l'incremento di affinità osservato non è semplicemente additivo ma sinergico,

un fenomeno che nel 1995 è stato definito da Lee come effetto *cluster*,²⁰ un mezzo escogitato dalla natura per produrre interazioni forti sfruttando la moltiplicazione di eventi di legame che presi singolarmente risultano deboli.

Negli ultimi anni i chimici organici hanno sintetizzato un'ampia gamma di sistemi densamente glicosilati (*glycoside clusters*), in cui più unità di carboidrato sono legate covalentemente ad una struttura portante (*scaffold*), avente unicamente funzioni di ancoraggio dei ligandi, come ad esempio polimeri, peptidi, dendrimeri, calixareni, ciclodestrine.²¹ Sono stati costruiti sistemi a geometria definita, semirigida, con lunghezza del braccio spaziatore variabile, i quali hanno permesso di studiare la struttura del recettore. Infatti dalla formazione di complessi con *clusters* a conformazione nota è possibile risalire alla disposizione spaziale dei siti di legame recettoriali e valutarne le distanze. Tutte queste informazioni consentono di studiare in maniera dettagliata l'affinità del recettore nei confronti di un particolare ligando, in maniera tale da poterne mimare o contrastare l'azione qualora fosse la causa di una patologia. In base a questi studi sono emersi degli aspetti comuni, comportamenti che si riscontrano nella maggior parte delle interazioni multivalenti carboidrato-proteina, e che possono essere utili per descrivere il fenomeno:

- C'è quasi sempre un vantaggio, quindi un aumento di affinità per un ligando multivalente rispetto al suo monomero.
- Esiste una grande variabilità nella magnitudine dell'effetto *cluster* glicosidico, che non rispetta necessariamente l'aumento della valenza del ligando. Ad esempio nei sistemi a bassa valenza non c'è una relazione certa tra valenza ed affinità, in quanto sono riportati incrementi di circa 1000 volte per ligandi bivalenti, e 0.4 per ligandi monovalenti.
- Sicuramente esiste una relazione fra la magnitudine dell'effetto *cluster* glicosidico ed il saggio utilizzato nell'analisi. Questo può essere spiegato dalle diverse concentrazioni richieste dalle varie tecniche e per le diverse proprietà fisiche prese in esame in ogni saggio.
- Non c'è una relazione apparente fra la valenza della lectina e la magnitudine dell'effetto *cluster* glicosidico.

Il prof. Toone^{20c} ha individuato essenzialmente tre diversi tipi di meccanismi attraverso i quali si produce questo incremento di affinità nei sistemi biologici; (1) formazione di legami intramolecolari, anche chiamato effetto di chelazione; (2) formazione di legami intermolecolari (fenomeni di aggregazione e precipitazione), e (3) stabilizzazione sterica. Le considerazioni termodinamiche del primo meccanismo sono già state ampiamente trattate al paragrafo 1.2. In generale si può dire che per le interazioni carboidrato-proteina, dove le energie dei legami monovalenti sono piccole, e la distanza fra i siti di legame delle lectine sono grandi, il meccanismo

intramolecolare non è molto favorito. Tuttavia esistono noti esempi in cui il legame intramolecolare sembra facilitato, è il caso di alcune tossine batteriche o dei ligandi di tipo polimerico.

Ligandi multivalenti possono quindi legarsi a recettori multivalenti anche attraverso un meccanismo di tipo intermolecolare. In questo caso sono favoriti i fenomeni di aggregazione e precipitazione. Questa caratteristica è stata sfruttata ampiamente nella caratterizzazione delle lectine.²² L'estensione del precipitato dipende fortemente da svariati fattori, tra cui, la concentrazione dei ligandi e delle macromolecole, la costante di affinità dell'interazione, la valenza e la struttura dei due *partners* e le caratteristiche della soluzione in cui avviene il legame, come ad esempio la forza ionica, il pH e la temperatura. Ovviamente anche il rapporto fra il ligando ed il recettore è molto importante; di solito si ottengono grandi aggregati solo quando i due sono presenti in quantità equimolari.

Un esempio nel quale si trovano contemporaneamente i due meccanismi è quello riportato da Bundle²³ e collaboratori, che hanno sintetizzato un ligando decavalente, chiamato *STARFISH* (Figura 11), quale inibitore della tossina batterica SLT (*Shiga like toxin*).

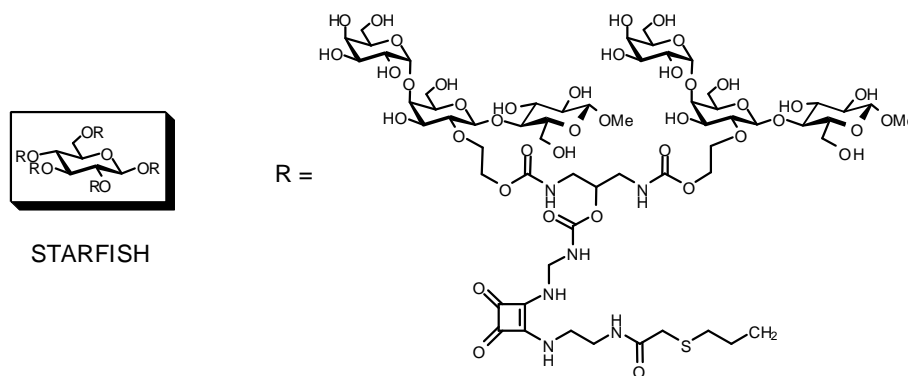


Figura 11

Questa molecola è stata definita da Stoddart²⁴ “un trionfo di *design* razionale”: consiste in un carboidrato come struttura portante, dalla quale si diramano cinque bracci spaziatori, ognuno dei quali termina con un paio di analoghi del trisaccaride Gb3 (globotriaosilceramide), il ligando naturale della tossina batterica SLT.

La tossina SLT è costituita da una subunità A, che ha attività enzimatica ed è responsabile dell'azione tossica, inibendo in modo irreversibile la sintesi proteica delle cellule ospiti, e cinque subunità B che determinano il riconoscimento e legame con il recettore glicolipidico sulla superficie cellulare. I cinque siti di legame sono distanti circa 10 Å l'uno da l'altro,²⁵ e sono tutti posizionati lungo lo stesso asse, per cui la tossina non presenta proprietà agglutinanti; ogni sito di legame riconosce una unità trisaccaridica. Attraverso il saggio ELISA²⁶ il ligando decavalente ha mostrato

una attività di 10^6 volte superiore a quella del monomero corrispondente. Studi cristallografici ai raggi X hanno dimostrato che l'interazione ligando-recettore porta alla formazione di un complesso tra due pentameri di SLT ed un singolo ligando decavalente (Figura 12). Il ligando quindi presenta contemporaneamente un effetto chelante e di aggregazione.

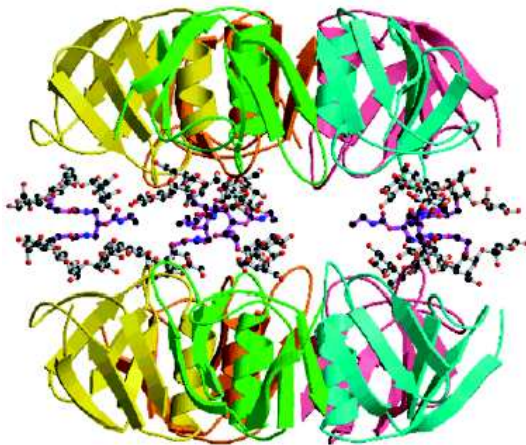


Figura 12

Il terzo meccanismo, suggerito da Whitesides,¹ è la stabilizzazione sterica. Secondo questa teoria la presenza di strutture molecolari ingombranti vicino ai siti di legame delle proteine, previene l'interazione di altre macromolecole. Tale contributo sembra essere particolarmente importante nel caso dei ligandi polimerici. Whitesides ed il suo gruppo hanno dimostrato come le caratteristiche del polimero possano influenzare in modo positivo e negativo l'effetto di stabilizzazione. Ha per esempio un'importanza fondamentale la conformazione che il polimero adotta in soluzione (Figura13).

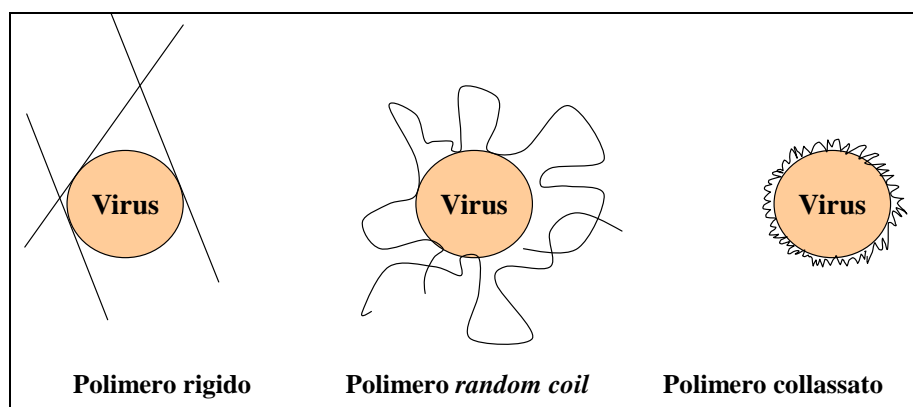


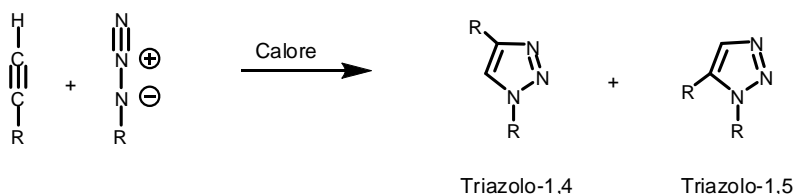
Figura 13

A parità di lunghezza e siti di interazione con la superficie ad esempio di un virus, un polimero può assumere in soluzione una conformazione rigida, o casualmente dispersa. In accordo con le regole della stabilizzazione delle sospensioni colloidali,²⁷ nel secondo caso il polimero ha una capacità di prevenire l'agglutinazione delle particelle maggiore rispetto al primo. Quando invece il polimero si lega ad un elevato numero di siti, collassa sulla superficie della particella e non è di

nuovo in grado di prevenire efficacemente la flocculazione (rottura della sospensione colloidale). Quindi i polimeri in grado di stabilizzare efficacemente una sospensione colloidale devono essere relativamente lunghi, avere una buona bagnabilità, avere un'alta mobilità conformazionale ed assumere in soluzione la conformazione detta "random coil".

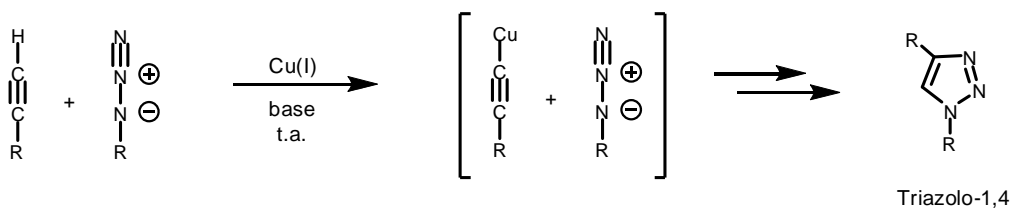
1.5 Click chemistry: un potente strumento per la realizzazione di sistemi multivalenti

Nel 2001 il Professor Sharpless²⁸ ha coniato il termine "click chemistry" per indicare reazioni chimiche con particolari caratteristiche: queste reazioni "devono essere versatili, avere alte rese, generare sottoprodotti facilmente rimovibili, ed essere stereospecifiche (non necessariamente enantiospecifiche). Il processo deve richiedere condizioni blande di reazione, impiego di reagenti e prodotti di partenza a basso costo, deve poter fare a meno di solventi, o impiegare solventi come l'acqua, ed i prodotti finali devono essere facilmente isolabili."²⁸ Uno dei primi esempi di "click reaction" è la cicloaddizione rame(I) catalizzata tra un' azide ed un alchino terminale a formare un eterociclo a 5 termini chiamato 1,2,3-triazolo. Questa reazione, conosciuta da decenni come cicloaddizione di Huisgen,²⁹ veniva condotta per semplice riscaldamento dei due reagenti, ma è stata sempre poco utilizzata in sintesi organica in quanto scarsamente regioselectiva. Infatti, poiché l' orientamento relativo dell' alchino e dell' alchilazide durante la cicloaddizione è praticamente casuale, si ottengono miscele di triazoli disostituiti in posizione 1,4 e 1,5 in maniera non prevedibile e spesso in quantità quasi uguali (Schema 1).



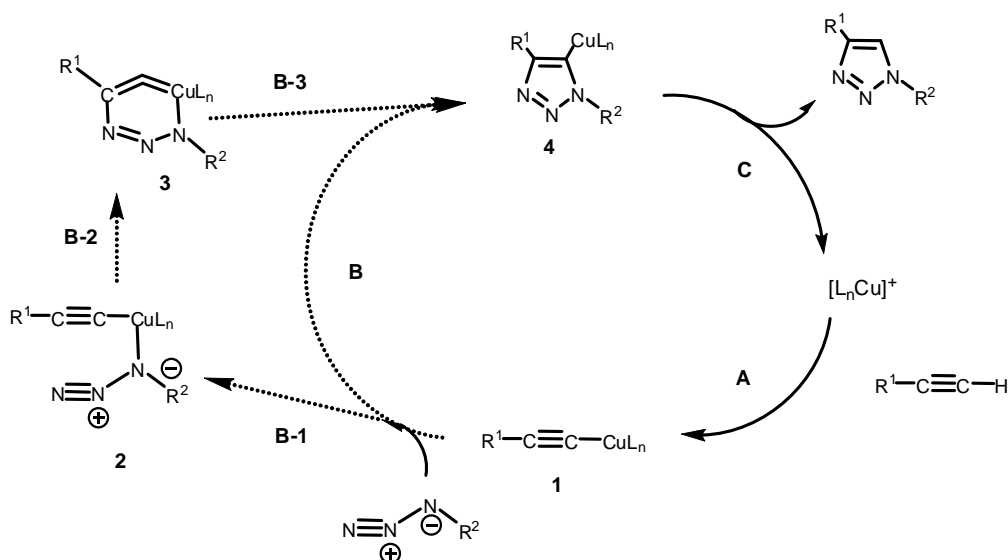
Schema 1

Nel 2002 è stata descritta da Meldal³⁰ e Sharpless³¹ una variante della cicloaddizione di Huisgen in cui si utilizza un sale di rame(I) come catalizzatore. Con questa semplice modifica si ottiene non solo un notevole incremento della velocità di reazione, tale da non richiedere prolungati riscaldamenti, ma anche una totale regioselectività a favore dell' isomero 1,4-disostituito (Schema 2).



Schema 2

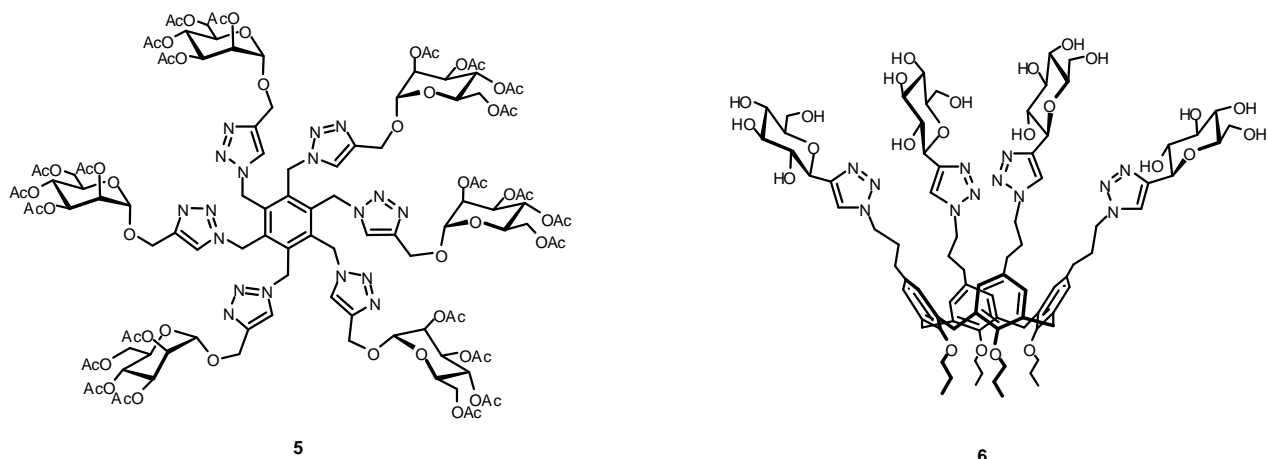
Il meccanismo proposto da Sharpless per questa reazione prevede più passaggi (Schema 3). Il ciclo catalitico inizia con la formazione dell'intermedio chiave **1**, un acetiluro di rame formato in situ dall'alchino terminale e il sale di rame(I). Calcoli teorici³² hanno dimostrato che il passaggio diretto (strada B) da **1** a **4** attraverso un meccanismo di tipo concertato, è fortemente sfavorito, e che più probabilmente la reazione procede per tappe (B-1→B-2→B-3), con la formazione dell'intermedio a sei termini **3**.³³



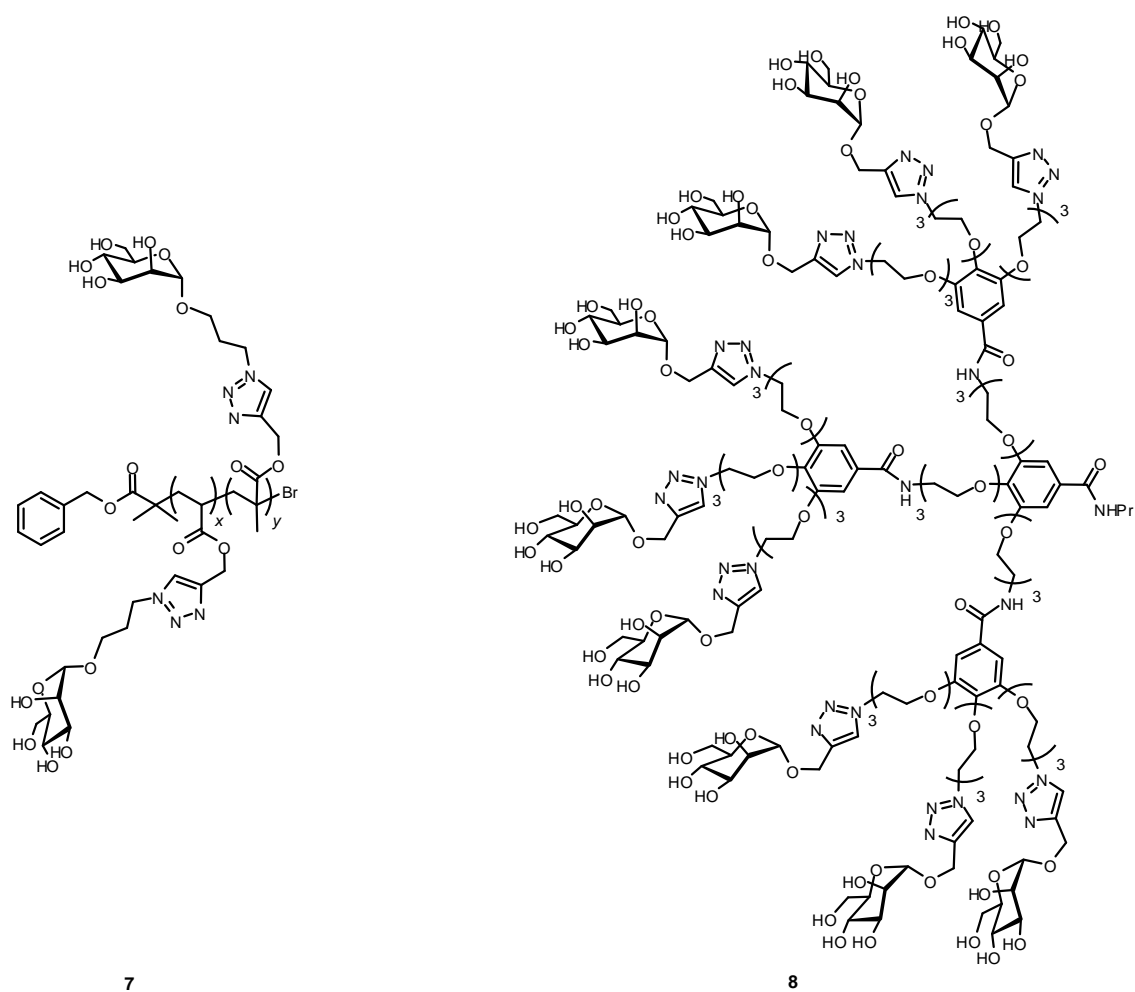
Schema 3

L'estrema efficienza chimica di questa reazione, la sua regioselettività e la tolleranza delle più svariate condizioni sperimentali, la rende particolarmente utile nella costruzione di strutture organiche complesse, come ad esempio *clusters*, dendrimeri, polimeri, peptidi e macrocicli. Come ha messo in evidenza il Professor Dondoni,³⁴ il triazolo può essere considerato come una “keystone”, cioè quello che in architettura viene chiamata una “chiave di volta”, la pietra centrale indispensabile per tenere insieme le altre unità della struttura.

Questa reazione è stata ampiamente sfruttata in particolar modo nel campo della sintesi di sistemi glicosilati, in quanto, oltre ai vantaggi già elencati, possiede due fondamentali caratteristiche: prima di tutto è una reazione estremamente chemoselettiva, per cui può essere usata per funzionalizzare molecole complesse con tanti gruppi funzionali come i carboidrati, ed in secondo luogo può essere eseguita in ambiente acquoso, quindi eventualmente nell'ambiente fisiologico e quindi su zuccheri deprotetti. Negli ultimi anni sono stati pubblicati un numero elevato di lavori nei quali è stata sfruttata la cicloadizione azide-alchino rame(I) mediata per la sintesi di sistemi densamente glicosilati, come ad esempio *glycoclusters*,³⁵ glicodendrimeri³⁶ e glicopolimeri³⁷ (Schema 4).



Schema 4 Alcuni esempi di *glycoclusters* preparati attraverso la *click chemistry*.



Schema 5 Esempi di glicopolimero (sinistra) e glicodendrimerico (destra).

1.6 Bibliografia

1. a) Mammen M.; Choi S.-K.; Whitesides G. M. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1998**, 37, 2755. b) Mulder A.; Huskens J.; Reinhoudt D. N. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 3409.

2. a) Collins B. E.; Paulson J. C. *Current Opinion in chemical Biology*, **2004**, 8, 617. b) Williams S. J.; Davies G. J. *TRENDS in Biotechnology*, **2001**, 9, 356.
3. Badjic J. D.; Nelson A.; Cantrill S. J.; Turnbull W. B.; Stoddart J. F. *Acc. Chem. Res.*, **2005**, 38, 723.
4. a) Lees W. J.; Spaltenstein A.; Kingery W. J. E.; Whitesides G. M. *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 3419. b) Mammen M.; Dahmann G.; Whitesides G. M. *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 4179.
5. Lis H., Sharon N. *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 637.
6. Connors K. A. *Binding Costants: The Measurement of Molecular Complex Stability*, **1987**, Wiley, New York.
7. a) Koshland D. E.; Neet K. *Annu. Rev. Biochem.*, **1968**, 37, 359. b) Perlmutter-Hayman B. *Acc. Chem. Res.*, **1986**, 19, 90.
8. Ercolani G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 16097.
9. Schoen A.; Freire E. *Biochemistry*, **1989**, 28, 5019.
10. Blokzijl W.; Engberts J. B. F. N. *Angew. Chem.*, **1993**, 105, 1610; *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1993**, 32, 1545.
11. a) Dower S. K.; DeLisi C.; Titus J. A.; Segal D. M. *Biochemistry*, **1981**, 20, 6326. b) Engelhardt W.; Gorczytza H.; Butterweek A.; Moenkemann H.; Frey J. *Eur. J. Immunol.*, **1991**, 21, 2227.
12. a) Varki A. *J. Clin. Invest.*, **1997**, 99, 158. b) Lowe J. B.; Ward P. A. *J. Clin. Invest.*, **1997**, 99, 822.
13. Kuberan, B.; Linhardt, R. J. *Curr. Org. Chem.* **2000**, 4, 653; Lesinki, G. B.; Smithson, S. L.; Srivastava, N.; Chen, D.; Widera, G.; Westerink, M. A. J. *Vaccine* **2001**, 19, 1717; Abdallah, Z.; Doisneau, G.; Beau, J.-M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5209-5212; Rich, R.; Bundle, D. R. *Org. Lett.* **2004**, 6, 897; Ress, D. K.; Baytas, S. N.; Wang, Q.; Muñoz, E. M.; Tokuzoki, K.; Tomijama, H.; Linhardt, R. J. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 8197; Werz, D. B.; Seeberger, P. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6315; Wu, X.; Bundle, D. R. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 7381.
14. a) *Essentials of Glycobiology*, Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Plainview, 1999; b) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L.; *Science* **2001**, 291, 2357.
15. Kocourek J. *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*, Liener I. E., Sharon N., Goldstein I. J., Eds: Academic Press, Inc: Orlando, **1986**, 1.

16. a) Cambillau C. *Glycoproteins I*, Montreuil J., Schachter H., Vliegenthart J. F. G., Eds: Elsevier Science B. V.: Amsterdam, **1995**, 29. b) Sharon N.; Lis H. *Chem. Brit.*, **1990**, 26, 679.
17. Quioco F. A., *Biochem. Soc. Trans.*, **1993**, 21, 442.
18. a) Wright C. S. *J. Mol. Biol.*, **1990**, 215, 635. b) Sharon N. *Trends Biochem. Sci.*, **1993**, 18, 221.
19. a) Loris R.; Stas P. P. G. ; Wyns L. *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 26722. b) Lemieux R. U. *Acc. Chem. Res.*, **1996**, 29, 373.
20. (a) Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 322. (b) Lee, R. T.; Lee, Y. C. *Glycoconjugate J.* **2000**, 17, 543. (c) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 555. (d) Lindhorst, T. K. *Top. Curr. Chem.* **2002**, 218, 201. (e) Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, 90, 231. (f) Cloninger, M. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 742.
21. (a) Fulton, D. A.; Stoddart, J. F. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8309. (b) Liu, B.; Roy, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **2001**, 773. (c) Woller, E. K.; Cloninger, M. J. *Org. Lett.* **2002**, 4, 7. (d) Ortega-Caballero, F.; Giménez-Martínez, J. J.; Vargas-Berenguel, A. *Org. Lett.* **2003**, 5, 2389. (e) Sansone, F.; Chierici, E.; Casnati, A.; Ungaro, R. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 1802. (f) Autar, R.; Khan, A. S.; Schad, M.; Hacker, J.; Liskamp, R. M. J.; Pieters, R. J. *ChemBioChem* **2003**, 4, 1317. (g) Choudhury, A. K.; Kitaoka, M.; Hayashi, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2462. (h) Barrientos, A. G.; de la Fuente, J. M.; Rojas, T. C.; Fernández, A.; Penadés, S. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 1909. (i) Woller, E. K.; Walter, E. D.; Morgan, J. R.; Singel, D. J.; Cloninger, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8820. (l) Kalovidouris, S. A.; Blixt, O.; Nelson, A.; Vidal, S.; Turnbull, W. B.; Paulson, J. C.; Stoddart, J. F. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 8485. (m) Sato, K.; Hada, N.; Takeda, T. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 9331. (n) Roy, R.; Kim, J. M. *Tetrahedron* **2003**, 59, 3881. (o) Consoli, G. M. L.; Cunsolo, F.; Geraci, C.; Sgarlata, V. *Org. Lett.* **2004**, 6, 4163. (p) Li, H.; Wang, L.-X. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 483. (q) Kleinert, M.; Röchendorf, N.; Lindhorst, T. K. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3931. (r) Renaudet, O.; Dumy, P. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 65. (s) Grandjean, C.; Santraine, V.; Fardel, N.; Polidori, A.; Pucci, B.; Gras-Masse, H.; Bonnet, D. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 3451. (t) Amaya, T.; Tanaka, H.; Takahashi, T. *Synlett* **2004**, 503. (u) Singh, Y.; Reneaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. *Org. Lett.* **2005**, 7, 1359. (v) Westermann, B.; Dörner, S. *Chem. Commun.* **2005**, 2116. (z) Srivastava, A.; Ghorai, S.; Bhattacharjya, A.; Bhattacharya, S. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 6574. (aa) Schädel, U.; Sansone, F.; Casnati, A.; Ungaro, R. *Tetrahedron* **2005**, 61, 1149. (ab) Lee, N.-Y.; Jang, W.-J.; Yu, S.-H.; Im, J.;

- Chung, S.-K. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6063. (ac) Rele, S. M.; Cui, W.; Wang, L.; Hou, S.; Barr-Zarse, G.; Tatton, D.; Gnanou, Y.; Esko, J. D.; Chaikof, E. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10132. (ad) Xue, J.; Zhu, J.; Marchant, R. E.; Guo, Z. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3753. (ae) Walter, M.; Wiegand, M.; Lindhorst, T. K. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 719. (af) Virta, P.; Karskela, M.; Lönnberg, H. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1989.
22. a) Bhattacharyya, L.; Brewer, C. F. *Eur. J. Biochem.*, **1989**, *178*, 721. b) Bhattacharyya, L.; Ceccarini, C.; Lorenzoni, P.; Brewer C. F. *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 1288. c) Bhattacharyya, L.; Haraldsson, M.; Brewer C. F. *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 1294.
23. Kitov P. I.; Sadowska J. M.; Mulvey G.; Armstrong G. D.; Ling H.; Pannu N. S.; Read R. J.; Bundle D. R. *Nature*, **2000**, *403*, 669.
24. Fulton D. A.; Cantrill S. J.; Stoddart J. F. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 7968.
25. Ling H.; Boodhoo A.; Hazes B.; Cummings M. D.; Armstrong G. D.; Brunton J. L.; Read R. *J. Biochemistry*, **1998**, *37*, 1777.
26. McCoy J. P.; Jr; Varani J.; Goldstein I. J. *Cell Res.*, **1983**, *151*, 96.
27. Everett D. H. *Basic Principles of Colloid Science*, Royal Society of Chemistry: London 1988; Chapter 3.
28. Kolb H. C.; Finn M. G.; Sharpless K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2004.
29. a) Huisgen, R. in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*; Padwa, A., Ed.; Wiley: New York, 1984; pp 1-176. b) Padwa, A. in *Comprehensive Organic Synthesis*; Trost, B. M., Ed.; Pergamon: Oxford, 1991; Vol. 4, pp 1069-1109. c) Fan, W.-Q.; Katritzky, A. R. in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*; Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; Scriven, E. F. V., Eds.; Pergamon: Oxford, 1996; Vol. 4, pp 101-126
30. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
31. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
32. Himo F.; Lovell T.; Rostovtsev V.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Noodleman L. Unpublished.
33. Doyle M. P.; McKervey M. A.; Ye T. in *Modern Catalytic Methods for Organic Synthesis with Diazo Compounds*, Wiley, New York, **1997**, 163.
34. Dondoni A. *Chem. Asian J.*, **2007**, *2*, 700.
35. a) Pérez-Balderas F.; Ortega-Munos M.; Morales-Sanfrutos J.; Hernández-Mateo F.; Calvo-Flores F. G.; Calvo-Asín J. A.; Isac-García J.; Santoyo-González F. *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 1951. b) Chen Q.; Yang F.; Du Y. *Carbohydr. Res.*, **2005**, *340*, 2476. c) Chittaboina S.; Xie

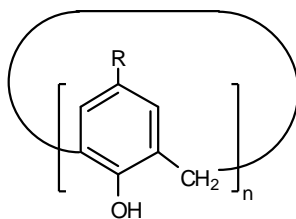
- F.; Wang Q. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 2331. d) Dondoni A.; Marra A. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 7546.
36. a) Joosten J. A. F.; Tholen N. T. H.; Ait El Maate F.; Brouwer A. J.; van Esse G. W.; Rijkers D. T. S.; Liskamp R. M. J.; Pieters R. J. *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 3182. b) Fernandez-Megia E.; Correa J.; Rodriguez-Meizoso I.; Riguera R. *Macromolecules*, **2006**, *39*, 2113.
37. Ladmiral V.; Mantovani G.; Clarkson G. J.; Cauet S.; Irwin J. L.; Haddleton D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4823.

CAPITOLO 2: I CALIXARENI



2.1 Le origini

I calixareni (**1**), ottenuti dalla condensazione di formaldeide e fenoli, sono una classe di ciclo-oligomeri costituiti da 4-8 unità fenoliche legate attraverso ponti metilenici in modo da formare una cavità toroidale simile a quella delle ciclodestrine (Figura 1).¹



1 R = H, *terz*-butile, ...

Figura 1

La prima reazione tra formaldeide e fenoli è stata effettuata più di un secolo fa nei laboratori del Prof. Adolf von Bayer. Infatti nel 1872 il noto chimico tedesco, premio Nobel per la chimica nel 1905, pubblicò due brevi lavori² dove descrisse come la formaldeide reagisse in presenza di acidi

con il fenolo molto più di altre aldeidi, producendo delle resine polimeriche. Bayer non riuscì ad isolare un prodotto puro da questa reazione, ma senza dubbio è colui che ha dato inizio a questo tipo di chimica.

Trent'anni dopo Leo Baekland, modificando in vari modi il processo descritto da Bayer, riuscì ad ottenere una resina chiamata Bakelite, prodotto brevettato nel 1908.³ A partire dal 1942 invece Alois Zinke, professore di chimica all'Università di Graz in Austria, diede un contributo fondamentale alla scoperta dei calixareni;⁴ insieme al suo collaboratore Erich Ziegler decise di semplificare il processo utilizzando per la reazione di condensazione dei fenoli *para*-sostituiti. I fenoli, infatti, dal canto loro reagiscono sia in posizione *orto* che in posizione *para* formando polimeri ramificati, nei quali ogni unità di fenolo è legata ad altri tre residui fenolici (Figura 2).

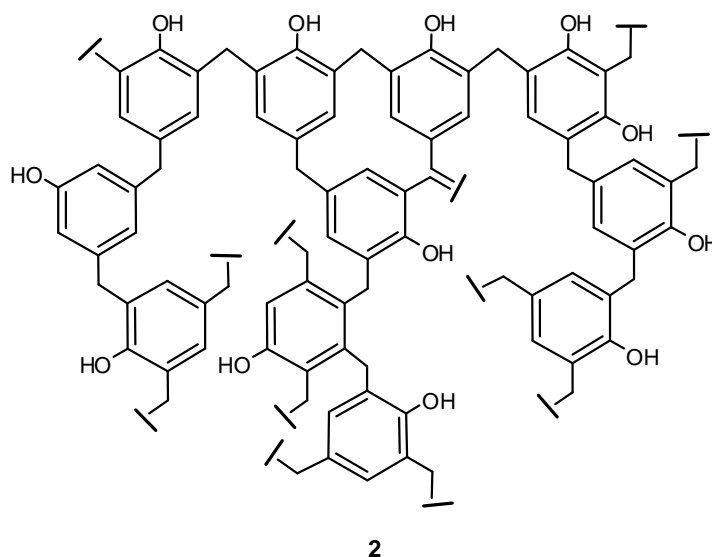


Figura 2

I *p*-alchilfenoli invece possono reagire solo con le due posizioni *orto*, rendendo così minimo l'indice di ramificazione e formando essenzialmente polimeri lineari (Figura 3).

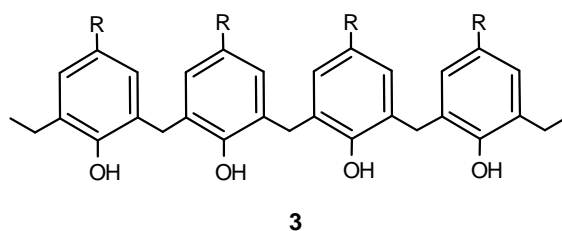
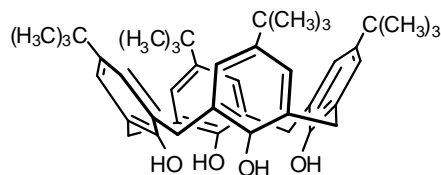


Figura 3

Per condensazione tra *p-tert*-butilfenolo e formaldeide in ambiente basico, Zinke ottenne un prodotto cristallino con alto punto di fusione (314 °C), al quale venne assegnata una struttura ciclica tetramerica **4** (Figura 4); questi composti vennero classificati come $[1_n]$ metaciclofani, dove n è il numero di anelli aromatici. Negli anni successivi vennero pubblicati vari esempi di

condensazione tra formaldeide e diversi *p*-alchilfenoli (*p*-fenilfenolo, *p*-cicloesilfenolo e *p*-benzilfenolo).⁵



4

Figura 4

Durante gli anni '50 due chimici di Birmingham, Hayes e Hunter,⁶ misero a punto la sintesi di un tetramero ciclico a partire dal *p*-cresolo, attraverso una diversa procedura sintetica che prevedeva 10 passaggi, ottenendo così un prodotto simile a quello di Zinke.

Successivamente Hermann Kammerer, dell'Università di Mainz, studiò in modo più esauriente la caratterizzazione di questi composti,⁷ arrivando ad affermare sulla base di evidenze sperimentali, che i prodotti ottenuti dai suoi predecessori erano sì ciclici, ma ottameri, tesi confermata dalla struttura ottenuta dagli studi di rifrattometria a raggi X.⁸ Questa scoperta del 1972 risolveva una volta per tutte alcune discrepanze presenti in letteratura fino a quel momento.

Il nome di calixarene fu proposto nel 1975 dal Prof. C. David Gutsche, il quale nei laboratori del dipartimento di chimica dell'Università di Washington aveva intrapreso lo studio di questi oligomeri ciclici come potenziali mimetici enzimatici. Il nome deriva dal greco *calix* (καλυξ), ovvero calice, per la loro somiglianza ad un vaso, ed *arene*, per indicare gli anelli aromatici che formano le pareti della struttura (figura 5).



Figura 5

Inoltre ulteriori ricerche condotte dal gruppo del Prof. Gutsche,¹ mostrarono che cambiando opportunamente solvente, tipo di base utilizzata e rapporto tra i reagenti, si poteva ottenere

selettivamente il tetramero, l'esamero o l'ottamero ciclico facilmente ed in buona resa. Questi tre composti sono fra i più accessibili anche al giorno d'oggi, anche se il calixarene di gran lunga più impiegato è quello con quattro unità fenoliche (figura 4), chiamato pertanto calix[4]arene.

2.2 Conformazione dei Calix[4]areni

I cali[4]areni presentano nella loro struttura delle porzioni distinte, indicate come bordo superiore (*upper rim*), bordo inferiore (*lower rim*) e cavità centrale (*central annulus*) come mostra la figura 6.

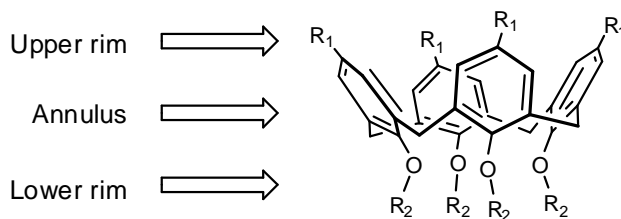


Figura 6

La loro struttura tridimensionale, la possibilità di essere facilmente funzionalizzati sia al bordo inferiore che a quello superiore, la loro flessibilità conformazionale e la presenza della cavità centrale che conferisce loro proprietà complessanti, spiegano l'ampio studio e utilizzo di queste molecole. Infatti esiste una vasta serie di libri e *reviews* nei quali vengono discussi esaurientemente le singolari proprietà dei cali[4]areni e il loro impiego nel campo del riconoscimento e inclusione di ioni inorganici,⁹ organici¹⁰ e molecole neutre.¹¹

Uno degli aspetti più affascinanti è che i calix[4]areni possono assumere differenti conformazioni grazie alla libertà rotazionale del ponte metilenico Ar-CH₂-Ar, e possono così esistere in quattro conformazioni limite, suggerite da Cornforth e successivamente confermate da Gutsche,¹² dette a cono, cono parziale, 1,2-alternata e 1,3-alternata (Figura 7).

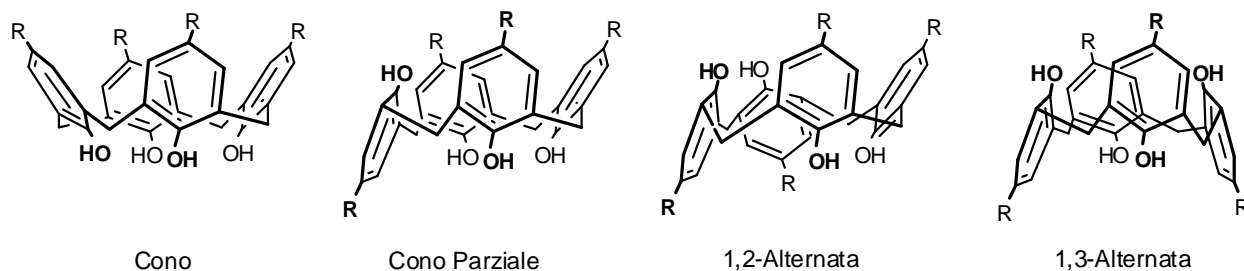


Figura 7

La struttura ottenuta mediante studi di rifrattometria a raggi X del *p-terz*-butilcalix[4]arene,¹³ dimostra che allo stato solido esiste la conformazione a cono, dove i quattro gruppi idrossilici si trovano tutti dalla stessa parte, e formano fra di loro dei legami ad idrogeno che stabilizzano la conformazione. In soluzione però tutti i calixareni con i gruppi OH liberi, compresi i calix[4]areni, sono in equilibrio fra le quattro conformazioni limite. Lo spettro H¹-NMR relativamente ai protoni

dei gruppi metilenici a ponte, mostra a 20 °C due doppietti distinti, e ad alta temperatura (60 °C) un singoletto; questo tipo di comportamento è stato attribuito proprio al fatto che la conformazione a cono interconverte lentamente a bassa temperatura, ma rapidamente ad alta temperatura. Sulla base dello spettro NOE il gruppo di ricerca del Prof. Ungaro,¹⁴ ha assegnato il doppietto a campi più alti al protone in posizione equatoriale (più vicino agli anelli aromatici) e quello a campi più bassi al protone in posizione assiale (più vicino ai gruppi OH).

L'interconversione conformazionale nel calix[4]arene procede attraverso la rotazione dell'anello aromatico che porta il gruppo OH a passare all'interno della cavità anulare,¹⁵ e l'energia di attivazione di questo processo è di circa 13-15 kcal/mol a seconda del solvente; infatti in solventi basici i legami di idrogeno intramolecolari tra gli ossidrili vengono indeboliti, aumentando la libertà rotazionale degli anelli. Quindi è possibile bloccare il calix[4]arene in una delle sue conformazioni limite semplicemente funzionalizzando in modo opportuno gli ossidrili fenolici; è stato dimostrato che sono necessarie quattro catene di atomi lunghe almeno tre atomi ciascuna, il gruppo *n*-propile è dunque il più piccolo che soddisfi questo requisito.¹⁶ Variando opportunamente la base utilizzata per l'alchilazione si può bloccare il calix[4]arene in una delle quattro conformazioni limite: in presenza di una base forte contenente il catione sodio ad esempio, si ottiene esclusivamente il conformero a cono, in quanto questa conformazione è favorita da tutti quei fattori che aumentano la velocità di funzionalizzazione, o che possono ridurre la velocità di inversione degli anelli.

L'attribuzione della conformazione ottenuta dopo l'alchilazione può essere facilmente individuata mediante spettroscopia NMR, sia al protone che al ¹³C. Nello spettro H¹-NMR risultano diagnostici, come già detto, i segnali relativi ai protoni metilenici del ponte. Nel caso due anelli aromatici vicini siano orientati *sin* uno rispetto all'altro, i due protoni del metilene a ponte, l'assiale (H_{ax}) e l'equatoriale (H_{eq}), risentono in modo diverso dell'anisotropia del campo magnetico generata dalla vicinanza della nuvola elettronica π (figura 8). Dei due, H_{ax} risuona a δ = 4.0-4.5, mentre H_{eq}, più vicino alla zona di schermo, viene spostato a δ = 3.0-3.3; ne deriva un tipico sistema "dd" con accoppiamento geminale (*J* = 12.0-14.0).¹⁷ Quando invece i due nuclei aromatici sono orientati *anti*, la distinzione tra i due protoni si perde ed il segnale osservato è un unico singoletto relativo ad entrambi con δ ~ 3-4. Nello spettro ¹³C-NMR si osservano assorbimenti del carbonio del metilene a δ ~ 31-33 nel caso di orientazione *sin* e a δ ~ 37-39 per orientazione *anti*.¹⁸

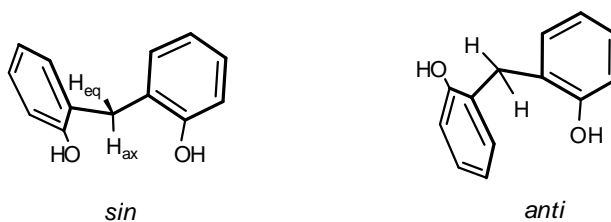


Figura 8

E' importante tenere conto del fatto che, comunque, anche nella conformazione “bloccata” a cono da quattro catene alchiliche al bordo inferiore, il calix[4]arene continua a possedere una residua mobilità conformazionale. Considerando per semplicità il calixarene generico rappresentato in figura 6, con i quattro anelli aromatici ugualmente sostituiti, la struttura caratterizzata da una simmetria di tipo C_{4v} , dedotta mediante spettroscopia H^1 -NMR a temperatura ambiente, è di fatto una situazione media. In realtà infatti, il calixarene, attraverso di essa, interconverte rapidamente, passando da una struttura a simmetria C_{2v} , ad un'altra di uguale simmetria (figura 9);¹⁹ entrambe sono definite conformazioni a cono appiattito.

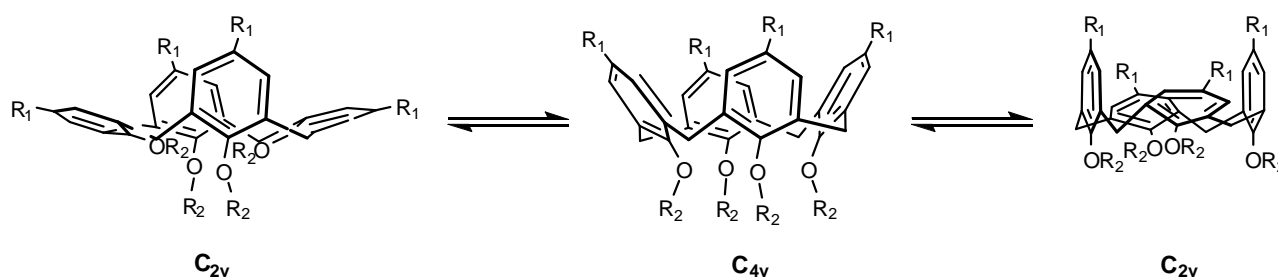


Figura 9

Tutto questo può avere degli effetti sulle capacità complessanti dei calixareni, dal momento che questi equilibri, in qualche modo, riducono la disponibilità della cavità ed il grado di preorganizzazione del macrociclo.

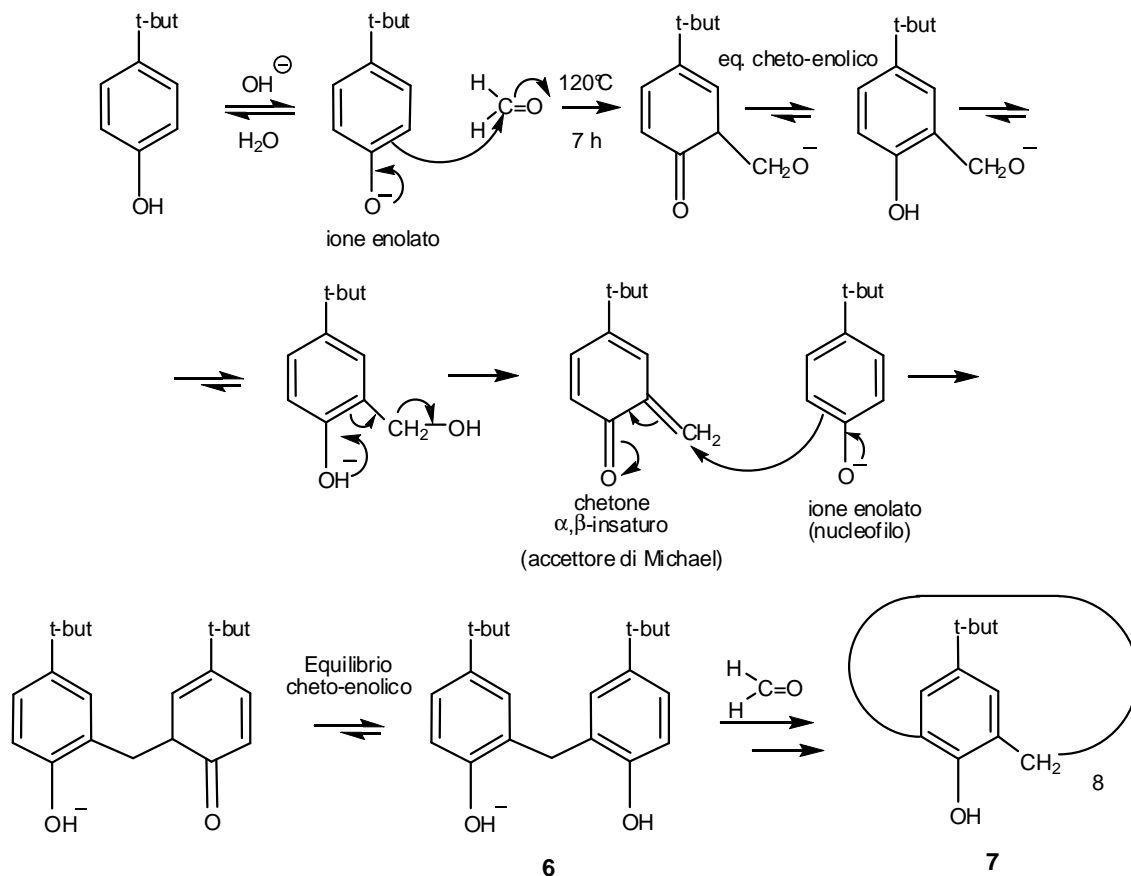
2.3 Sintesi dei Calix[4]areni

Per molti anni la preparazione del prodotto **4** (figura 4) rimase un evento fortuito. Infatti la reazione di oligomerizzazione tra *p-terz*-butilfenolo e formaldeide, presumibilmente condotta nelle stesse condizioni sperimentali, portava solo in alcuni casi al prodotto desiderato con resa soddisfacente, ma non dava nessun risultato in altri. La ragione di questa variabilità rimaneva un mistero.

La procedura originariamente formulata da Zinke e modificata poi da Cornorth e Gutsche¹ prevedeva la reazione ad alta temperatura in presenza di idrossido di sodio (0.045 eq.) tra *p-terz*-butilfenolo e una soluzione commerciale di formaldeide in acqua, a dare una pasta viscosa chiamata “precursore”. Il “precursore” veniva riscaldato a 260 °C in difenil etere per diverse ore, raffreddato e il solido recuperato per filtrazione. Per semplice cristallizzazione da toluene si otteneva quindi il

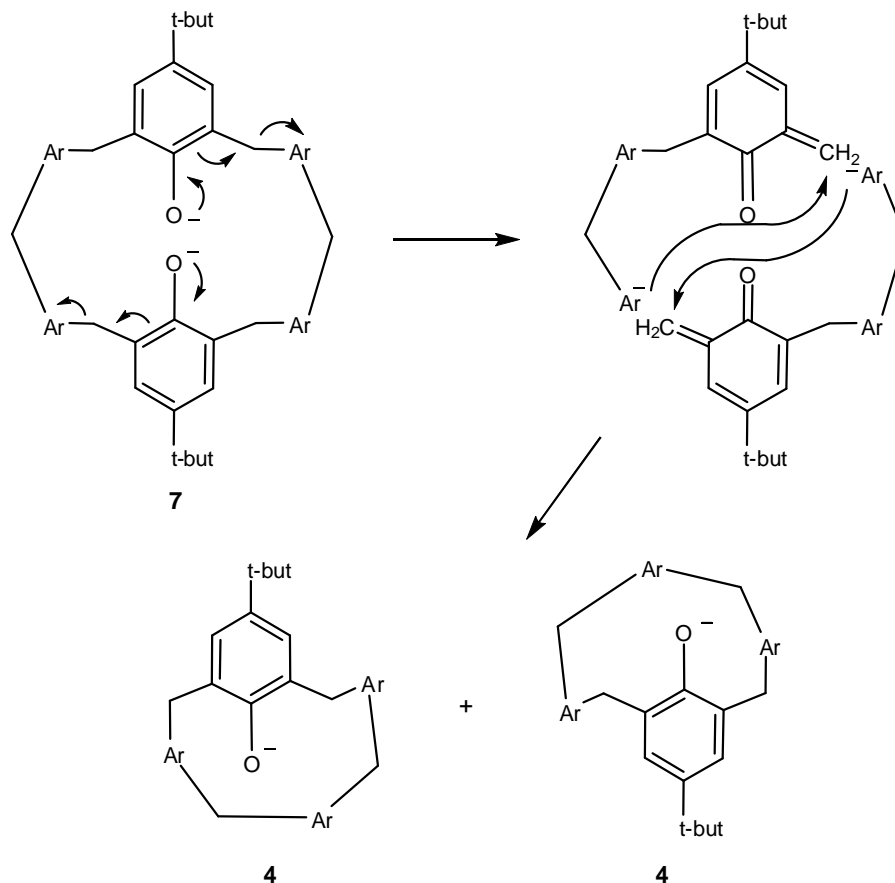
prodotto **4**. Nella procedura proposta da Zinke veniva eseguita una neutralizzazione del cosiddetto “precursore” prima del successivo riscaldamento, non considerando che alcuni ioni di sodio erano comunque trattenuti dalle unità fenoliche della miscela, con il risultato di avere nel passaggio termico una quantità non certa di base all’interno dell’ambiente di reazione. Successivi studi¹ sull’influenza della variazione della quantità di base utilizzata nella reazione hanno dimostrato che esiste una quantità di base ottimale per la produzione di **4** (vedi figura 9), e che la resa del prodotto è massima quando l’intervallo è compreso fra 0.03-0.04 equivalenti rispetto al fenolo. Con una quantità minore infatti la resa di **4** decresce repentinamente fino a zero; con più base di nuovo vediamo decrescere la resa di **4**, ma allo stesso tempo aumenta quella del calix[6]arene **5**. Quando la quantità di base è di 0.3 eq. o più, **5** è essenzialmente l’unico prodotto ottenuto. E’ stato così possibile comprendere che la variabilità dei risultati ottenuti fino a quel momento dipendevano dalla diversa concentrazione di base che si aveva nella reazione.

In particolare il meccanismo della reazione prevede la formazione dello ione fenossido che, agendo come un carbonio nucleofilo, effettua un attacco nucleofilo sul gruppo carbonile della formaldeide (schema 1). A temperatura ambiente la reazione si ferma alla formazione dell’idrossimetil fenolo, mentre ad alta temperatura la reazione procede dando il composto **6**, che continuando il processo porta alla formazione del *p*-*terz*-butilcalix[8]arene **7**, ovvero il misterioso “precursore” citato prima.



Schema 1

Il *p-terz-butilcalix[8]arene* **4** è ottenuto attraverso il riscaldamento prolungato di **7** in presenza di basi; in queste condizioni si ha un processo, come definisce Gutsche,¹ di “mitosi molecolare”, nel quale l’ottamero ciclico si divide proprio come una cellula generando due molecole di tetramero ciclico con il meccanismo mostrato nello schema 2.



Schema 2

Il calix[4]arene **4** (Schema 2) attualmente è un prodotto commerciale, ma il suo alto costo ci ha indotto a prepararlo seguendo il metodo descritto²⁰ che può essere riprodotto in laboratorio anche in larga scala.

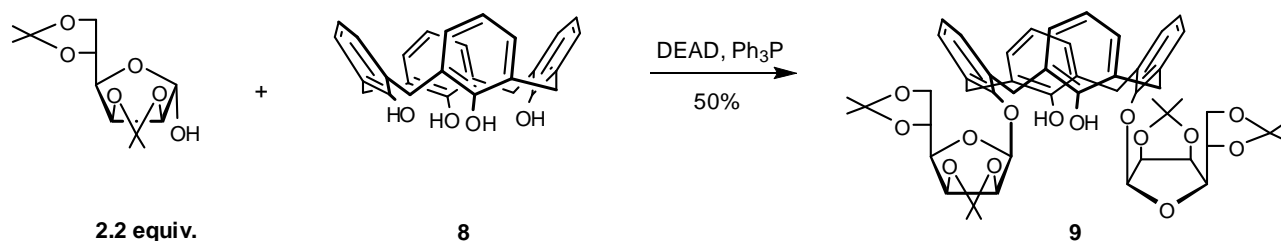
2.4 Calixareni come *scaffold* multivalenti

I calix[*n*]areni,⁸ grazie alla loro natura oligomerica ed alla loro forma, che può essere controllata attraverso l’ampiezza del macrociclo o variando i sostituenti al bordo inferiore, sono stati ampiamente utilizzati come *scaffold* per la sintesi di sistemi multivalenti.²¹ Inoltre, sono specie chimiche molto stabili, la loro valenza può essere facilmente cambiata almeno da 1 a 8, e presentano una struttura tridimensionale che può essere predeterminata e che consente di legare facilmente gruppi funzionali sia al bordo inferiore che superiore. Infine l’orientamento

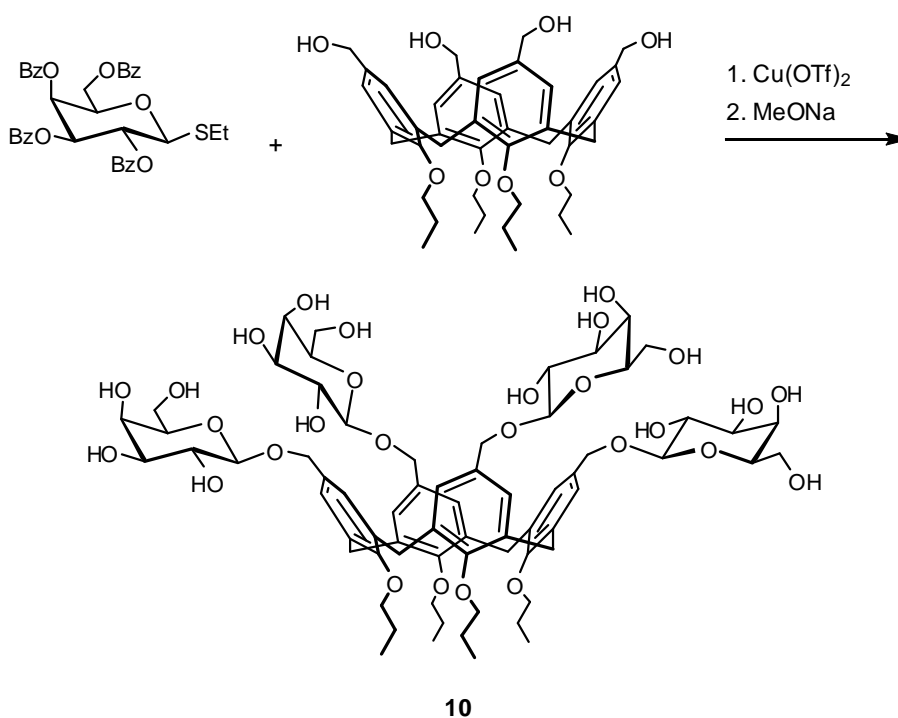
stereochimico dei ligandi può essere opportunamente modulato costringendo per esempio il calix[4]arene in una delle sue conformazioni limite.

Recentemente in questo ambito sono stati ottenuti interessanti risultati nella realizzazione di calix[4]areni funzionalizzati con molecole di interesse biologico, come gli zuccheri e gli aminoacidi.^{21,22}

In particolare negli ultimi 15 anni sono stati sintetizzati sistemi densamente glicosilati basati su una struttura di tipo calixarenico utilizzando varie strategie sintetiche, e in molti casi sono state mostrate le possibili applicazioni. Il primo esempio di calixareni di zuccheri è stato pubblicato nel 1994 dal gruppo del Prof. Dondoni e del Prof. Ungaro.²³ In particolare sono stati sintetizzati derivati funzionalizzati con glicosidi al bordo inferiore, sfruttando la reazione di Mitsunobu, (Schema 3), e, per glicosidazione, al bordo superiore (Schema 4), ottenendo così il primo derivato calixarenico (composto **10**) solubile in acqua.



Schema 3



Schema 4

Negli anni successivi sono stati sintetizzati altri esempi di calixareni *O*-glicosidici, applicando diversi tipi di metodologie sintetiche (Figura 10).²⁴

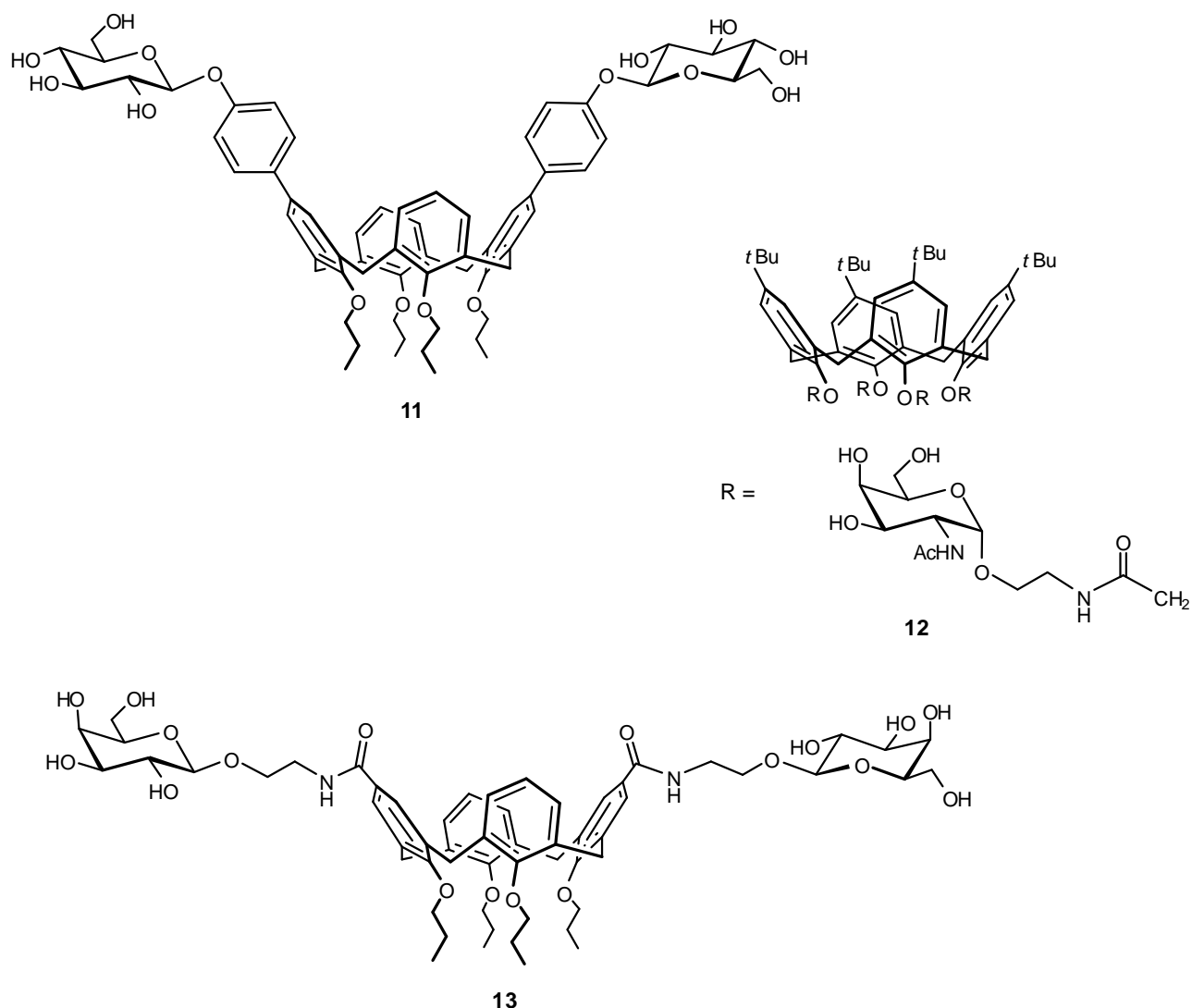


Figura 10: Alcuni esempi di calix[4]areni *O*-glicosidici.

Negli stessi anni sono stati pubblicati anche diversi esempi di calixareni *N*-glicosilati,²⁵ dove comunemente viene sfruttato come braccio spaziatore una tiourea, ottenuta dalla condensazione fra di- e tetraamino calixareni e glicosil-isotiocianati, o viceversa fra i calixareni isotiocianati e amminoglicosidi (Figura 11 e 12).

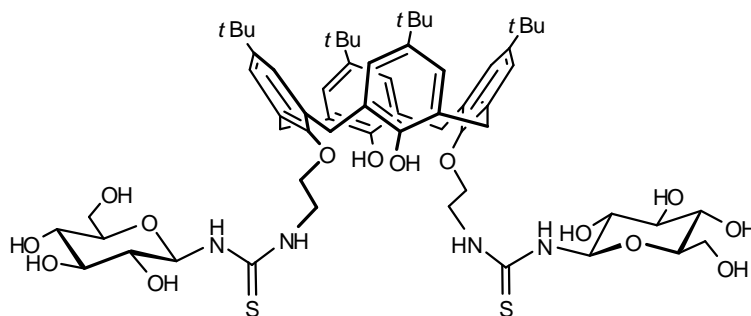


Figura 11: Esempio di *N*-glicosil calixarene funzionalizzato al bordo inferiore.

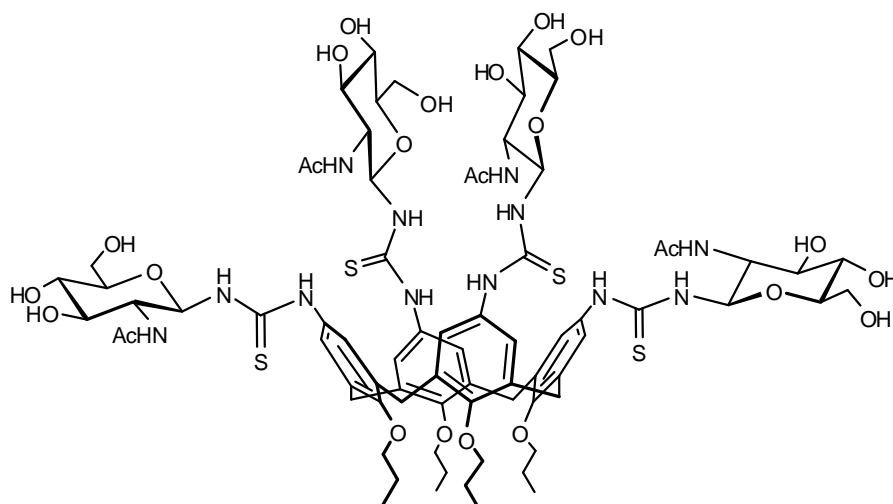


Figura 12: Esempio di *N*-glicosil calixarene funzionalizzato al bordo superiore.

La notevole suscettibilità all'idrolisi chimica ed enzimatica del legame *O*- ed *N*-glicosidico costituisce un grave limite, in quanto riduce enormemente le potenziali applicazioni di *clusters* di zuccheri naturali. Per questo motivo da tempo si sono sviluppate strategie sintetiche per ottenere calixareni *C*- ed *S*-glicosilati (Figura 13).²⁶ Infatti la capacità degli *S*-glicosidi (tioglicosidi) o dei *C*-glicosidi di simulare dimensioni e attività biologica dei corrispondenti *O*-glicosidi, e quindi di rappresentarne dei bioisosteri, unita alla loro grande stabilità nei confronti dell'idrolisi chimica ed enzimatica permette di sintetizzare analoghi di carboidrati naturali dotati di una maggiore durata di azione nell' organismo.

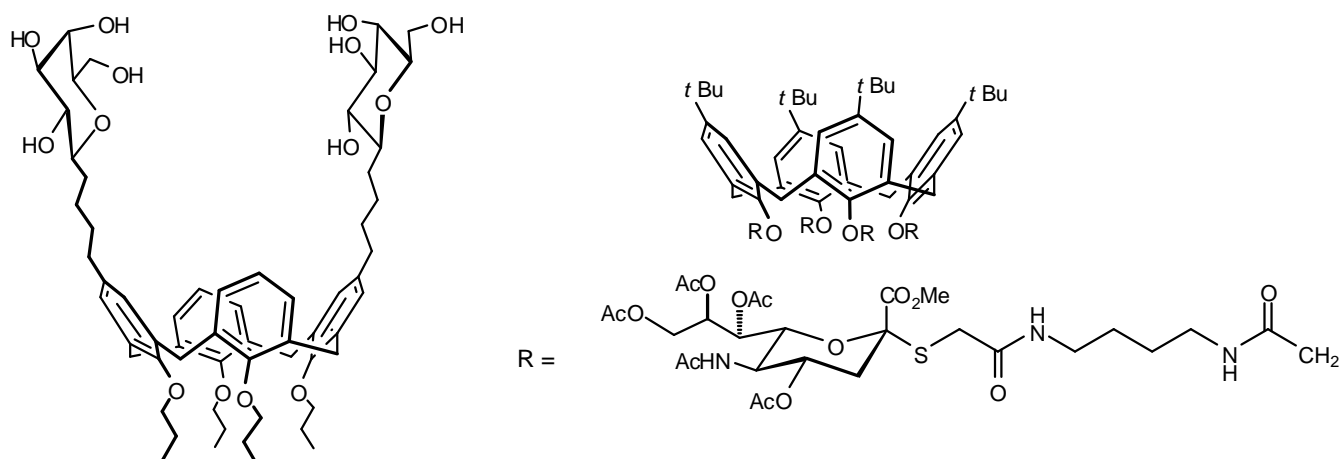


Figura 13: Esempio di *C*-glicosil calixarene (destra) e *S*-glicosil calixarene (sinistra).

Questi esempi sono degni nota in quanto rappresentano i primi tentativi per ottenere calixareni di zuccheri più stabili, anche se talvolta le rese di queste reazioni e la loro versatilità non sono poi così eccezionali. Un notevole passo avanti è stato fatto applicando a questi sistemi la cicloadizione rame(I) catalizzata tra un'azide ed un alchino, nota come primo esempio di *click chemistry*.²⁷ Con questa strategia infatti sono stati sintetizzati *clusters* glicosidici a base calixarenica con rese molto

alte, fino al 90% (Figura 14). Grazie all'alto grado di efficienza e compatibilità, questa strategia sintetica rappresenta la via preferenziale per l'ottenimento di sempre nuovi *clusters* di zuccheri.

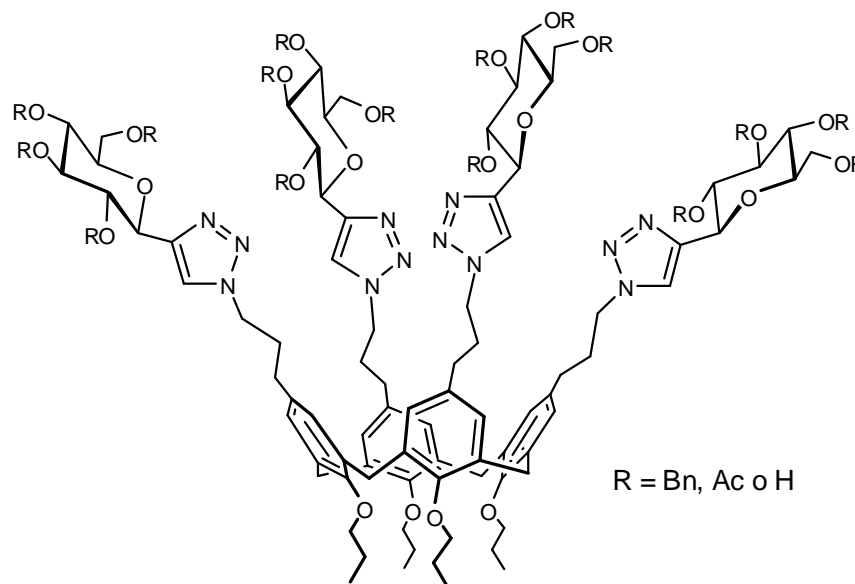


Figura 14

Sempre con l'obiettivo di sintetizzare glicoconiugati multivalenti molto stabili recentemente è stata pubblicata una nuova strategia per l'ottenimento di calixareni C-glicosidi nei quali il braccio spaziatore è costituito da un anello tetrazolico.²⁸ In questo caso è stata utilizzata la procedura messa a punto dal Prof. Sharpless e dal Prof. Demko che prevede in primo luogo la cicloadizione 1,3-dipolare fra un'azide organica ed il *p*-toluensolfonilnitrile e la successiva sostituzione nucleofila, ottenendo così clusters glicosidici legati attraverso un tetrazolo 1,5 disostituito (Figura 15).

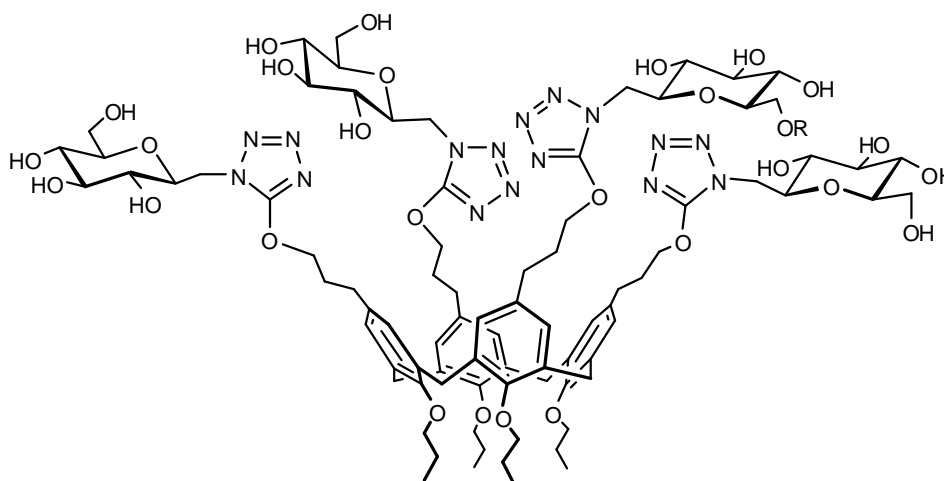
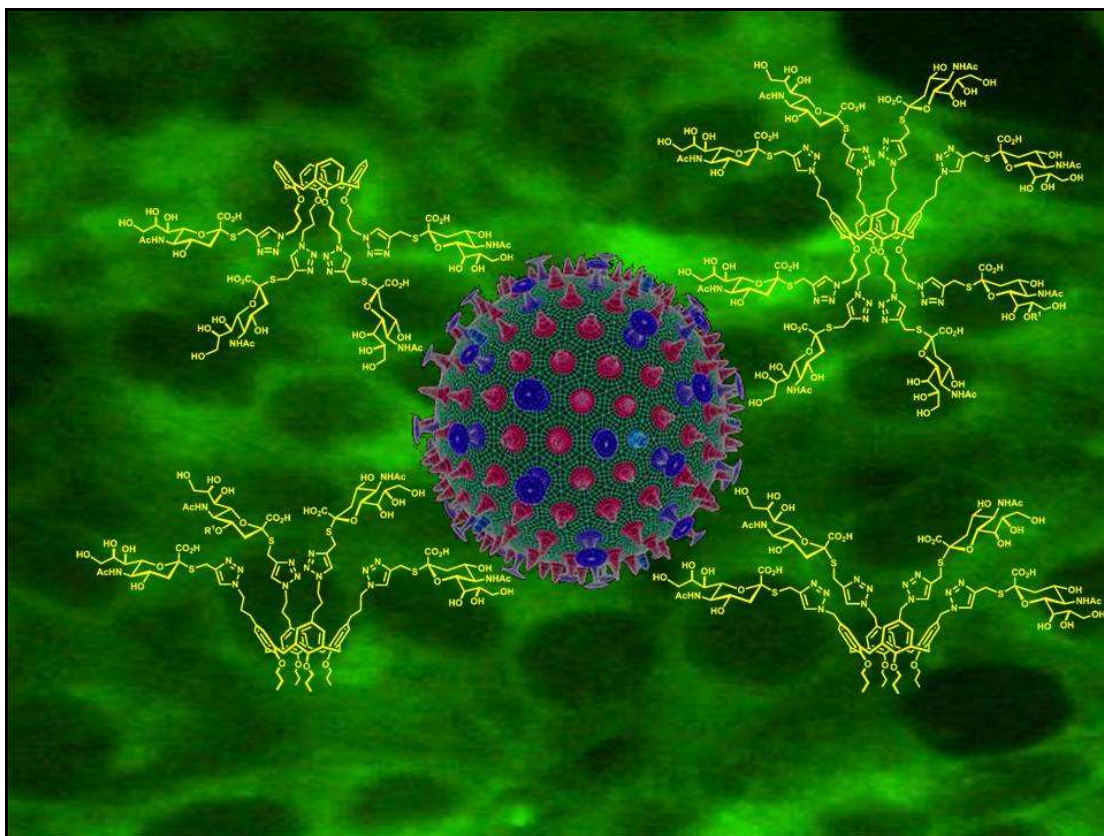


Figura 15

2.5 Bibliografia

1. a) Gutsche C. D. *Calixarenes, Monograph in Supramolecular Chemistry, Vol. 1*; (Ed.: J. F. Stoddart), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1989. b) Böhmer A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 713. c) Shinkai S.; Takeshita M. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1995**, *68*, 1088. d) Gutsche C. D. *Aldrichimca Acta* **1995**, *28*, 3. e) Ikeda A.; Shinkai S. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1713. f) Gutsche C. D. *Calixarenes Revisited*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998.
2. a) Baeyer A. *Ber.*, **1872**, *5*, 25 b) Baeyer A. *Ber.*, **1872**, *5*, 280 c) Baeyer A. *Ber.*, **1872**, *5*, 1094.
3. Baekeland L. H. *U.S. Patent 942,699*; Ottobre 1908.
4. a) Zinke A.; Ziegler E. *Ber.*, **1941**, *B74*, 1729 b) Zinke A.; Ziegler E. *Ber.*, **1944**, *77*, 264.
5. a) Zinke A.; Zigeuner G.; Hossinger K.; Hoffman G. *Monatsh.*, **1948**, *79*, 438 b) Zinke A.; Kretz R.; Leggewie E.; Hossinger K. *Monatsh.*, **1952**, *83*, 1213.
6. a) Hayes B. T.; Hunter R. F. *Chem. Ind.*, **1956**, 193 b) Hayes B. T.; Hunter R. F. *J. Appl. Chem.*, **1958**, 743.
7. a) Kammerer H.; Happel G.; Caesar F. *Makromol. Chem.*, **1972**, *162*, 179 b) Happel G.; Mathiasch B.; Kammerer H. *Makromol. Chem.*, **1975**, *176*, 3317.
8. Gutsche C. D.; Gutsche A. E.; Karaulov A. I. *J. Inclusion Phenom.*, **1985**, *3*, 447.
9. a) Arnaud-Neu F.; Collins E. M.; Deasy M.; Ferguson G.; Harris S. J.; Kaitner B.; Lough A. J.; McKervey M. A.; Marques E.; Ruhl B.; Schwing-Weill M. J.; Seward E. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 8681 b) Schmidtchen F. P.; Berger M. *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 1609 c) Shinkai S.; Ikeda A. *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 1713 d) Moyer B. A. e) Fisher R.; Gorls H.; Walther D. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2004**, 1243 f) Kim. J. S.; Quang D. T. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 3780.
10. a) Kikuchi Y.; Kobayashi K.; Aoyama Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 6063 b) Casnati A.; Fabbi M.; Pelizzi N.; Pochini A.; Sansone F.; Ungano R.; Di Modugno E.; Tarzia G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 2699 c) Sansone F.; Casnati A.; Ungano R. *Acc. Chem. Res.*, **2003**, *36*, 246 d) Oshima T.; Oishi K.; Ohto K.; Inoue K. *J. Incl. Phen. Macr. Chem.* **2006**, *55*, 79.
11. a) Arduini A.; McGregor W. M.; Paganuzzi D.; Pochini A.; Secchi A.; Ugozzoli F.; Ungaro R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2*, **1996**, 843 b) Arduini A.; McGregor W. M.; Pochini A.; Secchi A.; Ugozzoli F.; Ungaro R. *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 6881 c) Zheng Y. S.; Zhang C. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 1189 d) Kobakas E.; Durmaz M.; Alpaydin S.; Sirit A.; Yilmaz M. *Chirality*, **2008**, *20*, 26.

12. Gutsche, C. D.; Dhawan B.; Levine K. H.; Bauer L. J. *Tetrahedron* **1983**, *39*, 409.
13. a) Andreetti G. D.; Ungaro R.; Pochini A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 1005; b) Andreetti G. D.; Pochini A.; Ungaro R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2*, **1983**, 1773.
14. Arduini A.; Pochini A.; Riverberi S.; Ungaro R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 981.
15. Gutsche, C. D.; Bauer L. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 6063.
16. (a) Araki, K.; Iwamoto, K.; Shinkai, S.; Matsuda, T. *Chem. Lett.* **1989**, 1747; (b) Iwamoto, K.; Araki, K.; Shinkai, S. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 4955.
17. Alfieri C.; Dradi E.; Pochini A.; Ungaro R. *Gazz. Chim. Ital.* **1989**, *119*, 335.
18. Jaime C.; de Mendoza J.; Prados P.; Nieto P. M.; Sanchez C. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 3372.
19. Arduini A.; Fabbi M.; Mantovani M.; Mirone L.; Pochini A.; Secchi A.; Ungaro R. *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 1454.
20. Arduini A.; Casnati A. in *Macrocyclic Synthesis, a Practical Approach*, (Ed.: D. Park), Oxford University Press, Oxford, 1996, pp. 145-173.
21. Baldini L.; Casnati A.; Sansone F.; Ungaro R. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 254.
22. Alcune reviews sull'argomento: a) Fulton D. A.; Stoddart J. F. *Bioconjugate Chem.*, **2001**, *12*, 655 b) Casnati A.; Sansone F.; Ungaro R. *Acc. Chem. Res.*, **2003**, *36*, 246.
23. a) Marra A.; Scherrmann M.-C.; Dondoni A.; Casnati A.; Minari P.; Ungaro R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 2479 b) Dondoni A.; Marra A.; Scherrmann M.-C.; Casnati A.; Sansone, F.; Ungaro R. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1774.
24. a) Félix C.; Parrot-Lopez H.; Kalchenko V.; Coleman A. W.; *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 9171 b) Roy R.; Kim J. M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 369 c) Pérez-Balderas F.; Santoyo-Gonzalez F. *Synlett*, **2001**, 1699 d) Schaedal U.; Sansone F.; Casnati A.; Ungaro R. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 1149.
25. a) Saitz-Barria C.; Torres-Pinedo A.; Santoyo-Gonzales F. *Synlett*, **1999**, 1891 b) Sansone, F.; Chierici E.; Casnati A.; Ungaro R. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1802. c) Consoli G. e coll. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 7467 d) Krenek K. e coll. *Carbohydr. Res.*, **2007**, 342, 1781.
26. a) Dondoni A.; Kleban M.; Marra A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7801 b) Dondoni A.; Kleban M.; Hu X.; Marra A.; Banks H. D. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4722 c) Meunier S. J.; Roy R. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 5469.
27. Dondoni A.; Marra A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7546.
28. Dondoni A.; Marra A. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6339.

CAPITOLO 3: *CLUSTERS* DI ACIDO SIALICO COME INIBITORI VIRALI

3.1 Introduction

Naturally occurring sialic acids constitute a family of more than 50 structurally distinct nine-carbon 3-deoxy-ulosonic acids,¹ the most widespread derivative being 5-*N*-acetyl-neuraminic acid (Neu5Ac, **1**) (Figure 1). These monosaccharides are found at the non-reducing end of glycoconjugates, where they are invariably α -D-linked to a hexopyranose, usually D-galactose or D-galactosamine, or other sialic acid fragments. Due to their peculiar position within cell-surface glycoproteins and glycolipids, sialic acids are exposed to the external environment and involved in numerous physiological and pathological recognition phenomena, including the adhesion of bacteria and viruses to human cells.²

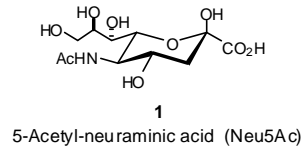


Figure 1. The most common sialic acid found in Nature.

Examples of the latter pathogens are the BK and influenza A viruses. BK virus (BKV) is a human polyomavirus known to be the etiological agent of a severe form of nephropathy, a complication observed in 5-8% of kidney transplants, which often leads to the organ loss.³ The extensive immunosuppressive treatment used to prevent kidney rejection enables a dramatic enhancement of the BKV replication resulting in the polyomavirus associated nephropathy (PVN). However, primary infection by BKV is usually inapparent and only occasionally may be accompanied by mild respiratory illness or urinary tract disease. During primary infection, viremia occurs and the virus spreads to several organs of the infected individual where it remains in a latent state. Virus isolation and Southern blot hybridization analysis established that the kidney is the main site of BKV latency in healthy individuals. By these technical approaches, BKV sequences were also detected in other organs, such as liver, stomach, lungs, parathyroid glands, and lymph nodes.⁴ The detection of BKV DNA in tonsils suggests that the oropharynx may be the initial site of BKV infection.⁵ The PCR technology disclosed BKV DNA and RNA in brain,^{6a,c,d} peripheral blood mononuclear cells,^{6b-d} kidney, bladder, prostate, uterine cervix, vulva, lips, and tongue.⁷ The presence of BKV DNA in both maternal and fetal tissues was also demonstrated by PCR, suggesting transplacental BKV infection.⁸ These results indicate that BK virus can establish latent infection in many more organs and cells than previously thought. This evidence may have important consequences on the routes and mechanisms of virus transmission, as well as on the epidemiology and reactivation of BKV latent infection. Inflammatory syndromes affecting several organs were described after BKV infection or reactivation in both immunosuppressed^{9a-d} and immunocompetent^{9a,b} individuals. Moreover, an association between hemorrhagic cystitis and BKV was shown in immunosuppressed bone marrow transplant recipients^{10a} as well as in immunocompetent people.^{10b} It has been recently demonstrated by one of us that whole BK virus, its complete DNA, and also subgenomic DNA fragments containing the early region, are able to transform embryonic fibroblasts and cells cultured from kidney and brain of hamster, mouse, rat, rabbit and monkey.¹¹ BKV is highly oncogenic in rodents since young or newborn hamsters, mice and rats, inoculated with BKV through different routes, developed tumors.¹¹ However, the role of BKV in human neoplasia is still uncertain.

Although BKV sequences and T antigen (Tag) are detected in several types of human neoplasms, the viral load is generally low, with less than one copy of the viral genome per cell.¹²

Since no reliable drugs against BKV are available to date,^{3b} there is a great need to develop new, non-conventional antiviral molecules based on recent discoveries of the actual receptors of BKV onto the host cell. Early experiments showed that BKV does not bind to sialic acid-depleted erythrocytes¹³ and Vero cells.¹⁴ Then, further evidences¹⁵ of the Neu5Ac-mediated attachment of the virus to the cell have proved the key role exerted by 5-*N*-acetyl-neuraminic acid, linked to *N*-glycoproteines or gangliosides, as ligand of the viral capsid proteins.^{16,17} Therefore, artificial Neu5Ac-decorated structures able to interfere with this sugar-protein recognition process may act as antiviral agents. It is worth noting that the potential of sialic acid-based unnatural ligands of BKV, as inhibitors of its binding to the host cell, has never been explored.¹⁸

A similar approach can be envisaged to design new antiviral drugs against other pathogens such as the influenza A viruses, which include the human, avian, swine, and equine influenza viruses. Although both influenza A and B type viruses are responsible for annual flu epidemics in humans, only the A virus can cause sporadic pandemics, characterized by excess mortality and morbidity, since there is no animal reservoir of the influenza B virus.¹⁹ Aquatic birds provide the natural reservoir for the influenza A viruses, although avian flu is, in general, asymptomatic in wild birds. Occasionally, highly pathogenic strains of the influenza A viruses (*e. g.* H5N1) cause serious systemic infections in domestic poultry and even cross the species barrier infecting humans.²⁰ These single-stranded RNA viruses carry two surface glycoproteins, a trimeric lectin (hemagglutinin, HA)²¹ and a tetrameric glycosidase (neuraminidase, NA),^{19c} and are subtyped according to the reactivity of HA (15 subtypes) and NA (9 subtypes). Both proteins are present in multiple copies on the virus surface (*ca.* 500 units of HA and 100 units of NA per virion) and recognize the same host cell sugar, 5-*N*-acetyl-neuraminic acid. The hemagglutinin mediates the adhesion of the virus to the cell, followed by the fusion of viral and cell membranes, whereas the neuraminidase cleaves the terminal sialic acid linked to the glycoconjugate receptors to allow progeny virus release and to promote the spread of the infection facilitating the movement of the viral particles through mucus.^{22,23} Therefore, designed molecules that bind stronger than the natural ligand to either HA or NA would be, in principle, good anti-flu drugs. During the past two decades both issues have been actively addressed, but only some neuraminidase inhibitors,²⁴ zanamivir (**2**) and oseltamivir (**3**), have reached the market (Figure 2), whereas compounds targeted against hemagglutinin failed to become drugs.²⁵

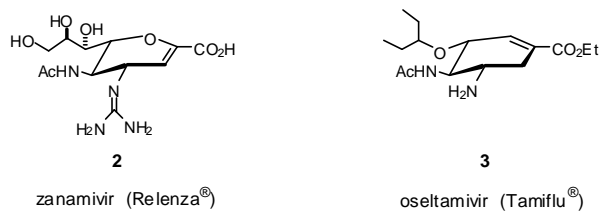


Figure 2. Commercially available neuraminidase inhibitors.

This was mainly due to the weak HA-binding properties shown by monomeric sialic acid derivatives. In fact, compound **6**, one of the best monovalent inhibitor of the bromelain-released hemagglutinin (a soluble form of HA that lacks the C-terminal anchoring peptide), has a dissociation constant of $3.7 \mu\text{M}$,²⁶ only three orders of magnitude lower than that found for methyl α -sialoside **5** ($K_D = 2.8 \text{ mM}$), the prototypal HA ligand (Figure 3). On the other hand, good monomeric neuraminidase inhibitors,²⁷ including the commercially available ones, have dissociation constants in the picomolar range.²⁸ However, NA inhibitors are effective only after the onset of infection in the host and are not suitable for prophylactic purposes. To this aim, a great deal of work has been devoted to the synthesis of multivalent HA ligands,²⁹ non-natural compounds displaying multiple copies of sialic acid moieties, for which it was anticipated a strong HA affinity due to simultaneous binding events.

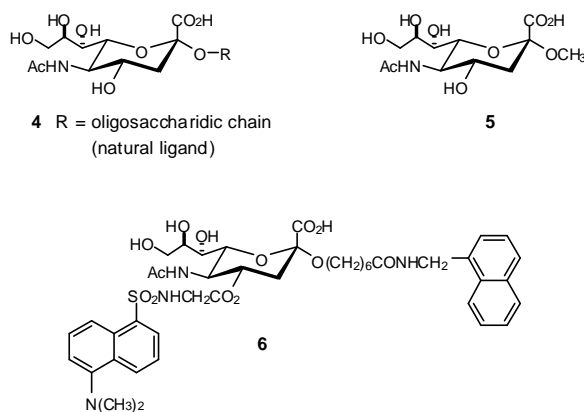


Figure 3. Natural and unnatural ligands of influenza A virus hemagglutinin.

3.2 Synthesis of multivalent sialosides

Many recognition processes take place through the attachment of multiple binding sites on one molecule (*e. g.* a protein) or organism (*e. g.* a virus) to multiple receptor sites on another one (*e. g.* a cell).³⁰ The resulting affinity enhancement is orders of magnitude greater than that expected on the basis of a mere multiplication factor of valency. Indeed, multivalency is a means Nature has found

to increase weak interactions to biologically relevant levels. This finding is especially important in carbohydrate-protein recognition events, in which monovalent affinities are usually quite low. In the case where a protein, which is bearing clustered binding sites, links to a multivalent ligand displaying sugar units with proper orientation and spacing, the phenomenon is termed³¹ glycoside cluster effect.^{30b}

Non-natural multivalent HA ligands that present α -sialoside units tethered to proteins,³² homopeptides,³³ polysaccharides,³⁴ polymers,³⁵ liposomes,³⁶ nanostructures,³⁷ dendrimers,³⁸ and low molecular weight scaffolds (to form clusters)³⁹ have been prepared and, in most cases, tested as inhibitors of the hemagglutination and the cytopathic effects mediated by influenza A viruses.⁴⁰ High molecular weight multivalent sialosides³²⁻³⁷ showed a potent HA inhibitory activity, in some cases^{35h} higher than that observed for the most effective natural inhibitor (equine α_2 -macroglobulin), since the minimum concentrations⁴¹ required to inhibit hemagglutination by the virus were in the nano- or picomolar range. However, serious concerns^{34,35l,37b,42} were raised about the toxicity of polymeric sialosides having a polyacrylamide backbone.^{35a-i,m,n,p} In addition, the polydisperse nature of macromolecular materials, which prevents rigorous purification and characterization, together with their potential immunogenicity, may constitute an unsurmountable obstacle to the approval as antiviral therapeutics by national regulatory agencies. Therefore, structurally well-defined multivalent sialosides, such as dendrimer³⁸ and cluster³⁹ derivatives, are valuable lead compound candidates.

Our interest in sugar clusters dates back to the mid-1990s, when we reported the first synthesis⁴³ of glycosylated calixarenes (calixsugars) such as the water-soluble tetra-*O*-galactosyl-calix[4]arene **7** (Figure 4). Then, various calixsugars were prepared by us⁴⁴ and others,^{39e,45} while the synthesis of hydrolytically stable, carbon-linked glycosyl-calixarenes turned out to be a quite difficult task. In fact, the Wittig olefination of calixarene aldehydes by anomeric sugar phosphoranes gave poor results, since only a bis-*C*-glycosylated calix[4]arene was obtained in modest yield.^{44c} Also the approach based on the Pd(0)-mediated Sonogashira-Heck-Cassar cross-coupling between polyiodoarenes and ethynyl *C*-glycosides (*C*-glycosyl acetylenes), was found unsuitable for the synthesis of *C*-calixsugars, although it was successfully applied to the preparation of a different class of *C*-glycoside clusters.⁴⁶ Finally, taking advantage of the Cu(I)-mediated azide-alkyne cycloaddition,^{47,48} the ethynyl *C*-glycosides were coupled with scaffolds bearing multiple azide functions to give in high yields several *C*-glycoclusters, including the *C*-calixsugar **8** (Figure 4).⁴⁹

These molecules featured a 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole ring as the spacer, a keystone,^{48e} connecting the sugar ligand to the scaffold. Recently, following a two-step procedure developed by Sharpless and Demko,⁵⁰ the hitherto unreported 1,5-disubstituted tetrazole-linked glycoclusters were made available by us.⁵¹ In fact, the cycloaddition between azidomethyl *C*-glycosides and tosyl cyanide gave the corresponding 1-glycosyl-5-sulfonyl-tetrazole derivatives, which were submitted to multiple nucleophilic substitution in the presence of calixarene tetrols to afford tetravalent *C*-glycoclusters,⁵¹ *e. g.* **9** (Figure 4).

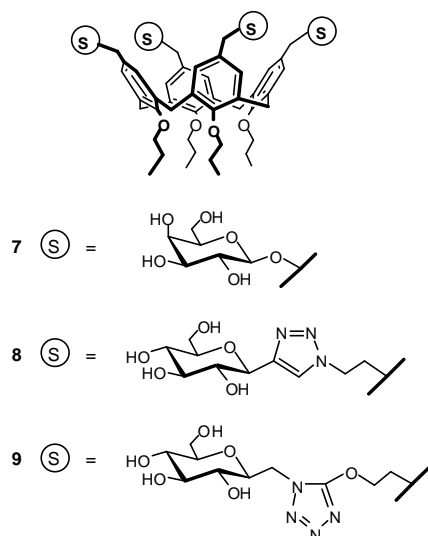
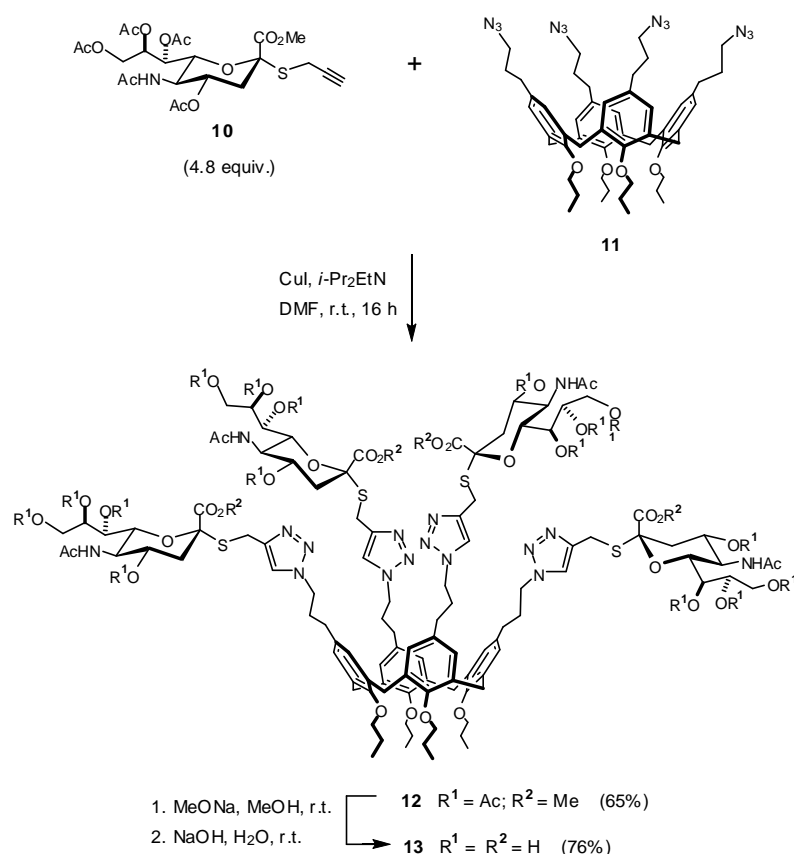


Figure 4. Calixarene-based glycoside clusters prepared in Authors' laboratory.

Unfortunately, the latter methodology cannot be exploited for the synthesis of sialoside clusters, because the acyl functions of the Neu5Ac units do not tolerate the conditions required for the nucleophilic substitution step. On the other hand, we anticipated that the copper-assisted azide-alkyne cycloaddition would be an efficient approach toward the preparation of multivalent sialosides. Calix[4]arenes, the most versatile members of this class of cyclic oligophenols,⁵² were chosen as scaffolds due to the easy derivatization at both the upper (wide) and lower (narrow) rims and their three-dimensional preorganized architecture. In particular, among the four possible conformations (cone, partial cone, 1,2-alternate, 1,3-alternate) adopted by calix[4]arenes, the cone conformer allows a spatially close arrangement of up to four sugar ligands at either sides of the hydrophobic cavity. In order to prepare glycoclusters resistant to chemical and enzymatic hydrolysis for potential *in vivo* applications, the native anomeric oxygen atom of the sialic acid moieties has to be replaced by a carbon or sulfur⁵³ atom. The resulting isosteres should retain the hemagglutinin binding affinity because the functional groups involved in this sugar-protein recognition,⁵⁴ *i. e.* axial carboxylate, amide function, and glycerol side chain, are not altered.

Since α -D-linked C-sialosides bearing a terminal triple bond in their aglycon chain were not reported in the literature, the known^{39g} propargyl thiosialoside **10** was chosen as dipolarophile in the planned Cu-assisted cycloaddition reactions (Scheme 1). As the 1,3-dipole counterpart, we used the calixarene tetra-azide **11**, a stable compound adopting the fixed cone conformation that has been recently synthesized⁴⁹ in our laboratory and employed for the preparation of calix[4]arene-based C-glycoclusters. Hence, the tetra-azide **11** was allowed to react at room temperature overnight with the sugar alkyne **10** (1.2 equiv. per azide group) in the presence of freshly distilled Hünig's base and 25 mol% of commercially available copper(I) iodide. To achieve complete solubility of the cycloaddition partners, anhydrous DMF, instead of toluene, was used as the reaction solvent. As small amounts of partially deacetylated sialocusters were formed due to the presence of adventitious water, the crude mixture was acetylated (Ac_2O , Py, r.t., 3 h).

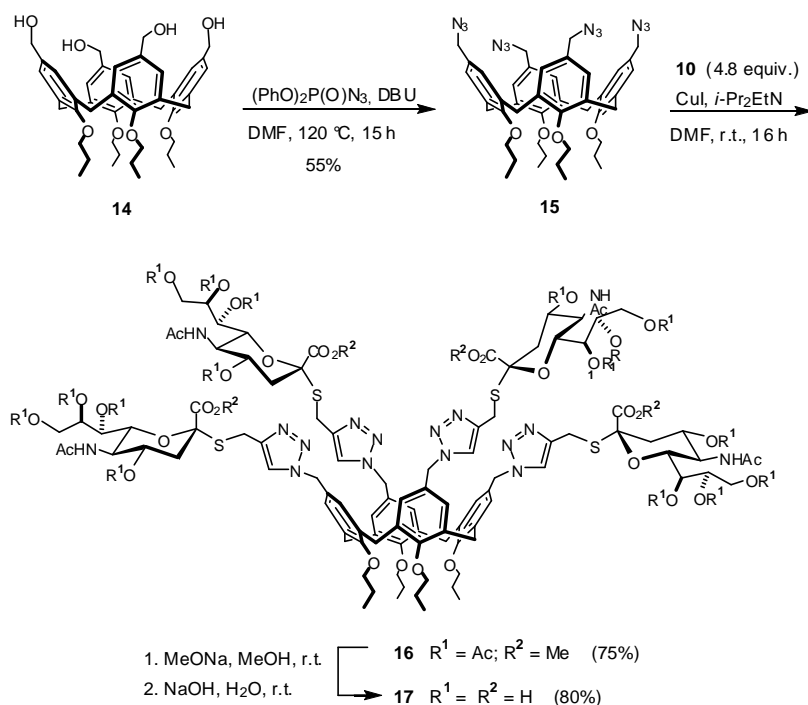


Scheme 1

The tetravalent sialocuster **12** was isolated in 65% yield by column chromatography on silica gel, and a tris-sialylated cycloadduct was recovered in 20% yield, although contaminated by **12** and other byproducts. The MS and ^1H NMR analyses readily confirmed the C_4 -symmetric structure of **12**, while the 1,4-disubstitution pattern of the 1,2,3-triazole spacers was firmly established by ^{13}C

NMR spectroscopy. In fact, a large positive $\Delta(\delta_{C4} - \delta_{C5})$ value (20.7 ppm) was found in the ^{13}C spectrum of **12**, as expected for all 1,4-disubstituted triazole derivatives,⁵⁵ including sugar clusters.⁴⁹ On the other hand, it has been demonstrated that 1,5-disubstituted triazole rings display small negative values for the chemical shift difference of the same carbon atoms.^{49,55} To provide suitable material for biological studies, the sialocluster **12** was first deacetylated by transesterification (MeONa, MeOH, r.t., 3 h) to give the corresponding methyl ester derivative. Then, the crude product was hydrolyzed (aqueous NaOH, r.t., 18 h) to afford the water soluble tetra-acid **13** in 76% overall yield after filtration through a short column of C18 silica gel.

Aiming at preparing clusters featuring a shorter distance between the sialic acid units, we targeted the calix[4]arene **15** in which the azide functions are linked to the aromatic ring through single methylene spacers (Scheme 2).

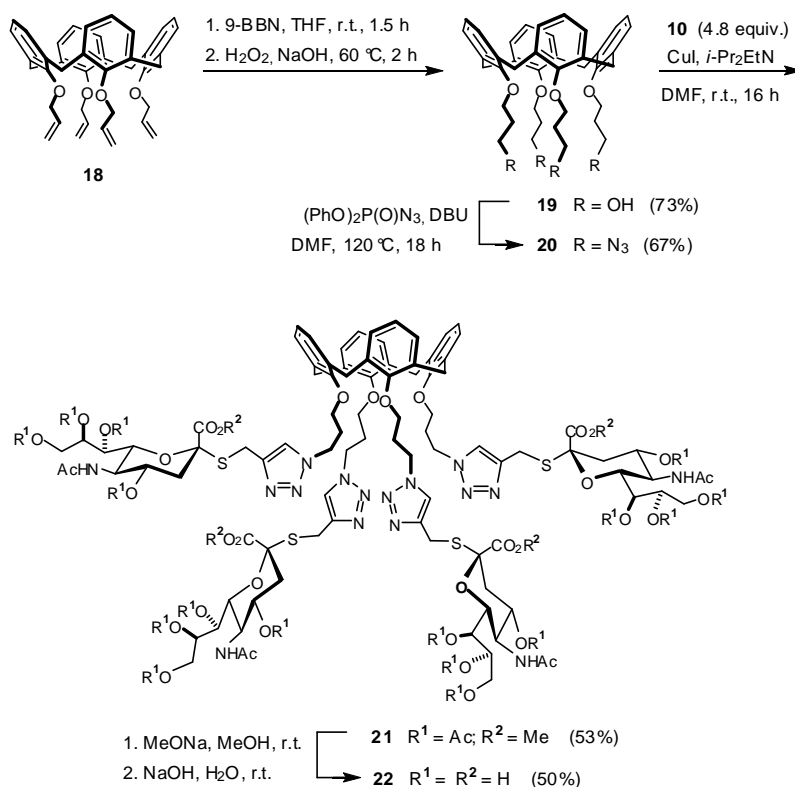


Scheme 2

Hence, the known^{44b} upper rim calix[4]arene tetrol **14** was converted into **15** upon treatment with diphenyl phosphoryl azide (DPPA, 1.5 equiv. per hydroxy group) and 1,8-diazabicyclo[5.4.0.]undec-7-ene (DBU) at 120 °C for 15 h. After column chromatography on silica gel, the short-arm calix[4]arene tetra-azide **15** was isolated in 55% yield as a white crystalline solid. The cycloaddition between **15** and the propargyl thiosialoside **10** was carried out as described above to afford the peracetylated tetra-valent sialocluster **16** in 75% isolated yield. Also in this case, the 1,4-regiochemistry of the triazole ring was established by ^{13}C -NMR analyses ($\Delta(\delta_{C4} - \delta_{C5}) = 20.8$

ppm). Then, the removal of the acetyl protecting groups and the hydrolysis of the methyl ester functions, followed by C18 silica gel purification, gave the tetra-acid **17** in 80% yield.

An alternative approach towards sialoclusters whose sugar moieties are close to each other, relied on the use of calix[4]arenes in cone conformation azidated at the lower rim as scaffolds. This side of the macrocycle is significantly narrower than the upper side. Therefore, the known⁵⁶ tetra-allyl-calixarene **18** (Scheme 3) was transformed into the tetrol **19** by one-pot multiple hydroboration and oxidation (73%).

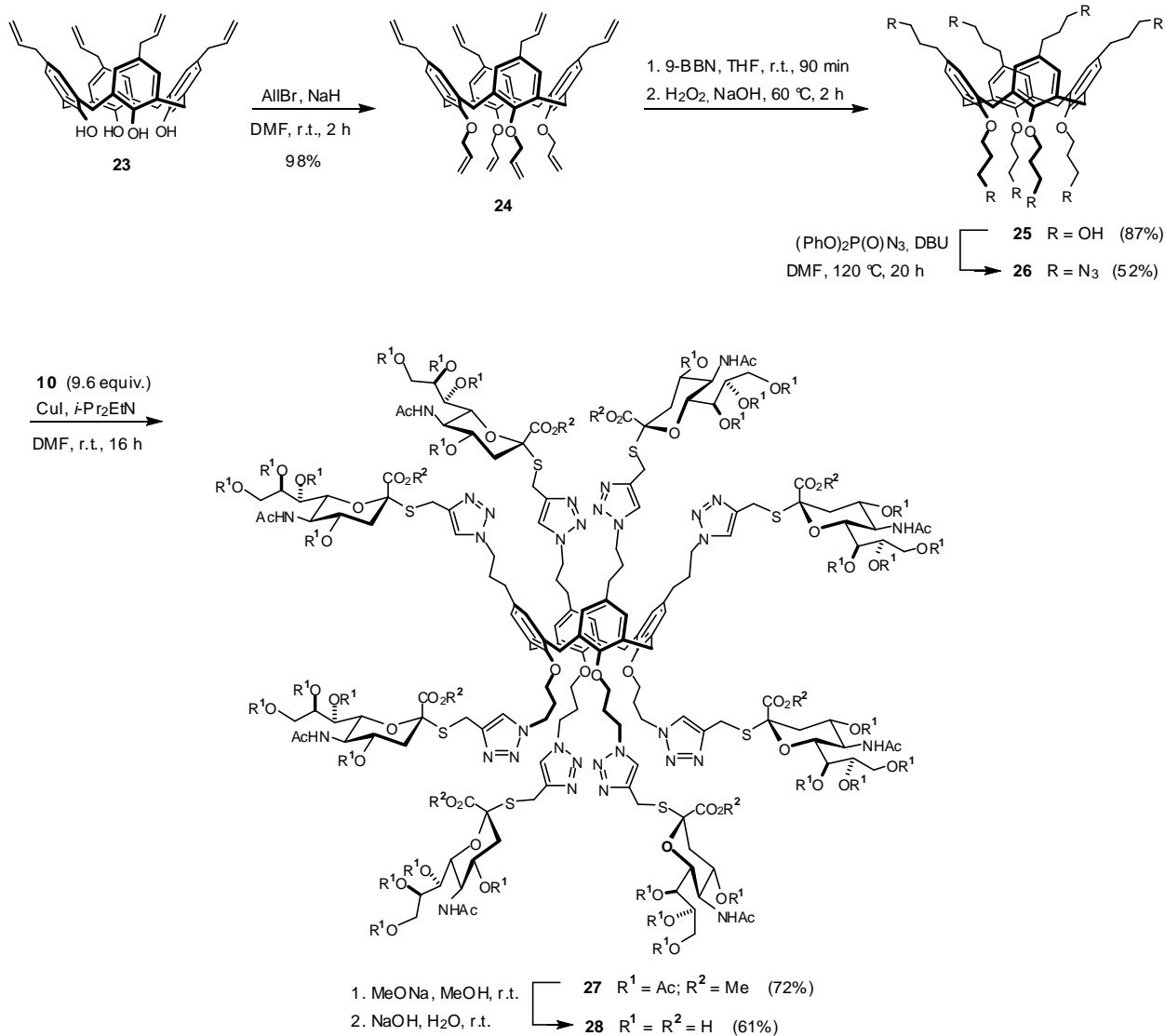


Scheme 3

Then, compound **19** was submitted to the azidation using DPPA and DBU (120 °C, 18 h) to give, after column chromatography on silica gel, the lower rim tetra-azide **20** in 67% yield as a white crystalline solid. The Cu-assisted cycloaddition of **20** with thiosialoside **10** (4.8 equiv.) under standard conditions afforded crystalline **21** in 53% isolated yield. The main reason of the moderate yield of isolated **21** resides in the loss of the product in the course of the chromatographic purification due to the scarce solubility of the cycloadduct in the eluent employed. Unfortunately, direct crystallization of the crude mixture, as well as size-exclusion chromatography were found not suitable for the purification of **21**. The C₄-symmetric structure and the regioisomeric assignment of the disubstituted triazole residues were confirmed by MS and NMR analyses (see Experimental Section). Moreover, the fixed cone conformation of the calix[4]arene scaffold was substantiated by

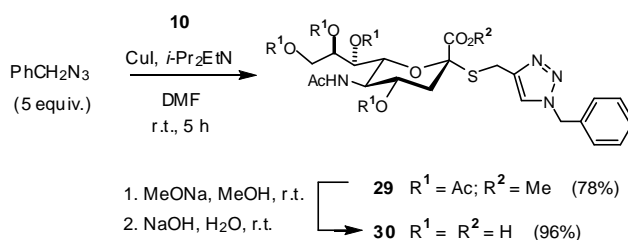
the presence of signals for the equatorial and axial protons of the methylene bridges between the phenyl rings as large doublets at 3.15 and 4.30 ppm, respectively.⁵⁷ Finally, the acetyl and methyl protecting groups were removed under basic conditions as described for the above sialoclusters at the upper rim to give the tetra-acid **22** in 50% yield as a white crystalline solid.

Since sialylation at either the upper or lower rim of calix[4]arene scaffolds was quite efficient, we planned to prepare a cluster constituted of sialic acid residues at both sides of the calixarene cavity. In principle, such a densely sialylated molecule can bind simultaneously to a couple of hemagglutinin trimers located onto a single virion or two distinct viral particles. In both cases the HA inhibitory activity was expected to be stronger than that displayed by the tetravalent sialoclusters **13**, **17**, and **22**. To test this hypothesis, the tetra-phenol **23** (Scheme 4) was allylated in nearly quantitative yield to give the octa-allyl derivative **24** in a fixed cone conformation, as proved⁵⁷ by the presence in its ¹H NMR spectrum of two doublets at 3.10 and 4.38 ppm ($J = 13.0$ Hz) for the methylene bridges protons. Then **24** was submitted to the hydroboration-oxidation one-pot sequence to afford the octaol **25** (87%), which in turn was azidated in the presence of DPPA and DBU at high temperature. The syrupy calix[4]arene octa-azide **26** was isolated in 52% yield by column chromatography on Sephadex LH-20. The purification of this polyazide on a silica gel column was unsuccessful very likely because of the strong interactions with this stationary phase. The cycloaddition between **26** and propargyl thiosialoside **10** (1.2 equiv. per azide group) was performed using our standard procedure to give the octavalent cluster **27** in 72% yield after Sephadex LH-20 column chromatography. By means of this technique the sialocluster **27** was recovered as a brown solid, probably due to a complex with copper salts. A colorless, analytical sample of **27** was obtained by deacetylation, chromatography on C18 silica gel column, and acetylation (see Experimental Section). This compound showed very broadened signals in its ¹H NMR spectrum recorded at room temperature, probably due to a slow equilibrium between the conformations adopted by the glycosylated chains linked to the metacyclophane core. Fortunately, the sharp spectrum acquired at 120 °C (in DMSO-d₆) allowed to assign the C₄-symmetric structure and the cone conformation to **27**, while the formation of 1,4-disubstituted triazole rings was confirmed by ¹³C NMR analysis ($\Delta(\delta_{C4} - \delta_{C5}) = \sim 19$ ppm). Although slightly contaminated by copper salts, compound **27** was transformed into the target octavalent sialocluster **28** by standard transesterification of the acetate functions and methyl ester saponification, followed by column chromatography on C18 silica gel. By this procedure, **28** was isolated in a pure form and 61% yield. Also the octavalent sialocluster **28** showed a complex ¹H NMR spectrum at 25 °C, but raising the temperature to 120 °C caused the coalescence of the signals.



Scheme 4

A rigorous evaluation of the enhancement of hemagglutinin inhibitory activity shown by glycoclusters with respect to a monovalent ligand, *i. e.* the glycoside cluster effect, requires a monomeric sugar featuring the same aglycon structure.⁵⁸ Hence, the thiosialoside **30** (Scheme 5) appeared more appropriate than methyl *O*-sialoside **5** (Figure 3) as the reference monovalent ligand. Actually, compound **30** embodied all the functional groups present in the above multivalent sialosides, such as the equatorial thioglycoside linkage, the 1,4-disubstituted triazole moiety, and the phenyl ring. Its protected derivative, the acetylated methyl ester **29**, was readily prepared in 78% yield by Cu-promoted cycloaddition of **10** with crude benzyl azide (ca. 5 equiv.) prepared in situ immediately before the use (Scheme 5). Then, standard deprotection reactions allowed the conversion of **29** into water soluble **30** in almost quantitative yield.



Scheme 5

3.3 Biological assays.

The capability of the synthesized multivalent sialosides to bind BKV particles was tested using the hemagglutination inhibition (HI) assay (Table 1). All compounds were able to inactivate BKV at submillimolar concentrations, the lower rim tetrasialoside **22** being the most potent of this set of inhibitors (0.11 mM, entry 4). Therefore, the use of non-natural scaffolds, i. e. calixarenes, and linkers such as the triazole heterocycle, did not prevent the molecular recognition properties of the sugar ligand. Although each multivalent sialosides was more active than the monovalent derivative **30** (relative potencies: from 1.12 to 2.55), the same was no longer true when the actual concentration of sialic acid moieties was taken into consideration (relative potencies: from 0.17 to 0.64). Indeed, the installation of multiple copies of neuraminic acid onto a platform led to a decrease of the inhibition activity per sugar unit. This behaviour may be due to a low surface concentration of viral hemagglutinin, which hampers the glycoside cluster effect. Unfortunately, no data are available in the literature about the number and spatial arrangement of hemagglutinin on the BK virus surface.

Table 1. Hemagglutination inhibition (HI) of BK virus by multivalent sialosides.

Entry	Compound	HI activity ^a (mM)	Relative potency ^b
1	monovalent sialoside 30	0.28	1
2	upper rim tetrasialoside 13	0.17 (0.68) ^c	1.65 (0.41) ^d
3	upper rim tetrasialoside 17	0.25 (1.00) ^c	1.12 (0.28) ^d
4	lower rim tetrasialoside 22	0.11 (0.44) ^c	2.55 (0.64) ^d
5	octasialoside 28	0.20 (1.60) ^c	1.40 (0.17) ^d

^aMinimum concentration required for complete HI.

^bAll potencies normalized to that of monovalent sialoside **30**.

^cActual concentration of sialic acid units.

^dBased on the sialic acid contents.

To further assess the ability of the multivalent sialosides to bind BKV virions, an experiment of neutralisation of infection was carried out. The presence of structural antigens was analyzed by immunofluorescence (IF) in mock-infected cells, infected cells, and in cells infected with the artificial inhibitor-preincubated BKV (some results are shown in Figure 5). When BKV was preincubated with the mono- and multivalent sialosides at the concentrations indicated in Table 1, the adsorption step was inhibited and the cells did not show the presence of viral proteins (Figure 5c-e). The same results were obtained when the virus was preincubated with specific antibodies (Figure 5f), whereas in cells infected with BKV, not pretreated, viral proteins were expressed (Figure 5b).

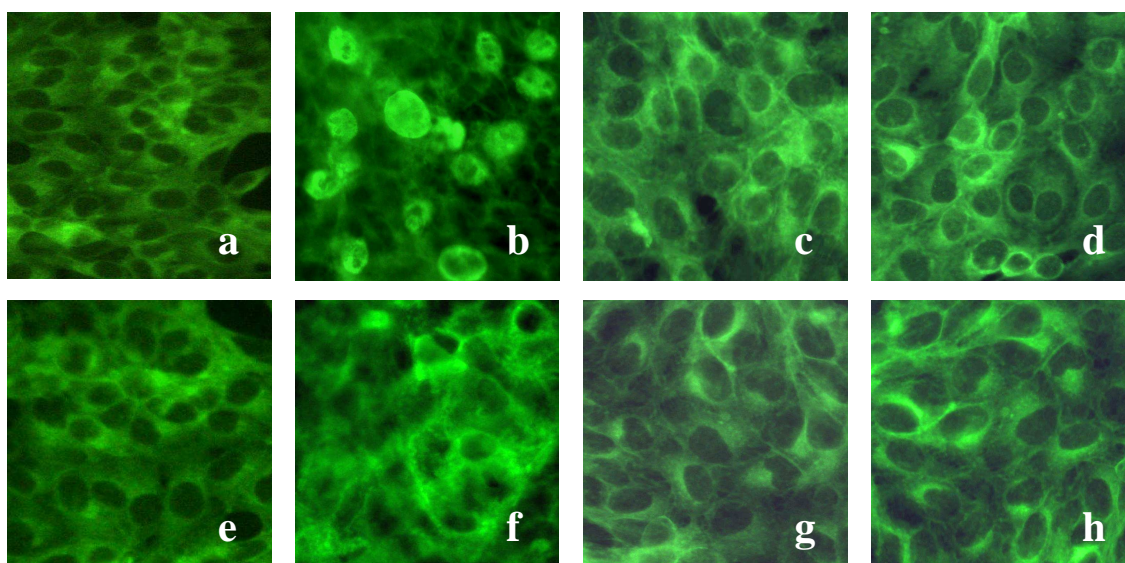


Figure 5. Inhibition of the cytopathic effect in cell cultures infected by BK virus. a) Mock-infected cells. b) Cells infected with BKV. c-e) Cells infected with BKV pretreated with monovalent sialoside **30**, upper rim tetrasialoside **13**, lower rim tetrasialoside **22**, respectively. f) Cells infected with BKV, pretreated with specific antibodies.

The biological activity of the four sialoside clusters was also tested against the influenza A virus. The standard HI assay (Table 2) proved that three of them were able to inhibit the virus-induced hemagglutination, whereas the upper rim tetrasialoside **17** failed to show HI activity at concentrations up to 21 mM (entry 3). In striking contrast to the case of BK virus, the monovalent sialoside **30** was a very weak hemagglutination inhibitor (0.28 vs. 100 mM, entry 1 in Table 1 and 2). On the other hand, the upper and lower rim polysialosides **13**, **22**, and **28** were active at submillimolar concentrations showing similar potencies (0.25-0.37 mM). These results indicate that a moderate glycoside cluster effect took place since, considering the inhibition activity per sialic acid unit, the above multivalent sialosides were 50-83 times more active than the monovalent

derivative **30** (Table 2). Moreover, it appears from the HI assay that the reduced length and flexibility of the methylene spacers at the upper rim of **17** did not allow an efficient sugar-protein recognitions. Finally, the HI activity of the octasialoside **28** (Table 2, entry 5) was close to that of the tetrasialosides **13** and **22**, indicating that only one of the two sets of sialic acid units linked at both calixarene rims was involved in the interaction with the viral hemagglutinin. Very likely, this finding was due to the inappropriate distance between the two sets of sugar ligands, too short to allow the simultaneous binding to two distinct virions.

Table 2. Haemagglutination inhibition (HI) of influenza A virus by multivalent sialosides.

Entry	Compound	HI activity ^a (mM)	Relative potency ^b
1	monovalent sialoside 30	100	1
2	upper rim tetrasialoside 13	0.37 (1.48) ^c	270 (68) ^d
3	upper rim tetrasialoside 17	>21 (>84) ^c	–
4	lower rim tetrasialoside 22	0.30 (1.20) ^c	333 (83) ^d
5	octasialoside 28	0.25 (2.00) ^c	400 (50) ^d

^aMinimum concentration required for complete HI.

^bAll potencies normalized to that of monovalent sialoside **30**.

^cActual concentration of sialic acid units.

^dBased on the sialic acid contents.

The multivalent sialosides **13**, **22**, and **28** were also submitted to a neutralisation assay of influenza A virus (H3N2 strain) infectivity performed as described for the BK virus (see Experimental Section). Ten days after infection of MDCK cells, the cytopathic effect (CPE) was present in cells infected with the virus, not pretreated, whereas the same cultures, infected with the virus and pretreated with the above inhibitors, did not shown CPE.

3.4 Conclusions

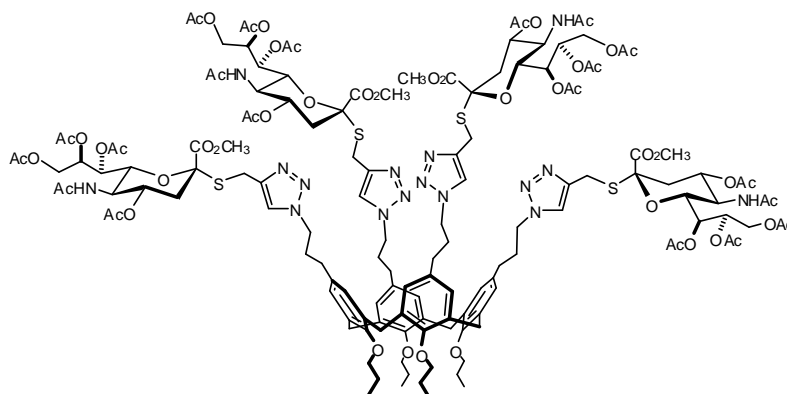
Tetra- and octavalent sialoside clusters were prepared in good yields exploiting for the first time the copper-promoted cycloaddition of a propargyl thiosialoside with calix[4]arene polyazides. The cycloadducts featured the hydrolytically stable carbon-sulfur bond at the anomeric position and the 1,4-disubstituted triazole ring as the spacer between the sialic acid moieties and the platform. It was demonstrated that these unnatural motifs did not hamper the desired biological activity of the sialoclusters. In fact, the latters were able to inhibit the hemagglutination and the viral infectivity mediated both by BK and influenza A viruses. Although non-polymeric multivalent sialosides have

been already described^{38,39} and, in some cases, submitted to biological assays, our results pave the way for the synthesis of viral hemagglutinin inhibitors via multiple azide-alkyne cycloaddition. This powerful ligation method allowed us to prepare inhibitors of the influenza A virus showing a moderate glycoside cluster effect as well as the first artificial inhibitors of the BK virus.

3.5 Experimental Section

All moisture-sensitive reactions were performed under a nitrogen atmosphere using oven-dried glassware. Anhydrous solvents were dried over standard drying agents⁵⁹ and freshly distilled prior to use. Reactions were monitored by TLC on silica gel 60 F₂₅₄ with detection by charring with sulfuric acid. Flash column chromatography⁶⁰ was performed on silica gel 60 (230-400 mesh). Melting points were determined with a capillary apparatus. Optical rotations were measured at 20 ± 2 °C in the stated solvent; $[\alpha]_D$ values are given in $\text{deg}\cdot\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dm}^{-1}$. ¹H NMR (300 and 400 MHz) and ¹³C NMR spectra (75 and 100 MHz) were recorded for CDCl₃ solutions at room temperature unless otherwise specified. Peak assignments were aided by ¹H-¹H COSY and gradient-HMQC experiments. In the ¹H NMR spectra reported below, the *n* and *m* values quoted in geminal or vicinal proton-proton coupling constants $J_{n,m}$ refer to the number of the corresponding sugar protons. MALDI-TOF mass spectra were acquired using 2,5-dihydroxy-benzoic acid as the matrix. ESI mass spectra were recorded for 6:4 CH₃CN-H₂O solutions containing 0.1% of trifluoroacetic acid.

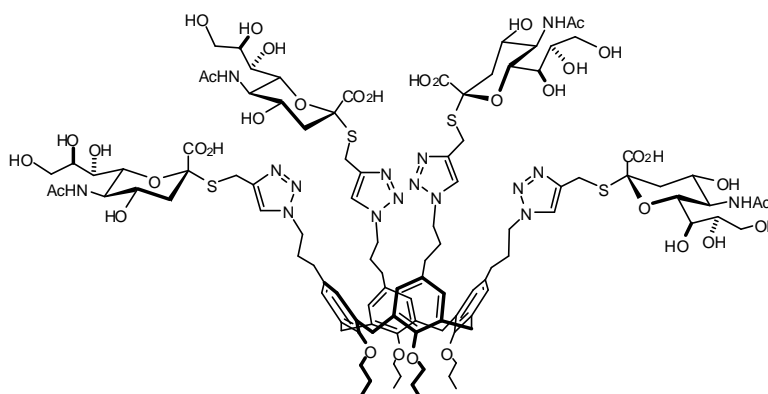
5,11,17,23-Tetrakis[{3-[4-[(methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate)methyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]propyl}]25,26,27,28-tetrapropoxy-calix[4]arene (12).



A mixture of calix[4]arene tetra-azide **11** (92 mg, 0.10 mmol), propargyl thiosialoside **10** (262 mg, 0.48 mmol), freshly distilled *N,N*-diisopropylethylamine (418 μ L, 2.40 mmol), CuI (23 mg, 0.12 mmol), and anhydrous DMF (5 mL) was sonicated in an ultrasound cleaning bath for 1 min, then magnetically stirred in the dark at room temperature for 16 h, and concentrated. A solution of the residue in pyridine (2 mL) and acetic anhydride (2 mL) was kept at room temperature for 3 h, then concentrated, diluted with AcOEt 100 mL), washed with phosphate buffer at pH 7 (2 x 10 mL), dried (Na_2SO_4), and concentrated.. The residue was eluted from a column of silica gel with acetone to give first a tris-adduct (51 mg, 20%) slightly contaminated by the tetra-adduct **12**. ^1H NMR (400 MHz) selected data: δ 7.53 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.52 (s, 2H, 2 H-5 Tr.), 6.44 (d, 4H, $J = 3.3$ Hz, Ar), 6.39 (s, 4H, Ar), 4.87 (ddd, 3H, $J_{3\text{ax},4} = J_{4,5} = 10.9$, $J_{3\text{eq},4} = 4.7$ Hz, 3 H-4), 4.38 and 3.04 (2d, 8H, $J = 13.0$ Hz, 4 ArCH_2Ar), 3.69, 3.68, and 3.66 (3s, 9H, 3 OMe), 2.73 (dd, 3H, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.8$ Hz, 3 H-3eq). MALDI-TOF MS (2561.88): 2585.9 ($\text{M}^+ + \text{H} + \text{Na}$), 2600.9 ($\text{M}^+ + \text{K}$). Eluted second was **12** (202 mg, 65%) as a syrup; $[\alpha]_{\text{D}} = +40.0$ (c 0.4, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz): δ 7.56 (s, 4H, 4 H-5 Tr.), 6.44 (s, 8H, Ar), 5.52 (d, 4H, $J_{5,\text{NH}} = 10.0$ Hz, 4 NH), 5.48 (ddd, 4H, $J_{7,8} = 8.5$, $J_{8,9\text{a}} = 2.7$, $J_{8,9\text{b}} = 5.5$ Hz, 4 H-8), 5.36 (dd, 4H, $J_{6,7} = 2.1$ Hz, 4 H-7), 4.90 (ddd, 4H, $J_{3\text{ax},4} = 11.4$, $J_{3\text{eq},4} = 4.6$, $J_{4,5} = 10.5$ Hz, 4 H-4), 4.41 and 3.07 (2d, 8H, $J = 13.3$ Hz, 4 ArCH_2Ar), 4.34 (dd, 4H, $J_{9\text{a},9\text{b}} = 12.5$ Hz, 4 H-9a), 4.23 (t, 8H, $J = 7.0$ Hz, 4 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 4.10 (dd, 4H, 4 H-9b), 4.09 (ddd, 4H, $J_{5,6} = 10.6$ Hz, 4 H-5), 4.03 and 3.98 (2d, 8H, $J = 14.0$ Hz, 4 SCH_2), 3.91 (dd, 4H, 4 H-6), 3.83 (t, 8H, $J = 7.5$ Hz, 4 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.68 (s, 12H, 4 OMe), 2.76 (dd, 4H, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.5$ Hz, 4 H-3eq), 2.32 (t, 8H, $J = 7.2$ Hz, 4 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.20, 2.19, 2.16, 2.05, and 1.90 (5s, 60H,

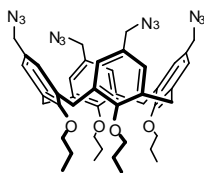
20 Ac), 2.04-1.91 (m, 20H, 4 H-3ax, 4 ArCH₂CH₂CH₂, 4 CH₃CH₂CH₂O), 1.00 (t, 12H, *J* = 7.5 Hz, 4 CH₃CH₂CH₂O). ¹³C NMR (100 MHz): δ 170.8, 170.2, 170.1, and 168.2 (CO), 155.0 (C Ar), 143.2 (C-4 Tr.), 134.9 (C Ar), 133.2 (C Ar), 127.9 (CH Ar), 122.5 (C-5 Tr.), 82.8 (C-2), 76.6 (CH₃CH₂CH₂O), 74.1 (C-6), 69.5 (C-4), 68.1 (C-8), 67.2 (C-7), 62.4 (C-9), 53.0 (OMe), 49.6 (ArCH₂CH₂CH₂), 49.3 (C-5), 37.6 (C-3), 32.0 (ArCH₂CH₂CH₂, ArCH₂CH₂CH₂), 31.0 (ArCH₂Ar), 23.3 (SCH₂, CH₃CH₂CH₂O), 23.2, 21.3, and 20.9 (CH₃CO), 10.3 (CH₃CH₂CH₂O); MALDI-TOF MS (3107.41): 3130.3 (M⁺ + Na), 3146.1 (M⁺ + K). Anal. Calcd. for C₁₄₄H₁₉₂N₁₆O₅₂S₄: C, 55.66; H, 6.23; N, 7.21. Found: C, 55.91; H, 6.35; N, 7.40.

5,11,17,23-Tetrakis{{3-{4-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-2-thio- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}propyl}}-25,26,27,28-tetrapropoxy-calix[4]arene (13).



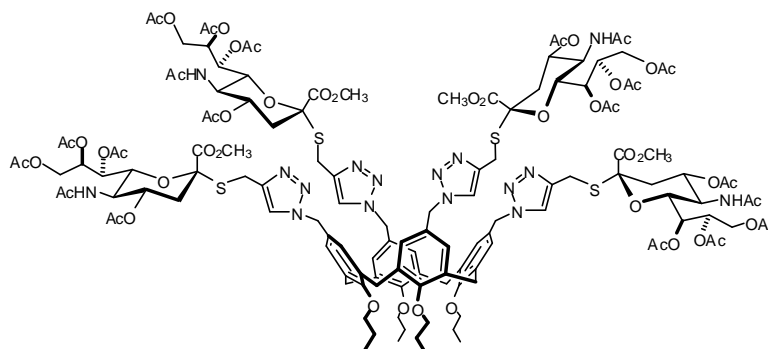
A solution of **12** (62 mg, 0.02 mmol) in a 0.2 M solution of NaOMe in MeOH (4 mL, prepared from Na and MeOH immediately before the use) was stirred at room temperature for 3 h in a nitrogen atmosphere, then neutralized with Dowex 50X2-400 resin (H^+ form, activated and washed with H_2O and MeOH immediately before the use), and filtered through a sintered glass filter. The resin was washed with MeOH, and the solution was concentrated to give crude 5,11,17,23-tetrakis{{3-{4-[(methyl 5-acetamido-3,5-dideoxy-2-thio- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}propyl}}-25,26,27,28-tetrapropoxy-calix[4]arene. 1H NMR (300 MHz, CD_3OD) selected data: δ 7.92 (s, 4H, 4 H-5 Tr.), 6.56 (s, 8H, Ar), 4.44 and 3.11 (2d, 8H, $J = 12.8$ Hz, 4 $ArCH_2Ar$), 4.21 (t, 8H, $J = 6.8$ Hz, 4 $ArCH_2CH_2CH_2$), 4.13 and 4.01 (2d, 8H, $J = 14.1$ Hz, 4 SCH_2), 3.79 (s, 12H, 4 OMe), 2.79 (dd, 4H, $J_{3eq,4} = 4.5$, $J_{3ax,3eq} = 12.7$ Hz, 4 H-3eq), 2.02 (s, 12H, 4 Ac), 1.84 (dd, 4H, $J_{3ax,4} = 11.3$ Hz, 4 H-3ax), 1.04 (t, 12H, $J = 7.4$ Hz, 4 $CH_3CH_2CH_2O$). A solution of the methyl ester tetra-adduct in 0.2 M aqueous NaOH (2 mL) was kept at room temperature for 18 h in a nitrogen atmosphere, then neutralized with Dowex 50X2-400 resin, and filtered through a sintered glass filter. The resin was washed with H_2O , and the solution was concentrated. The residue was eluted from a C18 silica gel cartridge with 1:1 H_2O -MeOH, then MeOH, and dried under high vacuum to give **13** (36 mg, 76%) as an amorphous solid; $[\alpha]_D = +24.7$ (c 0.7, MeOH). 1H NMR (300 MHz, CD_3OD) selected data: δ 7.90 (s, 4H, 4 H-5 Tr.), 6.55 (s, 8H, Ar), 4.44 and 3.11 (2d, 8H, $J = 12.8$ Hz, 4 $ArCH_2Ar$), 4.20 (t, 8H, $J = 7.0$ Hz, 4 $ArCH_2CH_2CH_2$), 4.15 and 4.02 (2d, 8H, $J = 14.0$ Hz, 4 SCH_2), 2.82 (dd, 4H, $J_{3eq,4} =$

3.6, $J_{3ax,3eq} = 12.5$ Hz, 4 H-3eq), 2.03 (s, 12H, 4 Ac), 1.84 (dd, 4H, $J_{3ax,4} = 10.5$ Hz, 4 H-3ax), 0.94 (t, 12H, $J = 7.5$ Hz, 4 $CH_3CH_2CH_2O$). ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ 175.3 (C), 173.2 (C), 156.1 (C), 145.4 (C), 136.1 (C), 135.0 (C), 129.5 (CH), 124.9 (CH), 84.4 (C), 78.0 (CH_2), 77.2 (CH), 72.7 (CH), 70.2 (CH), 69.2 (CH), 64.5 (CH_2), 53.7 (CH), 50.7 (CH_2), 42.1 (CH_2), 33.0 (CH_2), 32.8 (CH_2), 31.8 (CH_2), 24.5 (CH_2), 22.7 (CH_3), 10.9 (CH_3). ESI MS (2378.71): 1190.5 (M+2)/2, 793.9 (M+3)/3. Anal. Calcd. for $C_{108}H_{152}N_{16}O_{36}S_4$: C, 54.53; H, 6.44; N, 9.42. Found: C, 54.38; H, 6.51; N, 9.33.

5,11,17,23-Tetrakis(3-azidomethyl)-25,26,27,28-tetrapropoxy-calix[4]arene (15).

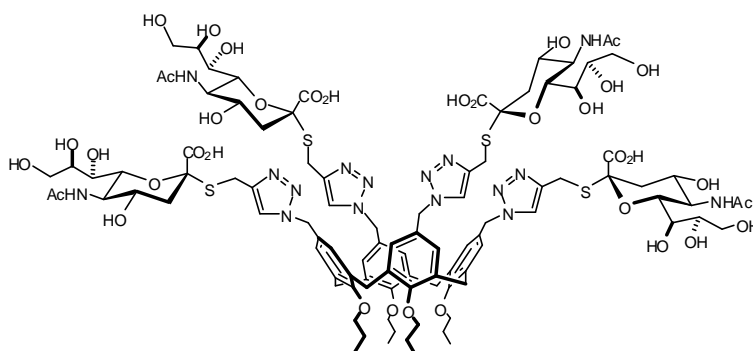
A mixture of calixarene tetrol **14** (285 mg, 0.40 mmol), sodium azide (208 mg, 3.20 mmol), diphenyl phosphoryl azide (520 μ L, 2.40 mmol), 1,8-diazabicyclo[5.4.0.]undec-7-ene (240 μ L, 1.60 mmol), and anhydrous DMF (4 mL) was stirred at 120 °C for 15 h then partially concentrated, diluted with Et₂O (100 mL), washed with H₂O (2 x 10 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 15:1 cyclohexane-AcOEt to give **15** (179 mg, 55%) as a white solid. Mp 149-150 °C (cyclohexane). ¹H NMR (300 MHz): δ 6.64 (s, 8H, Ar), 4.48 and 3.18 (2d, 8H, $J = 13.4$ Hz, 4 ArCH₂Ar), 3.98 (s, 8H, 4 CH₂N₃), 3.88 (t, 8H, $J = 7.5$ Hz, 4 CH₃CH₂CH₂O), 1.96 (tq, 8H, $J = 7.5, 7.5$ Hz, 4 CH₂CH₂CH₂O), 1.02 (t, 12H, $J = 7.5$ Hz, 4 CH₃CH₂CH₂O). ¹³C NMR (75 MHz): δ 156.5 (C), 135.2 (C), 128.6 (C), 128.5 (CH), 76.9 (CH₂), 54.2 (CH₂), 30.8 (CH₂), 23.2 (CH₂), 10.2 (CH₃); MALDI-TOF MS (812.96): 835.8 (M⁺ + Na), 851.8 (M⁺ + K). Anal. Calcd. for C₄₄H₅₂N₁₂O₄: C, 65.01; H, 6.45; N, 20.68. Found: C, 65.12; H, 6.52; N, 20.81.

5,11,17,23-Tetrakis[{{4-[(methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate)methyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl}}-25,26,27,28-tetrapropoxy-calix[4]arene (16).

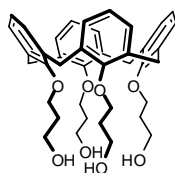


The cycloaddition between the tetra-azide **15** (24 mg, 0.03 mmol) and propargyl thiosialoside **10** (79 mg, 0.14 mmol) was carried out as described for the preparation of **12** to give, after acetylation of the crude mixture and column chromatography on silica gel (acetone), **16** (68 mg, 75%) as a syrup; $[\alpha]_D = +45.5$ (c 1.0, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz): δ 7.40 (s, 4H, 4 H-5 Tr.), 6.58 (bs, 8H, Ar), 5.45 (ddd, 4H, $J_{7,8} = 8.5$, $J_{8,9a} = 2.6$, $J_{8,9b} = 5.3$ Hz, 4 H-8), 5.33 (dd, 4H, $J_{6,7} = 2.3$ Hz, 4 H-7), 5.32 (d, 4H, $J_{5,\text{NH}} = 10.0$ Hz, 4 NH), 5.23 and 5.18 (2d, 8H, $J = 14.6$ Hz, 4 ArCH_2N), 4.89 (ddd, 4H, $J_{3\text{ax},4} = 11.2$, $J_{3\text{eq},4} = 4.7$, $J_{4,5} = 10.5$ Hz, 4 H-4), 4.40 and 3.09 (2d, 8H, $J = 13.6$ Hz, 4 ArCH_2Ar), 4.29 (dd, 4H, $J_{9a,9b} = 12.5$ Hz, 4 H-9a), 4.08 (dd, 4H, 4 H-9b), 4.06 (ddd, 4H, $J_{5,6} = 10.7$ Hz, 4 H-5), 4.00 and 3.94 (2d, 8H, $J = 14.2$ Hz, 4 SCH_2), 3.88 (dd, 4H, 4 H-6), 3.81 (t, 8H, $J = 7.5$ Hz, 4 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.57 (s, 12H, 4 OMe), 2.70 (dd, 4H, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.6$ Hz, 4 H-3eq), 2.16, 2.14, 2.02, 2.01, and 1.88 (5s, 60H, 20 Ac), 1.96 (dd, 4H, 4 H-3ax), 1.89 (tq, 8H, $J = 7.4$, 7.5 Hz, 4 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 0.98 (t, 12H, $J = 7.4$ Hz, 4 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz): δ 170.8, 170.7, 170.2, 170.1, and 168.2 (CO), 156.9 (C Ar), 143.2 (C-4 Tr.), 135.4 (C Ar), 128.3 (CH Ar), 128.2 (C Ar), 122.4 (C-5 Tr.), 82.9 (C-2), 77.0 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 74.0 (C-6), 69.4 (C-4), 68.2 (C-8), 67.2 (C-7), 62.3 (C-9), 53.8 (ArCH_2N), 52.9 (OMe), 49.3 (C-5), 37.6 (C-3), 30.8 (ArCH_2Ar), 23.4 (SCH_2), 23.15, 21.3, 20.80, and 20.76 (CH_3CO), 23.10 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 10.2 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); MALDI-TOF MS (2995.19): 3018.7 ($\text{M}^+ + \text{Na}$), 3034.7 ($\text{M}^+ + \text{K}$). Anal. Calcd. for $\text{C}_{136}\text{H}_{176}\text{N}_{16}\text{O}_{52}\text{S}_4$: C, 54.54; H, 5.92; N, 7.48. Found: C, 54.73; H, 6.01; N, 7.62.

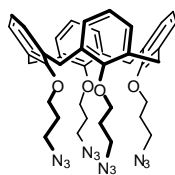
5,11,17,23-Tetrakis[{{4-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-2-thio- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl}}-25,26,27,28-tetrapropoxy-calix[4]arene (17).



The sialoccluster **16** (30 mg, 0.01 mmol) was deacetylated and demethylated as described for the preparation of **13**. The crude product was eluted from a C18 silica gel cartridge with MeOH, concentrated, and dried under high vacuum to give **17** (18 mg, 80%) as an amorphous solid; $[\alpha]_D = +16.0$ (c 0.5, MeOH). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 7.86 (s, 4H, 4 H-5 Tr.), 6.69 (s, 8H, Ar), 5.32 (s, 8H, 4 ArCH₂N), 4.45 and 3.20 (2d, 8H, $J = 13.3$ Hz, 4 ArCH₂Ar), 4.15 and 4.05 (2d, 8H, $J = 14.5$ Hz, 4 SCH₂), 3.87 (t, 8H, $J = 7.5$ Hz, 4 CH₃CH₂CH₂O), 3.81-3.72 (m, 16H), 3.67-3.59 (m, 4H), 3.58-3.50 (m, 8H), 2.86 (bd, 4H, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.0$ Hz, 4 H-3eq), 2.03 (s, 12H, 4 Ac), 1.95 (tq, 8H, $J = 7.5, 7.5$ Hz, 4 CH₃CH₂CH₂O), 1.76-1.68 (m, 4H, 4 H-3ax), 1.02 (t, 12H, $J = 7.5$ Hz, 4 CH₃CH₂CH₂O). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 175.4 (C), 174.3 (C), 158.0 (C), 146.4 (C), 136.7 (C), 130.2 (C), 129.5 (CH), 124.8 (CH), 86.1 (C), 78.1 (CH₂), 76.9 (CH), 70.3 (CH), 69.5 (CH), 64.5 (CH₂), 54.9 (CH₂), 53.9 (CH), 42.5 (CH₂), 31.7 (CH₂), 24.6 (CH₂), 24.4 (CH₂), 22.7 (CH₃), 10.7 (CH₃). ESI MS (2266.50): 1134.4 (M+2)/2, 756.7 (M+3)/3. Anal. Calcd. for C₁₀₀H₁₃₆N₁₆O₃₆S₄: C, 52.99; H, 6.05; N, 9.89. Found: C, 52.88; H, 6.11; N, 9.80.

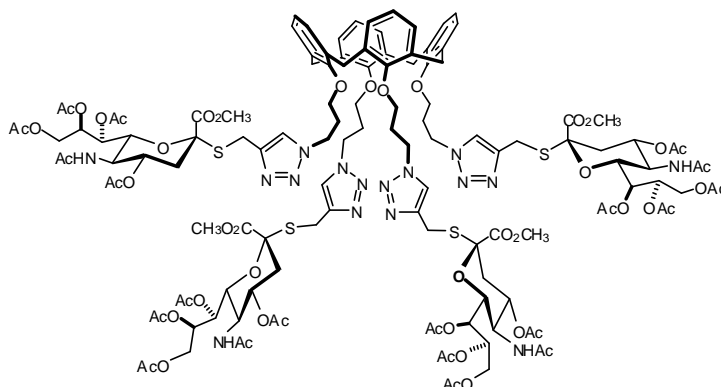
25,26,27,28-Tetrakis(3-hydroxypropoxy)-calix[4]arene (19).

To a cooled (0 °C), stirred solution of **18** (1.17 g, 2.0 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was added dropwise 9-boracyclo[3.3.1]nonane (48 mL, 24.0 mmol, of a 0.5 M solution in hexane). The solution was allowed to reach room temperature in 1.5 h, then cooled to 0 °C and slowly diluted with 10 M NaOH (1.5 mL) and 35% H₂O₂ (3.8 mL). The mixture was stirred at room temperature for 30 min and then warmed to 60 °C. Stirring was continued for an additional 1.5 h, then the mixture was cooled to room temperature, diluted with 1 M phosphate buffer at pH 7 (50 mL), concentrated to remove the organic solvents, and extracted with CH₂Cl₂ (2 x 100 mL). The combined organic phases were dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residue was eluted from a short column (5 x 5 cm) of silica gel with AcOEt, then 1:1 AcOEt-acetone, acetone, and 9:1 acetone-MeOH to give **19** (0.96 g, 73%) as a white solid. Mp 256-257 °C (Acetone). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃ + D₂O): δ 6.67-6.58 (m, 12H, Ar), 4.42 and 3.23 (2d, 8H, *J* = 13.5 Hz, 4 ArCH₂Ar), 4.08 (t, 8H, *J* = 7.0 Hz, 4 HOCH₂CH₂CH₂O), 3.90 (t, 8H, *J* = 6.3 Hz, 4 HOCH₂CH₂CH₂O), 2.20 (s, 3H, 0.5 (CH₃)₂CO), 2.18 (tt, 8H, *J* = 6.3, 7.0 Hz, 4 HOCH₂CH₂CH₂O). ¹³C NMR (75 MHz): δ 155.8 (C Ar), 134.9 (C Ar), 128.3 (CH Ar), 122.3 (CH Ar), 72.4 (HOCH₂CH₂CH₂O), 60.2 (HOCH₂CH₂CH₂O), 32.9 (HOCH₂CH₂CH₂O), 30.9 (ArCH₂Ar); MALDI-TOF MS (656.80): 679.8 (M⁺ + Na), 695.8 (M⁺ + K). Anal. Calcd. for C₄₀H₄₈O₈·0.5(CH₃)₂CO C, 72.68; H, 7.49. Found: C, 72.76; H, 7.54.

25,26,27,28-Tetrakis(3-azidopropoxy)-calix[4]arene (20).

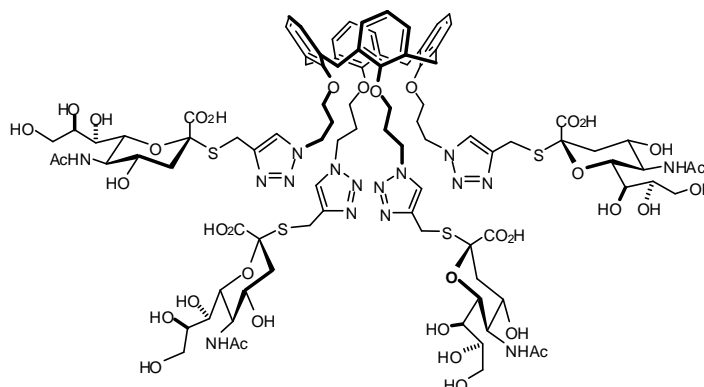
The calixarene tetrol **19** (328 mg, 0.50 mmol) was azidated as described for the preparation of **15** to give, after column chromatography on silica gel (3:1 CH₂Cl₂-cyclohexane), **20** (253 mg, 67%) as a white solid. Mp 108-110 °C (MeOH). ¹H NMR (300 MHz): δ 6.63 (s, 12H, Ar), 4.36 and 3.24 (2d, 8H, *J* = 13.5 Hz, 4 ArCH₂Ar), 4.00 (t, 8H, *J* = 7.0 Hz, 4 N₃CH₂CH₂CH₂O), 3.55 (t, 8H, *J* = 6.7 Hz, 4 N₃CH₂CH₂CH₂O), 2.18 (tt, 8H, *J* = 6.7, 7.0 Hz, 4 N₃CH₂CH₂CH₂O). ¹³C NMR (75 MHz): δ 155.8 (C), 134.7 (C), 128.4 (CH), 122.6 (CH), 71.8 (CH₂), 48.7 (CH₂), 30.9 (CH₂), 29.5 (CH₂); MALDI-TOF MS (756.86): 780.0 (M⁺ + Na). Anal. Calcd. for C₄₀H₄₄N₁₂O₄: C, 63.48; H, 5.86; N, 22.21. Found: C, 63.61; H, 5.94; N, 22.30.

25,26,27,28-Tetrakis{{3-{{4-[(methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate)methyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}}propoxy}}-calix[4]arene (21).

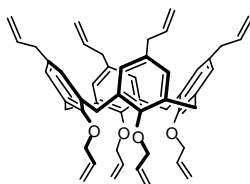


The cycloaddition between the tetra-azide **20** (92 mg, 0.10 mmol) and propargyl thiosialoside **10** (262 mg, 0.48 mmol) was carried out as described for the preparation of **12** to give, after acetylation of the crude mixture and column chromatography on silica gel (2:1 acetone-AcOEt, then acetone), **21** (156 mg, 53%) as a white solid. Mp 144-146 (dec.) (AcOEt-cyclohexane); $[\alpha]_D = +41.0$ (c 1.5, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz): δ 7.55 (s, 4H, 4 H-5 Tr.), 6.58 (s, 12H, Ar), 5.44 (ddd, 4H, $J_{7,8} = 8.7$, $J_{8,9a} = 2.9$, $J_{8,9b} = 5.3$ Hz, 4 H-8), 5.35 (d, 4H, $J_{5,\text{NH}} = 10.0$ Hz, 4 NH), 5.34 (dd, 4H, $J_{6,7} = 2.3$ Hz, 4 H-7), 4.87 (ddd, 4H, $J_{3\text{ax},4} = 11.5$, $J_{3\text{eq},4} = 4.5$, $J_{4,5} = 10.6$ Hz, 4 H-4), 4.50 (t, 8H, $J = 6.8$ Hz, 4 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.30 (dd, 4H, $J_{9a,9b} = 12.5$ Hz, 4 H-9a), 4.30 and 3.15 (2d, 8H, $J = 13.6$ Hz, 4 ArCH_2Ar), 4.09 (dd, 4H, 4 H-9b), 4.07 (ddd, 4H, $J_{5,6} = 10.8$ Hz, 4 H-5), 4.02 and 3.94 (2d, 8H, $J = 14.2$ Hz, 4 SCH_2), 3.93 (t, 8H, $J = 7.0$ Hz, 4 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.86 (dd, 4H, 4 H-6), 3.68 (s, 12H, 4 OMe), 2.72 (dd, 4H, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.8$ Hz, 4 H-3eq), 2.42 (tt, 8H, $J = 6.8$, 7.0 Hz, 4 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.16, 2.14, 2.02, 2.01, and 1.88 (5s, 60H, 20 Ac), 1.99 (dd, 4H, 4 H-3ax). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz): δ 170.8, 170.3, 170.1, and 168.2 (CO), 155.7 (C Ar), 143.2 (C-4 Tr.), 134.6 (C Ar), 128.5 (CH Ar), 122.9 (CH Ar), 122.6 (C-5 Tr.), 82.9 (C-2), 74.0 (C-6), 71.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 69.5 (C-4), 68.2 (C-8), 67.2 (C-7), 62.3 (C-9), 53.1 (OMe), 49.2 (C-5), 47.4 76.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 37.6 (C-3), 30.9 (ArCH_2Ar , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 23.3 (SCH_2 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 23.2, 21.3, and 20.8 (CH_3CO); MALDI-TOF MS (2939.09): 2961.1 ($\text{M}^+ + \text{Na}$), 2977.1 ($\text{M}^+ + \text{K}$). Anal. Calcd. for $\text{C}_{132}\text{H}_{168}\text{N}_{16}\text{O}_{52}\text{S}_4$: C, 53.94; H, 5.76; N, 7.63. Found: C, 54.08; H, 5.82; N, 7.80.

25,26,27,28-Tetrakis[{3-{4-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-2-thio- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}propoxy]}-calix[4]arene (22).

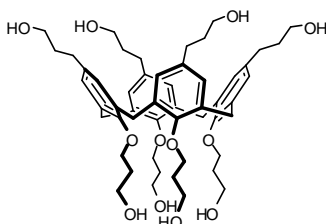


The sialoccluster **21** (59 mg, 0.02 mmol) was deacetylated and demethylated as described for the preparation of **13**. The crude product was eluted from a C18 silica gel cartridge with 1:1 H₂O-MeOH, then MeOH, concentrated, and dried under high vacuum to give **22** (22 mg, 50%) as a white solid. Mp 192-194 (dec.) (AcOEt); $[\alpha]_D = +28.9$ (*c* 0.9, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.95 (s, 4H, 4 H-5 Tr.), 6.63-6.55 (m, 12H, Ar), 4.58 (t, 8H, *J* = 6.7 Hz, 4 CH₂CH₂CH₂O), 4.36 and 3.15 (2d, 8H, *J* = 13.6 Hz, 4 ArCH₂Ar), 4.12 and 4.01 (2d, 8H, *J* = 14.5 Hz, 4 SCH₂), 3.92 (t, 8H, *J* = 6.6 Hz, 4 CH₂CH₂CH₂O), 3.84-3.71 (m, 16H), 3.61 (dd, 4H, *J*_{8,9b} = 5.4, *J*_{9a,9b} = 11.3 Hz, 4 H-9b), 3.54-3.48 (m, 8H), 2.79 (dd, 4H, *J*_{3eq,4} = 4.5, *J*_{3ax,3eq} = 12.8 Hz, 4 H-3eq), 2.47 (tt, 8H, *J* = 6.6, 6.7 Hz, 4 CH₂CH₂CH₂O), 2.00 (s, 12H, 4 Ac), 1.79 (dd, 4H, *J*_{3ax,4} = 10.8, 4 H-3ax). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 175.2 (C), 173.0 (C), 157.1 (C), 145.6 (C), 136.1 (C), 129.6 (CH), 125.2 (CH), 123.6 (CH), 84.2 (C), 77.2 (CH), 72.7 (CH), 72.7 (CH₂), 70.2 (CH), 69.1 (CH), 64.5 (CH₂), 53.7 (CH), 48.9 (CH₂), 42.0 (CH₂), 32.0 (CH₂), 24.5 (CH₂), 22.7 (CH₃). ESI MS (2210.39): 1106.2 (M+2)/2, 738.0 (M+3)/3. Anal. Calcd. for C₉₆H₁₂₈N₁₆O₃₆S₄: C, 52.16; H, 5.84; N, 10.14. Found: C, 52.10; H, 5.89; N, 10.03.

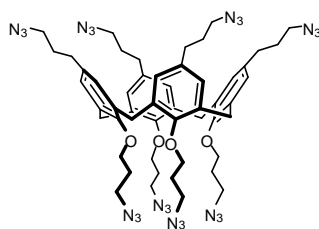
5,11,17,23-Tetra-allyl-25,26,27,28-allyloxy-calix[4]arene (24).

To a cooled (0 °C), stirred solution of tetrol **23** (1.05 g, 1.8 mmol) in DMF (18 mL) was added NaH (0.43 g, 10.8 mmol, of a 60% dispersion in oil) and, after 15 min, allyl bromide (0.75 mL, 8.6 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 h, then diluted with CH₃OH (1 mL) and, after 10 min, diluted with 1 M phosphate buffer at pH 7 (50 mL) and extracted with Et₂O (2 x 100 mL). The combined organic phases were dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 2:1 cyclohexane-CH₂Cl₂ to give **24** (1.31 g, 98%) as a syrup. ¹H NMR (300 MHz): δ 6.50 (s, 8H, Ar), 6.38 (ddt, 4H, *J* = 6.4, 10.3, 17.2 Hz, 4 CH₂=CHCH₂O), 5.82 (ddt, 4H, *J* = 6.5, 10.2, 17.0 Hz, 4 ArCH₂CH=CH₂), 5.27 (ddt, 4H, *J* = 1.5, 1.5, 17.2 Hz, H_{cis} of 4 CH₂=CHCH₂O), 5.19 (ddt, 4H, *J* = 1.1, 1.5, 10.3 Hz, H_{trans} of 4 CH₂=CHCH₂O), 4.98 (ddt, 4H, *J* = 1.5, 1.8, 10.2 Hz, H_{trans} of 4 ArCH₂CH=CH₂), 4.90 (ddt, 4H, *J* = 1.8, 1.8, 17.0 Hz, H_{cis} of 4 ArCH₂CH=CH₂), 4.46 (ddd, 8H, *J* = 1.1, 1.5, 6.4 Hz, 4 CH₂=CHCH₂O), 4.38 and 3.10 (2d, 8H, *J* = 13.0 Hz, 4 ArCH₂Ar), 3.09 (ddd, 8H, *J* = 1.5, 1.8, 6.5 Hz, 4 ArCH₂CH=CH₂). ¹³C NMR (75 MHz): δ 154.1 (C), 138.2 (CH), 135.9 (CH), 134.9 (C), 133.2 (C), 128.3 (CH), 116.7 (CH₂), 114.9 (CH₂), 75.9 (CH₂), 39.4 (CH₂), 31.3 (CH₂), 26.9 (CH₂). MALDI-TOF MS (745.00): 767.9 (M⁺ + Na), 783.9 (M⁺ + K). Anal. Calcd. for C₅₂H₅₆O₄: C, 83.83; H, 7.58. Found: C, 84.02; H, 7.70.

5,11,17,23-Tetrakis(3-hydroxypropyl)-25,26,27,28-tetrakis(3-hydroxypropoxy)-calix[4]arene (25).

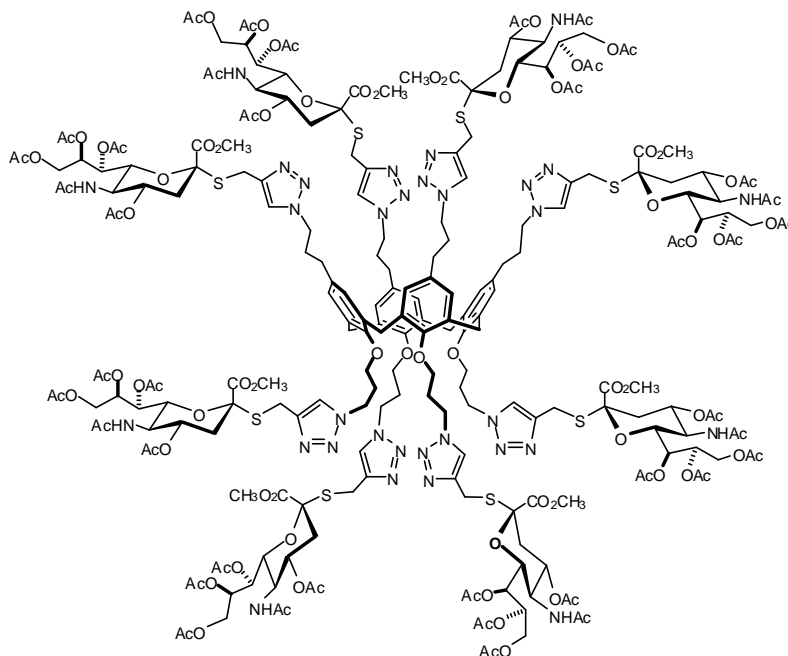


The octa-allyl-calixarene **24** (372 mg, 0.50 mmol) was submitted to the hydroboration-oxidation as described for the preparation of **19**. The crude mixture was triturated with cyclohexane, then Et₂O, and finally with AcOEt to give **25** (386 mg, 87%) as a white solid. Mp. 213-215 °C (Acetone). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆ + D₂O): δ 6.47 (s, 8H, Ar), 4.28 and 3.05 (2d, 8H, *J* = 12.7 Hz, 4 ArCH₂Ar), 3.86 (t, 8H, *J* = 7.3 Hz, 4 HOCH₂CH₂CH₂O), 3.57 (t, 8H, *J* = 6.3 Hz, 4 HOCH₂CH₂CH₂O), 3.30 (t, 8H, *J* = 6.3 Hz, 4 ArCH₂CH₂CH₂OH), 2.24 (t, 8H, *J* = 7.5 Hz, 4 ArCH₂CH₂CH₂OH), 2.03 (tt, 8H, *J* = 6.3, 7.3 Hz, 4 HOCH₂CH₂CH₂O), 1.48 (tt, 8H, *J* = 6.3, 7.5 Hz, 4 ArCH₂CH₂CH₂OH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 154.0 (C), 134.9 (C), 134.0 (C), 127.7 (CH), 72.3 (CH₂), 60.0 (CH₂), 58.1 (CH₂), 34.3 (CH₂), 33.0 (CH₂), 31.0 (CH₂). MALDI-TOF MS (889.12): 912.1 (M⁺ + Na). Anal. Calcd. for C₅₂H₇₂O₁₂: C, 70.24; H, 8.16. Found: C, 70.40; H, 8.27.

5,11,17,23-Tetrakis(3-azidopropyl)-25,26,27,28-tetrakis(3-azidopropoxy)-calix[4]arene (26).

The calixarene octaol **25** (178 mg, 0.20 mmol) was azidated as described for the preparation of **15** to give, after column chromatography on Sephadex LH-20 (CH_2Cl_2), **26** (113 mg, 52%) as a dark yellow syrup. An analytical sample was obtained by chromatography on preparative TLC (silica gel 60, 0.5 mm, 3.5:1 CH_2Cl_2 -cyclohexane). ^1H NMR (300 MHz): δ 6.48 (s, 8H, Ar), 4.30 and 3.15 (2d, 8H, $J = 13.4$ Hz, 4 ArCH_2Ar), 3.97 (t, 8H, $J = 7.2$ Hz, 4 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.54 (t, 8H, $J = 6.7$ Hz, 4 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.19 (t, 8H, $J = 6.8$ Hz, 4 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.40 (t, 8H, $J = 7.5$ Hz, 4 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.73 (tt, 8H, $J = 6.8, 7.2$ Hz, 4 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.73 (tt, 8H, $J = 6.7, 7.5$ Hz, 4 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 154.0 (C Ar), 134.6 (C Ar), 134.4 (C Ar), 128.3 (CH Ar), 72.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 50.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 48.7 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 32.0 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 30.9 (ArCH_2Ar), 30.5 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 29.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$). MALDI-TOF MS (1089.22): 1112.4 ($\text{M}^+ + \text{Na}$). Anal. Calcd. for $\text{C}_{52}\text{H}_{64}\text{N}_{24}\text{O}_4$: C, 57.34; H, 5.92; N, 30.86. Found: C, 57.56; H, 6.08; N, 31.01.

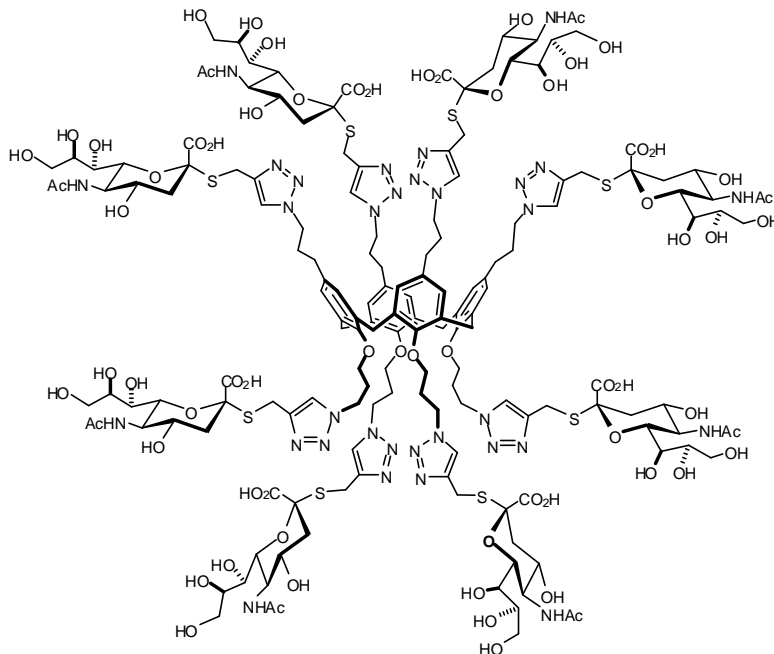
5,11,17,23-Tetrakis{**3**-{**4**-[(methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate)methyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}propyl}}-**25,26,27,28-tetrakis**{**3**-{**4**-[(methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate)methyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}propoxy}}-calix[4]arene (**27**).



The cycloaddition between the octa-azide **26** (44 mg, 0.04 mmol) and propargyl thiosialoside **10** (209 mg, 0.38 mmol) was carried out as described for the preparation of **12**. The crude mixture was acetylated (1:1 pyridine-acetic anhydride) at room temperature for 3 h and concentrated. A solution of the residue in AcOEt 40 mL) was washed with phosphate buffer at pH 7 (10 mL) and water (10 mL), then concentrated. The residue was eluted from a column of Sephadex LH-20 with 1:1 CH₂Cl₂-MeOH to give **27** (157 mg, 72%) as a light brown solid. In order to obtain an analytical sample, compound **27** was deacetylated under basic conditions (MeOH, Dowex 1X8 resin, r.t., 48 h), eluted from a C18 silica gel cartridge with MeOH, and acetylated (1:1 pyridine-Ac₂O, r.t., 14 h). A solution of the residue in CH₂Cl₂ was washed with water and concentrated to give **27** as a colorless amorphous solid; $[\alpha]_D = +43.8$ (*c* 0.5, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 120 °C) selected data: δ 7.84 (s, 4H, 4 H-5 Tr.), 7.79 (s, 4H, 4 H-5 Tr.), 7.38 (bd, 8H, $J_{5,NH} = 9.0$ Hz, 8 NH), 6.53 (s, 8H, Ar), 5.37-5.30 (m, 8H, 8 H-8), 5.21 (bd, 8H, $J_{7,8} = 7.0$ Hz, 8 H-7), 4.82 (ddd, 8H, $J_{3ax,4} = 11.0$, $J_{3eq,4} = 4.5$, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, 8 H-4), 4.50 (t, 8H, $J = 6.8$ Hz, 4 CH₂CH₂CH₂O), 4.20 (t, 8H, $J = 6.6$ Hz, 4 ArCH₂CH₂CH₂), 3.77 (s, 12H, 4 OMe), 3.75 (s, 12H, 4 OMe), 3.12 (d, 4H, $J = 13.0$ Hz, 4 Heq of 4 ArCH₂Ar), 2.71 (dd, 8H, $J_{3ax,3eq} = 12.8$ Hz, 8 H-3eq), 2.08 and 2.07 (2s, 24H,

8 Ac), 2.04 (s, 24H, 8 Ac), 1.96 and 1.95 (2s, 24H, 8 Ac), 1.94 (s, 24H, 8 Ac), 1.84 (dd, 8H, 8 H-3ax), 1.72 (s, 24H, 8 Ac). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) selected data: δ 170.0, 169.6, 169.4, 169.2, 169.0, and 168.0 (CO), 153.7 (C Ar), 141.8 (C-4 Tr.), 141.7 (C-4 Tr.), 134.0 (C Ar), 128.0 (CH Ar), 123.2 (C-5 Tr.), 123.0 (C-5 Tr.), 82.6 (C-2), 73.5 (C-6), 69.4 (C-4), 67.5 (C-8), 66.9 (C-7), 61.8 (C-9), 53.0 (OMe), 47.6 (C-5), 37.2 (C-3), 22.5, 20.9, and 20.5 (CH₃CO); MALDI-TOF MS (5453.69): 5477.8 ($\text{M}^+ + \text{H} + \text{Na}$), 5492.7 ($\text{M}^+ + \text{K}$). Anal. Calcd. for C₂₃₆H₃₁₂N₃₂O₁₀₀S₈: C, 51.97; H, 5.77; N, 8.22. Found: C, 52.26; H, 5.89; N, 8.40.

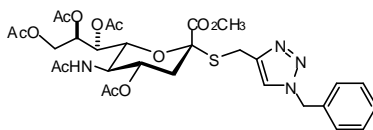
5,11,17,23-Tetrakis{{3-{{4-{{(5-acetamido-3,5-dideoxy-2-thio- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}propyl}}-25,26,27,28-tetrakis{{3-{{4-{{(5-acetamido-3,5-dideoxy-2-thio- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}propoxy}}-calix[4]arene (28).



A solution of **27** (54 mg, 0.01 mmol) in a 0.2 M solution of NaOMe in MeOH (3 mL, prepared from Na and MeOH immediately before the use) was stirred at room temperature in a nitrogen atmosphere. After 1.5 h the solution turned turbid, therefore was diluted with H₂O (ca. 1 mL) and stirred for an additional 2 h, then neutralized with Dowex 50X2-400 resin (H⁺ form, activated and washed with H₂O and MeOH immediately before the use), and filtered through a sintered glass filter. The resin was washed with H₂O and MeOH, and the solution was concentrated. A solution of the methyl ester octa-adduct in 0.2 M aqueous NaOH (3 mL) was kept at room temperature for 24 h in a nitrogen atmosphere, then neutralized with Dowex 50X2-400 resin, and filtered through a sintered glass filter. The resin was washed with H₂O, and the solution was concentrated. The residue was eluted from a C18 silica gel cartridge with H₂O-MeOH (from 2:1 to 1:1), then MeOH, and dried under high vacuum to give **28** (24 mg, 61%) an amorphous solid; $[\alpha]_D = +6.7$ (*c* 0.2, H₂O). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆ + D₂O, 120 °C) selected data: δ 7.88 (bs, 4H, 4 H-5 Tr.), 7.81 (bs, 4H, 4 H-5 Tr.), 6.45 (s, 8H, Ar), 1.90 (s, 24H, 8 Ac). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) selected data: δ 173.5 (C), 172.0 (C), 144.9 (C), 134.8 (C), 128.7 (CH), 124.0 (CH), 85.8 (C),

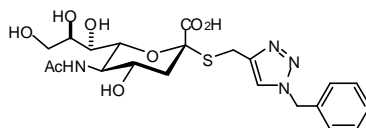
75.5 (CH), 71.9 (CH), 69.3 (CH), 68.1 (CH), 63.4 (CH₂), 53.1 (CH), 49.5 (CH₂), 47.5 (CH₂), 42.2 (CH₂), 31.7 (CH₂), 30.5 (CH₂), 23.9 (CH₂), 23.0 (CH₃). ESI MS (3996.30): 1332.9 (M+3)/3, 1000.6 (M+4)/4. Anal. Calcd. for C₁₆₄H₂₃₂N₃₂O₆₈S₈: C, 49.29; H, 5.85; N, 11.22. Found: C, 49.15; H, 5.92; N, 11.13.

1-Benzyl-4-[(methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate)methyl]-1*H*-1,2,3-triazole (29).



A mixture of benzyl bromide (150 μ L, 1.26 mmol), sodium azide (246 mg, 3.78 mmol), and MeOH (2.5 mL) was stirred at room temperature for 16 h, then partially concentrated using a stream of nitrogen, diluted with H₂O (10 mL), and extracted with Et₂O (2 x 20 mL). The combined organic phases were dried (Na₂SO₄), the solvent was partially removed under vacuum, and the solution concentrated to dryness using a stream of nitrogen to give benzyl azide as a colorless oil, which was used in the next step without further purification. A mixture of crude benzyl azide (ca. 1.25 mmol), propargyl thiosialoside **10** (138 mg, 0.25 mmol), freshly distilled *N,N*-diisopropylethylamine (220 μ L, 1.26 mmol), CuI (12 mg, 0.06 mmol), and anhydrous DMF (2.5 mL) was sonicated in an ultrasound cleaning bath for 1 min, then magnetically stirred in the dark at room temperature for 6 h, and concentrated. A solution of the residue in pyridine (1 mL) and acetic anhydride (1 mL) was kept at room temperature for 14 h, then concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with AcOEt to give **29** (134 mg, 78%) as a colorless syrup; $[\alpha]_D = +37.0$ (*c* 1.3, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz): δ 7.48 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.42-7.28 (m, 5H, Ar), 5.56 and 5.47 (2d, 2H, *J* = 14.8 Hz, PhCH₂), 5.45 (ddd, 1H, *J*_{7,8} = 8.9, *J*_{8,9a} = 2.7, *J*_{8,9b} = 5.5 Hz, H-8), 5.32 (dd, 1H, *J*_{6,7} = 2.1 Hz, H-7), 5.17 (d, 1H, *J*_{5,NH} = 10.0 Hz, NH), 4.87 (ddd, 1H, *J*_{3ax,4} = 11.6, *J*_{3eq,4} = 4.5, *J*_{4,5} = 10.6 Hz, H-4), 4.30 (dd, 1H, *J*_{9a,9b} = 12.5 Hz, H-9a), 4.07 (dd, 1H, H-9b), 4.06 (ddd, 1H, *J*_{5,6} = 10.8 Hz, H-5), 4.01 and 3.97 (2d, 2H, *J* = 13.5 Hz, SCH₂), 3.85 (dd, 1H, H-6), 3.58 (s, 3H, OMe), 2.72 (dd, 1H, *J*_{3ax,3eq} = 12.7 Hz, H-3eq), 2.16, 2.14, 2.04, 2.02, and 1.89 (5s, 15H, 5 Ac), 1.99 (dd, 1H, H-3ax). ¹³C NMR (75 MHz): δ 170.8, 170.7, 170.2, 170.1, and 168.1 (CO), 143.9 (C-4 Tr.), 134.7 (C Ar), 129.0 (CH Ar), 128.7 (CH Ar), 128.1 (CH Ar), 122.4 (C-5 Tr.), 82.7 (C-2), 73.9 (C-6), 69.4 (C-4), 68.1 (C-8), 67.2 (C-7), 62.3 (C-9), 54.0 (PhCH₂), 52.8 (OMe), 49.3 (C-5), 37.6 (C-3), 23.14 (SCH₂), 23.10, 21.1, 20.8, and 20.7 (CH₃CO); MALDI-TOF MS (678.71): 701.2 (M⁺ + Na), 717.8 (M⁺ + K). Anal. Calcd. for C₃₀H₃₈N₄O₁₂S: C, 53.09; H, 5.64; N, 8.25. Found: C, 53.26; H, 5.77; N, 8.40.

1-Benzyl-4-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-2-thio- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid)methyl]-1*H*-1,2,3-triazole (30**).**



The thioglycoside **29** (68 mg, 0.10 mmol) was deacetylated as described for the preparation of **13** to give crude 1-benzyl-4-[(methyl 5-acetamido-3,5-dideoxy-2-thio- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate)methyl]-1*H*-1,2,3-triazole (52 mg). ^1H NMR (300 MHz, D_2O) selected data: δ 7.78 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.33-7.22 (m, 5H, Ar), 5.43 (s, 2H, PhCH_2), 3.95 and 3.80 (2d, 2H, $J = 11.0$ Hz, SCH_2), 3.24 (s, 3H, OMe), 2.62 (dd, 1H, $J_{3\text{eq},4} = 4.6$, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.9$ Hz, H-3eq), 1.88 (s, 3H, Ac), 1.70 (dd, 1H, $J_{3\text{ax},4} = 11.6$ Hz, H-3ax). The crude methyl ester derivative was hydrolyzed as described for the preparation of **13** to give, after chromatography (C18 silica gel cartridge, 2:1 MeOH- H_2O) **30** (48 mg, 96%) as an amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}} = +1.8$ (c 0.2, MeOH). ^1H NMR (300 MHz, D_2O) selected data: δ 7.78 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.32-7.26 (m, 3H, Ar), 7.24-7.18 (m, 2H, Ar), 5.46 (s, 2H, PhCH_2), 3.88 and 3.78 (2d, 2H, $J = 15.0$ Hz, SCH_2), 3.66 (dd, 1H, $J_{4,5} = J_{5,6} = 10.3$ Hz, H-5), 3.52 (ddd, 1H, $J_{3\text{ax},4} = 11.2$, $J_{3\text{eq},4} = 4.8$ Hz, H-4), 2.64 (dd, 1H, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.8$ Hz, H-3eq), 1.88 (s, 3H, Ac), 1.68 (dd, 1H, H-3ax). ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ 175.2 (C), 174.0 (C), 145.6 (C), 135.0 (C), 129.3 (CH), 128.9 (CH), 128.2 (CH), 124.4 (CH), 86.4 (C), 74.9 (CH), 71.9 (CH), 68.7 (CH), 68.1 (CH), 62.5 (CH_2), 54.0 (CH_2), 51.8 (CH), 40.8 (CH_2), 23.7 (CH_2), 22.2 (CH_3). Anal. Calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$: C, 50.80; H, 5.68; N, 11.28. Found: C, 50.68; H, 5.75; N, 11.20.

Cells and viruses

Vero and MDCK cells were grown and propagated in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Prototype BK virus (BKV) was grown in Vero cells as described previously.⁶¹ BKV was titrated by haemagglutination of type 0 human erythrocytes⁶² and by the fluorescent antibody (FA) focus assay in Vero cells.⁶³ Influenza A virus (H3N2 strain) was grown in MDCK cell monolayers and viral haemagglutination units (HAU) were determined as described previously.⁶⁴

Haemagglutination and haemagglutination-inhibition assays

Haemagglutination titration was carried out in plastic 96-well microplate. 25 µL of virus were diluted serially with 25 µL of phosphate-buffered saline (PBS) and to each dilution was added 50 µL of a 1% suspension of group 0 human red cells. After the addition of erythrocytes the microplate was kept at 4 °C for 5 h. The haemagglutination titer was calculated on the basis of the highest virus dilution that gave a complete haemagglutination.

For haemagglutination-inhibition titrations, the compounds were diluted serially with 25 µL of PBS on a microtiter plate. A 25 µL of viral suspension containing four haemagglutination doses were added to each well and the mixture was kept at 37 °C for 1 h. Then 50 µL of a 1% suspension of red cells in PBS were added to each well. The results were read after 5 h of incubation at 4 °C. The haemagglutination-inhibition titer was defined as the maximum dilution of each compound that caused complete inhibition of viral haemagglutination. As a control, anti-BKV antibodies were examined in the same manner.

Neutralisation assay of viral infectivity

Neutralisation of viral infectivity was carried out by incubating different amounts of each compound with 10-50 TCID₅₀ (50% tissue-culture infectious dose) of BKV or influenza A virus at 37 °C for 1 h. Then, the suspensions were added to Vero or MDCK monolayers and, after 2 h at 37 °C, the inoculum was removed, the monolayers were washed three times with DMEM, and then incubated in the medium containing 2% FCS. The cultures were observed by light microscope for the presence of viral cytopathic effects (CPE) for 3-5 days. As a positive control, two cultures were infected with the virus alone and as a negative control, two monolayers were inoculated with the virus pre-treated with anti-BKV antibodies. Then, when the positive controls developed CPE, the

medium of each well was frozen awaiting to determine the presence of virions by haemagglutination.

Immunofluorescence

Viral coat protein antigens were detected by indirect immunofluorescence. Subconfluent cell monolayers, cultured on cover slips, were infected with BKV, pre-treated or not with the sugar derivatives under examination. Four to six days after infection, cultures were fixed for 10 min in cold acetone, incubated at 37 °C for 30 min with rabbit serum to BKV coat antigens, washed three times in PBS, and incubated at 37 °C for 30 min with fluorescein-conjugated goat anti-rabbit IgGs (Antibodies Incorporated, Davis, CA). After extensive washing in PBS, the preparations were mounted in buffered glycerol and observed with a fluorescence microscope. Specific antiserum to BKV coat antigens was produced in rabbits hyperimmunized with purified BKV.

3.6 References

1. For recent reviews, see: (a) Angata, T.; Varki, A. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 439-469. (b) Kiefel, M. J.; von Itzstein, M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 471-490. (c) Hemeon, I.; Bennet, A. J. *Synthesis* **2007**, 1899-1926.
2. (a) Yarema, K. J.; Bertozzi, C. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 49-61. (b) Lingwood, C. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 695-700. (c) Lanctot, P. M.; Gage, F. H.; Varki, A. P. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 373-380.
3. For reviews, see: (a) Dugan, A. S.; Eash, S.; Atwood, W. J. *Transpl. Infect. Dis.* **2006**, *8*, 62-67. (b) Randhawa, P.; Brennan, D. C. *Am. J. Transplant.* **2006**, *6*, 2000-2005.
4. (a) Israel, M. A.; Martin, M. A.; Takemoto, K. K.; Howley, P. M.; Aaronson, S. A.; Solomon, D.; Khoury, G. *Virology* **1978**, *90*, 187-196. (b) Pater, M. M.; Pater, A.; Fiori, M.; Slota, J.; Di Mayorca, G. In *Viruses in Naturally Occurring Cancers*. Essex, M.; Todaro G.; zur Hausen, H. (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1980, pp 329-341.
5. Goudsmit, J.; Wetheim-van Dillen, P.; van Strien, A.; van der Noordaa, J. *J. Med. Virol.* **1982**, *10*, 91-99.
6. (a) Elsner, C.; Dörries, K. *Virology* **1992**, *191*, 72-80. (b) Dörries, K.; Vogel, E.; Günther, S.; Czub, S. *Virology* **1994**, *198*, 59-70. (c) De Mattei, M.; Martini, F.; Tognon, M.; Serra, M.; Baldini, N.; Barbanti-Brodano, G. *J. Infect. Dis.* **1994**, *169*, 1175-1176. (d) De Mattei, M.; Martini, F.; Corallini, A.; Gerosa, M.; Scotlandi, K.; Carinci, P.; Barbanti-Brodano, G.; Tognon, M. *Int. J. Cancer* **1995**, *61*, 756-760. (e) Dolei, A.; Pietropaolo, V.; Gomes, E.; Di

- Taranto, C.; Ziccheddu, M.; Spanu, M. A.; Lavorino, C.; Manca, M.; Degener, A. M. *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 1967-1973.
7. Monini, P.; De Lellis, L.; Barbanti-Brodano, G. In *DNA Tumor Viruses: Oncogenic Mechanisms*. Barbanti-Brodano, G.; Bendinelli, M.; Friedman H (eds). Plenum Press: New York, 1995, pp. 51-73.
 8. Pietropaolo, V.; Di Taranto, C.; Degener, A. M.; Jin, L.; Sinibaldi, L.; Baiocchini, A.; Melis, M.; Orsi, N. *J. Med. Virol.* 1998, *56*, 372-376.
 9. (a) Bratt, G.; Hammarin, A. L.; Grandien, M.; Hedquist, B. G.; Nennesmo, I.; Sundelin, B.; Seregard, S. *AIDS* **1999**, *13*, 1071-1075. (b) Cubukcu-Dimopulo, O.; Greco, A.; Kumar, A.; Karluk, D.; Mittal, K.; Jagirdar, J. *Am. J. Surg. Pathol.* **2000**, *24*, 145-149. (c) Nিকেleit, V.; Klimkait, T.; Binet, I. F.; Dalquen, P.; Del Zenero, V.; Thiel, G.; Mihatsch, M. J.; Hirsch, H. H. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *342*, 1309-1315. (d) Replöeg, M. D.; Storch, G. A.; Clifford, D. B. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, *33*, 191-202.
 10. (a) Azzi, A.; Fanci, R.; Bosi, A.; Ciappi, S.; Zakrzewska, K.; de Santis, R.; Laszlo, D.; Guidi, S.; Saccardi, R.; Vannucchi, A. M. *Bone Marrow Transplant.* **1994**, *14*, 235-240. (b) Stoner, G. L.; Alappan, R.; Jobes, D. V.; Ryschkewitsch, C. F.; Landry, M. L. *Am. J. Kidney Dis.* **2002**, *39*, 1102-1112.
 11. Corallini, A.; Tognon, M.; Negrini, M.; Barbanti-Brodano, G. In *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives*. Khalili, K.; Stoner, G. L. (eds). Wiley-Liss, Inc: New York, 2001, pp. 431-460.
 12. The possible causative role of BKV in human oncogenesis rests on the ability of BKV Tag to inactivate the functions of tumor suppressor proteins p53 and pRB family as well as on its ability to induce chromosomal aberrations in human cells.
 13. Seganti, L.; Mastromarino, P.; Superti, F.; Sinibaldi, L.; Orsi, N. *Acta Virol.* **1981**, *25*, 177-181.
 14. Sinibaldi, L.; Goldoni, P.; Pietropaolo, V.; Longhi, C.; Orsi, N. *Arch. Virol.* **1990**, *113*, 291-296.
 15. (a) Gilbert, J.; Dahl, J.; Riney, C.; You, J.; Cui, C.; Holmes, R.; Lencer, W.; Benjamin, T. *J. Virol.* **2005**, *79*, 615-618. (b) Dugan, A. S.; Eash, S.; Atwood, W. J. *J. Virol.* **2005**, *79*, 14442-14445. (c) Low, J. A.; Magnuson, B.; Tsai, B.; Imperiale, M. J. *J. Virol.* **2006**, *80*, 1361-1366.
 16. Hale, A. D.; Bartkeviciute, D.; Dargeviciute, A.; Jin, L.; Knowles, W.; Staniulis, J.; Brown, D. W. G.; Sasnauskas, K. *J. Virol. Methods* **2002**, *104*, 93-98.
 17. For a recent review, see: Gee, G. V.; Dugan, A. S.; Tsomaia, N.; Mierke, D. F.; Atwood, W. J. *Glycoconj. J.* **2006**, *23*, 19-26.

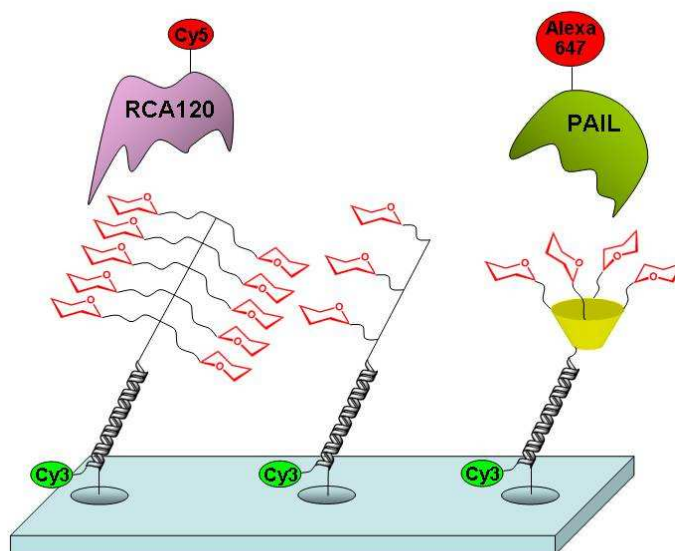
18. *N*-Modified sialic acids have been biosynthesized and directly incorporated into glycoconjugates of cultivated cells. In the presence of 5-*N*-propanoyl- and *N*-butanoyl-neuraminic acids the Vero cells were infected by BK virus more efficiently; on the other hand, when the 5-*N*-pentanoyl derivative was incorporated, the same cells became resistant to infection by BKV. See: Keppler, O. T.; Stehling, P.; Herrmann, M.; Kayser, H.; Grunow, D.; Reutter, W.; Pawlita, M. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1308-1314.
19. Reviews: (a) Zambon, M. C. *Rev. Med. Virol.* **2001**, *11*, 227-241. (b) Morens, D. M.; Fauci, A. S. *J. Infect. Dis.* **2007**, *195*, 1018-1028. (c) Gong, J.; Xu, W.; Zhang, J. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 113-122.
20. Reviews: (a) Poland, G. A.; Jacobson, R. M.; Targonski, P. V. *Vaccine* **2007**, *25*, 3057-3061. (b) Gauthier-Clerc, M.; Lebarbenchon, C.; Thomas, F. *Ibis* **2007**, *149*, 202-214. (c) Peiris, J. S. M.; de Jong, M. D.; Guan, Y. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20*, 243-267.
21. Russell, R. J.; Stevens, D. J.; Haire, L. F.; Gamblin, S. J.; Skehel, J. J. *Glycoconj. J.* **2006**, *23*, 85-92.
22. Wagner, R.; Matrosovich, M.; Klenk, H.-D. *Rev. Med. Virol.* **2002**, *12*, 159-166.
23. Recent studies have revealed the involvement of additional, non-sialic, carbohydrate lectin recognition in both A and B influenza viruses. See: (a) Stray, S. J.; Cummings, R. D.; Air, G. M. *Glycobiology* **2000**, *10*, 649-658. (b) Rapoport, E. M.; Mochalova, L. V.; Gabius, H.-J.; Romanova, J.; Bovin, N. V. *Glycoconj. J.* **2006**, *23*, 115-125.
24. Reviews: (a) De Clercq, E. *Nature Rev. Drug. Discov.* **2006**, *5*, 1015-1025. (b) Liu, Y.; Zhang, J.; Xu, W. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 2872-2891.
25. Matrosovich, M.; Klenk, H.-D. *Rev. Med. Virol.* **2003**, *13*, 85-97.
26. Weinhold, E. G.; Knowles, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9270-9275.
27. A few multivalent zanamivir analogues have been synthesized. See: (a) Chandler, M.; Conroy, R.; Cooper, A. W. J.; Lamont, R. B.; Scicinski, J. J.; Smart, J. E.; Storer, R.; Weir, N. G.; Wilson, R. D.; Wyatt, P. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 1189-1197. (b) Honda T.; Yoshida, S.; Arai, M.; Masuda, T.; Yamashita, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1929-1932. (c) Masuda, T.; Yoshida, S.; Arai, M.; Kaneko, S.; Yamashita, M.; Honda, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 1386-1398. (d) Watson, K. G.; Cameron, R.; Fenton, R. J.; Gower, D.; Hamilton, S.; Jin, B.; Krippner, G. Y.; Luttick, A.; McConnell, D.; MacDonald, S. J. F.; Mason, A. M.; Nguyen, V.; Tucker, S. P.; Wu, W.-Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1589-1592. (e) Lu, Y.; Gervay-Hague, J. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1636-1650.

28. Kati, W. M.; Montgomery, D.; Carrick, R.; Gubareva, L.; Maring, C.; McDaniel, K.; Stefly, K.; Molla, A.; Hayden, F.; Kempf, D.; Kohlbrenner, W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1014-1021.
29. For a recent review, see: Sun, X.-L. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 2304-2313.
30. For reviews dealing with biological and thermodynamic implications of multivalent interactions, see: (a) Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794. (b) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578. (c) Mulder, A.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N.; *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3409-3424. (d) Badjić, J. D.; Nelson, A.; Cantrill, S. J.; Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 723-732. (e) Ambrosi, M.; Cameron, N. R.; Davis, B. G. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1593-1608. (f) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348-2368.
31. Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327.
32. (a) Roy, R.; Laferrière, C. A.; Gamian, A.; Jennings, H. J. *J. Carbohydr. Chem.* **1987**, *6*, 161-167. (b) Roy, R.; Laferrière, C. A. *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 2045-2054. (c) Roy, R.; Laferrière, C. A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1709-1711.
33. (a) Kamitakahara, H.; Suzuki, T.; Nishigori, N.; Suzuki, Y.; Kanie, O.; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1524-1528. (b) Totani, K.; Kubota, T.; Kuroda, T.; Murata, T.; Hidari, K. I. P. J.; Suzuki, T.; Suzuki, Y.; Kobayashi, K.; Ashida, H.; Yamamoto, K.; Usui, T. *Glycobiology* **2003**, *13*, 315-326. (c) Ogata, M.; Murata, T.; Murakami, K.; Suzuki, T.; Hidari, K. I. P. J.; Suzuki, Y.; Usui, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1383-1393.
34. Makimura, Y.; Watanabe, S.; Suzuki, T.; Suzuki, Y.; Ishida, H.; Kiso, M.; Katayama, T.; Kumagai, H.; Yamamoto, K. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1803-1808.
35. (a) Roy, R.; Laferrière, C. A. *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, C1-C4. (b) Matrosovich, M. N.; Mochalova, L. V.; Marinina, V. P.; Byramova, N. E.; Bovin, N. V. *FEBS Lett.* **1990**, *272*, 209-212. (c) Spaltenstein, A.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 686-687. (d) Roy, R.; Andersson, F. O.; Harms, G.; Kelm, S.; Schauer, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 1478-1481. (e) Sparks, M. A.; Williams, K. W.; Whitesides, G. M. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 778-783. (f) Bovin, N. V.; Korchagina, E. Y.; Zemlyanukhina, T. V.; Byramova, N. E.; Galanina, O. E.; Zemlyakov, A. E.; Ivanov, A. E.; Zubov, V. P.; Mochalova, L. V. *Glycoconj. J.* **1993**, *10*, 142-151. (g) Lees, W. J.; Spaltenstein, A.; Kingery-Wood, J. E.; Whitesides, G. M. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3419-3433. (h) Mammen, M.; Dahmann, G.; Whitesides, G. M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4179-4190. (i) Sigal, G. B.; Mammen, M.; Dahmann, G.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3789-3800. (j) Choi, S.-K.; Mammen, M.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem.*

- Soc.* **1997**, *119*, 4103-4111. (k) Tsuchida, A.; Kobayashi, K.; Matsubara, N.; Muramatsu, T.; Suzuki, T.; Suzuki, Y. *Glycoconj. J.* **1998**, *15*, 1047-1054. (l) Reuter, J. D.; Myc, A.; Hayes, M. M.; Gan, Z.; Roy, R.; Qin, D.; Yin, R.; Piehler, L. T.; Esfand, R.; Tomalia, D. A.; Baker, J. R. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 271-278. (m) Wu, W.-Y.; Jin, B.; Krippner, G. Y.; Watson, K. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 341-343. (n) Furuike, T.; Aiba, S.; Suzuki, T.; Takahashi, T.; Suzuki, Y.; Yamada, K.; Nishimura, S.-I. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 3000-3005. (o) Yang, Z.-Q.; Puffer, E. B.; Pontrello, J. K.; Kiessling, L. L. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1605-1613. (p) Gambaryan, A. S.; Boravleva, E. Y.; Matrosovich, T. Y.; Matrosovich, M. N.; Klenk, H.-D.; Moiseeva, E. V.; Tuzikov, A. B.; Chinarev, A. A.; Pazynina, G. V.; Bovin, N. V. *Antiviral Res.* **2005**, *68*, 116-123.
36. (a) Kingery-Wood, J. E.; Williams, K. W.; Sigal, G. B.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7303-7305. (b) Spevak, W.; Nagy, J. O.; Charych, D. H.; Schaefer, M. E.; Gilbert, J. H.; Bednarski, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1146-1147. (c) Reichert, A.; Nagy, J. O.; Spevak, W.; Charych, D. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 829-830. (d) Guo, C.-T.; Sun, X.-L.; Kanie, O.; Shortridge, K. F.; Suzuki, T.; Miyamoto, D.; Hidari, K. I. P. J.; Wong, C.-H.; Suzuki, Y. *Glycobiology* **2002**, *12*, 183-190.
37. (a) Tuzikov, A. B.; Chinarev, A. A.; Gambaryan, A. S.; Oleinkov, V. A.; Kinov, D. V.; Matsko, N. B.; Kadykov, V. A.; Ermishov, M. A.; Demin, I. V.; Demin, V. V.; Rye, P. D. Bovin, N. V. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 147-154. (b) Bovin, N. V.; Tuzikov, A. B.; Chinarev, A. A.; Gambaryan, A. S. *Glycoconj. J.* **2004**, *21*, 471-478.
38. (a) Roy, R.; Zanini, D.; Meunier, S. J.; Romanowska, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1869-1872. (b) Roy, R.; Zanini, D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7348-7354. (c) Llinares, M.; Roy, R. *Chem. Commun.* **1997**, 2119-2120. (d) Meunier, S. J.; Wu, Q.; Wang, S.-N.; Roy, R. *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 1472-1482. (e) Matsuoka, K.; Oka, H.; Koyama, T.; Esumi, Y.; Terunuma, D. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3327-3330. (f) Sakamoto, J.-I.; Koyama, T.; Miyamoto, D.; Yingsakmongkon, S.; Hidari, K. I. P. J.; Jampangern, W.; Suzuki, T.; Suzuki, Y.; Esumi, Y.; Hatano, K.; Terunuma, D.; Matsuoka, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 717-721.
39. (a) Glick, G. D.; Knowles, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4701-4703. (b) Glick, G. D.; Toogood, P. L.; Wiley, D. C.; Skehel, J. J.; Knowles, J. R. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 23660-23669. (c) Sabesan, S.; Duus, J.; Domaille, P.; Kelm, S.; Paulson, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5865-5866. (d) Sabesan, S.; Duus, J.; Neira, S.; Domaille, P.; Kelm, S.; Paulson, J. C.; Bock, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8363-8375. (e) Meunier, S. J.; Roy, R.; *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5469-5472. (f) Fujimoto, K.; Hayashida, O.; Aoyama, Y.; Guo, C.-T.; Hidari, K. I. P. J.; Suzuki, Y. *Chem. Lett.* **1999**, 1259. (g) Gan, Z.; Roy, R. *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 908-

916. (h) Ohta, T.; Miura, N.; Fujitani, N.; Nakajima, F.; Niikura, K.; Sadamoto, R.; Guo, C.-T.; Suzuki, T.; Suzuki, Y.; Monde, K.; Nishimura, S.-I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5186-5189. (i) Kalovidouris, S. A.; Blixt, O.; Nelson, A.; Vidal, S.; Turnbull, W. B.; Paulson, J. C.; Stoddart, J. F. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8485-8493.
40. The inhibitory activity of these products toward BK virus was not evaluated.
41. Expressed as the total concentration of sialic acid units in the molecule, not on the basis of the concentration of the polymeric material.
42. Gambaryan, A. S.; Tuzikov, A. B.; Chinarev, A. A.; Juneja, L. R.; Bovin, N. V.; Matrosovich, M. N. *Antiviral Res.* **2002**, *55*, 201-205.
43. Marra, A.; Scherrmann, M.-C.; Dondoni, A.; Casnati, A.; Minari, P.; Ungaro, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 2479-2481.
44. (a) Marra, A.; Dondoni, A.; Sansone, F. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5155-5158. (b) Dondoni, A.; Marra, A.; Scherrmann, M.-C.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1774-1782. (c) Dondoni, A.; Kleban, M.; Hu, X.; Marra, A.; Banks, H. D. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4722-4733.
45. (a) Félix, C.; Parrot-Lopez, H.; Kalchenko, V.; Coleman, A. W. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9171-9174. (b) Roy, R.; Kim, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 369-372. (c) Saitz-Barria, C.; Torres-Pinedo, A.; Santoyo-González, F. *Synlett* **1999**, 1891-1894. (d) Calvo-Flores, F.; Isac-García, J.; Hernández-Mateo, F.; Pérez-Balderas, F.; Calvo-Asin, J. A.; Sanchéz-Vaquero, E.; Santoyo-González, F. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2499-2502. (e) Pérez-Balderas, F.; Santoyo-González, F. *Synlett* **2001**, 1699-1702. (f) Sansone, F.; Chierici, E.; Casnati, A.; Ungaro, R. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1802-1809. (g) Consoli, G. M. L.; Cunsolo, F.; Geraci, C.; Sgarletta, V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4163-4166. (h) ten Cate, M. G.; Omerović, M.; Oshorsky, G. V.; Crego-Calama, M.; Reinhoudt, D. N. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3727-3733. (i) Schädel, U.; Sansone, F.; Casnati, A.; Ungaro, R. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 1149-1154. (j) Krenek, K.; Kuldová, M.; Hulíková, K.; Stibor, I.; Lhoták, P.; Dudic, M.; Budka, J.; Pelantová, H.; Bezouska, K.; Fiserova, A.; Kren, V. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1781-1792.
46. Dondoni, A.; Marra, A.; Zampolli, M. G. *Synlett* **2002**, 1850-1854.
47. (a) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064. (b) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
48. For reviews, see: (a) Bock, V. D.; Hiemstra, van Maarseven, J. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51-68. (b) Wu, P.; Fokin, V. V. *Aldrichim. Acta* **2007**, *40*, 7-17. (c) Lutz, J.-F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1018-1025. (d) Dedola, S.; Nepogodiev, S. A.; Field, R. A. *Org. Biomol. Chem.*

- 2007**, 5, 1006-1017. (e) Dondoni, A. *Chem. Asian J.* **2007**, 2, 700-708. (f) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1249-1262.
49. Dondoni, A.; Marra, A. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 7546-7557.
50. Demko, Z. P.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2110-2113.
51. Dondoni, A.; Marra, A. *Tetrahedron* **2007**, 63, 6339-6345.
52. For reviews, see: (a) Gutsche, C. D. *Aldrichim. Acta* **1995**, 28, 3-9. (b) Böhmer, V. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 713-745. (c) Böhmer, V. *Liebigs Ann. / Recueil* **1997**, 2019-2030. (d) Ikeda, A.; Shinkai, S. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1713-1734.
53. For a recent work on the stability of thiosialoside toward neuraminidases, see: Wilson, J. C.; Kiefel, M. J.; Angus, D. I.; von Itzstein, M. *Org. Lett.* **1999**, 1, 443-446.
54. Sauter, N. K.; Hanson, J. E.; Glick, G. D.; Brown, J. H.; Crowther, R. L.; Park, S.-J.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Biochemistry* **1992**, 31, 9609-9621.
55. Rodios, N. A. *J. Heterocyclic Chem.* **1984**, 21, 1169-1173.
56. Gutsche, C. D.; Dhawan, B.; Levine, J. A.; No, K. H.; Bauer, L. J. *Tetrahedron* **1983**, 39, 409-426.
57. Iqbal, M.; Mangiafico, T.; Gutsche, C. D. *Tetrahedron* **1987**, 43, 4917-4930.
58. Tejler, J.; Tullberg, E.; Frejd, T.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 1353-1362.
59. Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. *Purification of Laboratory Chemicals*, 5th ed., Butterworth-Heinemann, Amsterdam, 2003.
60. Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2925.
61. Maraldi, N.M.; Barbanti-Brodano, G.; Portolani, M.; La Placa, M. *J. Gen. Virol.* **1975**, 27, 71-80.
62. Portolani, M.; Barbanti-Brodano, G.; La Placa, M. *J. Virol.* **1974**, 15, 420-422.
63. Aaronson, S. A.; Todaro, G. J. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1970**, 134, 103-106.
64. Suzuki, Y.; Suzuki, T.; Matsunaga, M.; Matsumoto, M. *J. Biochem. (Tokyo)*, **1985**, 97, 1189-1199.

CAPITOLO 4: *GLYCOCLUSTERS PER ARRAY DI DNA*

4.1 Introduction

Many key physiological and pathological events occur through interactions between carbohydrate and sugar-binding proteins called lectins. The host-pathogen recognitions offer many examples of such interactions. For example, the first step of the infection of influenza virus involves the adhesion of the virion to sialic acid residues present onto the surface of endothelial cells mediated by the viral hemagglutinin. A similar approach is exploited by bacteria and parasites.

Therefore, understanding the structure-function relationships of this molecular recognition process may provide access to innovative therapeutic strategies. Nevertheless, since natural carbohydrate-lectin interactions are usually weak, glycochemists have devoted many efforts in designing high affinity artificial ligands, including glycosides bearing hydrophobic aglycons¹ and, more recently, glycoclusters,² to take advantage of the so-called cluster effect.³⁻⁵ It is worth noting that, in the case of glycoclusters, the affinity is not only related to the multivalency.⁶ In fact,

different authors have demonstrated the importance of the spatial distribution of the glycoside residues for obtaining high affinities.⁷

Calix[4]arenes can be synthesized in various blocked conformations, thus providing a series of well-defined geometries for the display of sugar ligands. A recent study demonstrated that *N*-glycosylated calix[*n*]arenes of variable valencies and geometries are capable of distinguishing among lectins of a family.⁸

We report herein the synthesis of *C*-glycosylated calix[4]arenes in which four galactose residues are linked through an alkyl triazole tether to the upper rim of the macrocycle cavity while an azido group is present on the opposite side. Next, the calixsugars were grafted through copper-mediated azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) on mono or dipropargyloxymethyl-propanediol moieties allowing the synthesis of oligonucleotides bearing one or two calixarene glycoclusters, respectively. Finally, their affinity for lectins PA-IL⁹ and RCA 120, galactose specific lectins from *Pseudomonas aeruginosa* and *Ricinus communis*, respectively, were compared to that displayed by linear and antenna-type glycoclusters.^{10, 11} The evaluation of the affinity of each glycomimic was performed on a DNA-based glycoarray platform as previously described¹² by direct fluorescence scanning and by determination of their IC₅₀ values.¹³

4.2 Synthesis of *C*-galactosyl calix[4]arene clusters

We designed calix[4]arene based glycoclusters **1** and **2** (Figure 1) functionalized with a single azido group with the aim of introducing these multi-glycosylated molecules into oligonucleotides via the copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition (click chemistry).¹⁴ The calix[4]arenes were chosen as platforms because they can be easily derivatized at both the upper (wide) and lower (narrow) rims and they are endowed with a well organized three-dimensional architecture.¹⁵ Among the four possible conformations (cone, partial cone, 1,2-alternate, 1,3-alternate) adopted by calix[4]arenes, the cone structure allows a spatially close arrangement of the four sugar ligands at one side of the macrocycle.

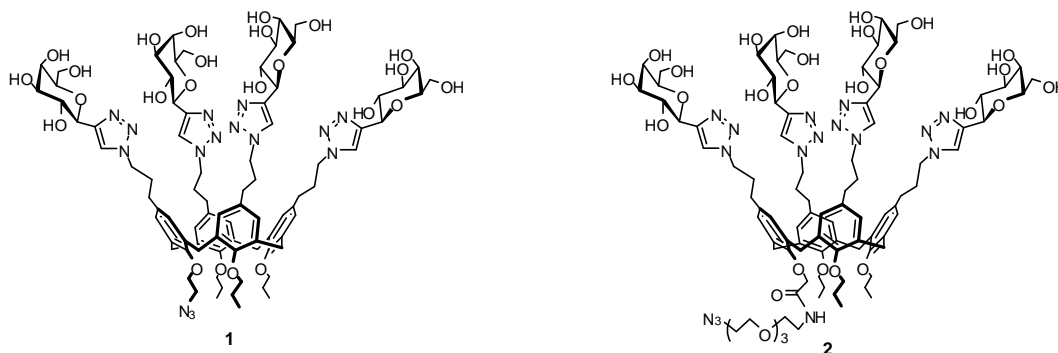
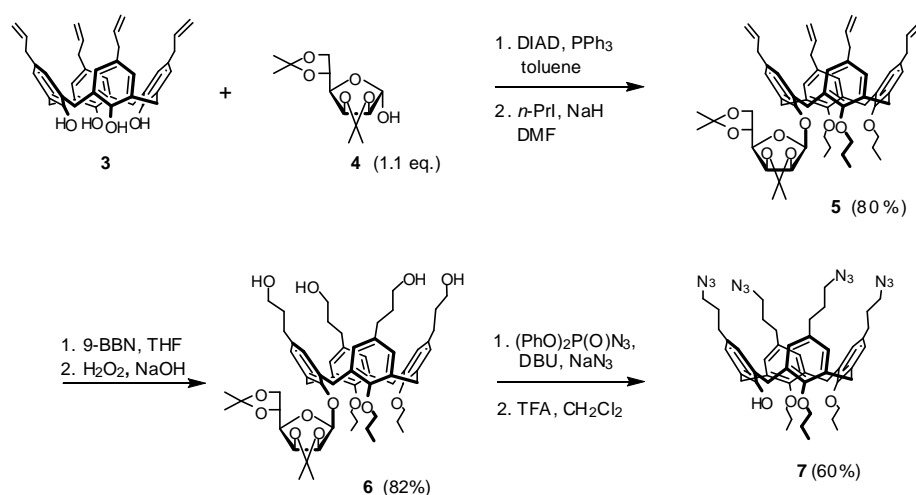


Figure 1.

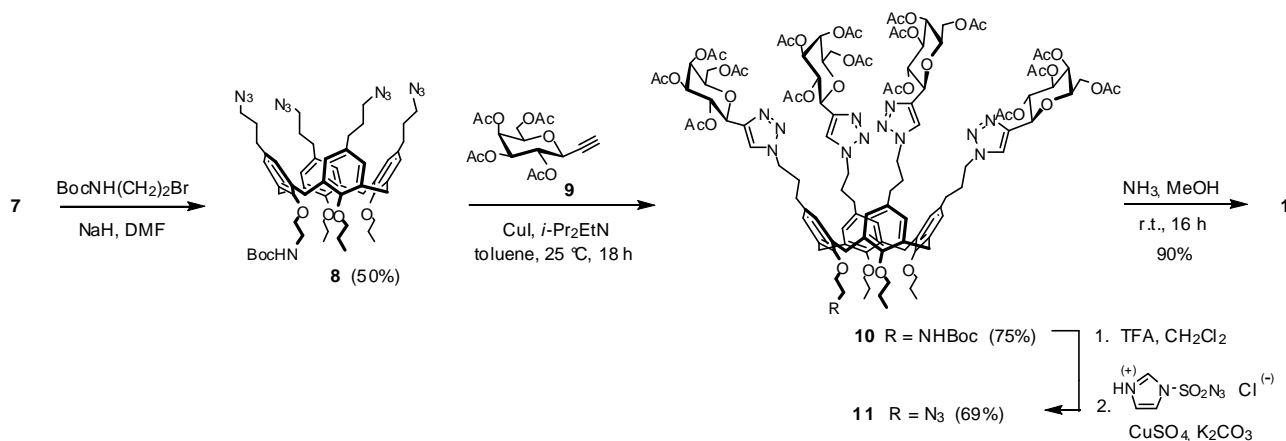
The synthesis of densely substituted calix[4]arenes **1** and **2** is succinctly described. The key intermediate **7** was first targeted from the known¹⁶ tetra-allyl-calix[4]arene **3** via calixarene chemistry (Scheme 1). Compound **7** featured four azidopropyl groups at the upper rim and only one free hydroxy group at the lower rim, while the other three hydroxy groups were protected as *O*-propyl ethers to insure a blocked cone conformation of the macrocycle. Unfortunately, the regioselective, direct protection of three phenolic hydroxy groups of calix[4]arene derivatives is a not trivial task. In fact, the synthesis of lower rim di-alkylated¹⁷ and tetra-alkylated¹⁸ calix[4]arenes in cone conformation is a straightforward transformation, whereas the preparation of the corresponding tri-alkyl ethers is troublesome and often requires multistep methods.^{19, 20} A well known procedure^{18, 21} for the synthesis of tri-*O*-alkylated calix[4]arenes involves the treatment of the tetra-hydroxy derivative with an excess of alkyl halides in the presence of BaO and Ba(OH)₂. However, when the tetra-allyl-calix[4]arene **3** was submitted to these reaction conditions, both the di- and tri-propyl ethers were formed in low yield (ca. 25% each). Thus, the target tetra-azidated calixarene **7** was prepared starting from **3** employing an alternative strategy to differentiate one of the four hydroxy groups at the lower rim. Taking advantage of our previous studies on the synthesis of calix[4]arene based glycoclusters,²²⁻²⁵ **3** was mono-glycosylated by reaction with commercially available α -D-mannofuranose diacetone **4** (1.1 equiv.) under Mitsunobu conditions²² and then the three residual hydroxy groups were protected as *O*-propyl ethers to give compound **5** in 80% isolated yield (two steps). The first step of this new procedure afforded a mono-protected calix[4]arene in similar or even better yield than those registered exploiting previous methods based on the use of NaOMe²⁰ (70-80%), LiOH²⁶ (73-85%), K₂CO₃²⁷ (37-88%), CsF²⁷ (60-85%), or (Bu₃Sn)₂O²⁸ (47-80%) and very simple alkyl halides.²⁹



Scheme 1

With compound **5** in hand having all hydroxy groups suitably protected, the multiple hydroboration-oxidation of the four allyl groups at the upper rim was safely carried out to give the

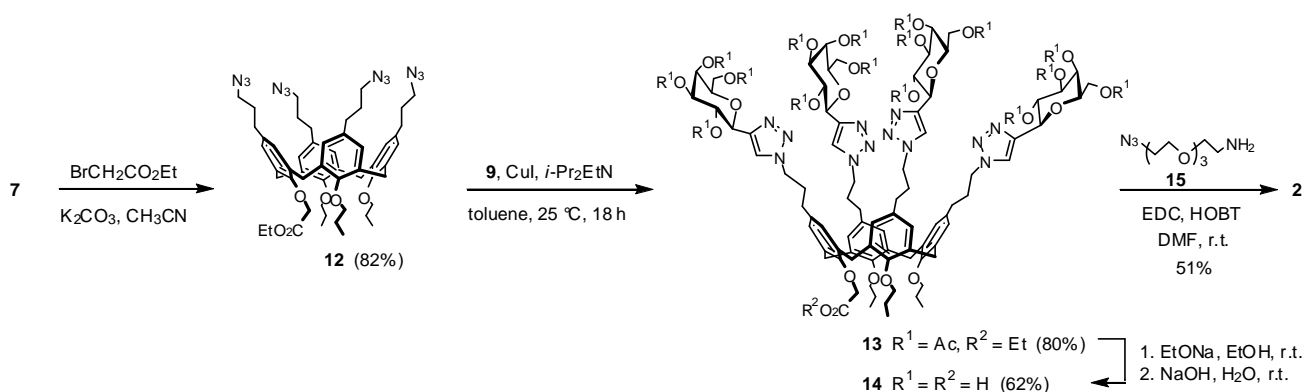
tetrol **6**. Subsequent transformation by azidation with diphenyl phosphoryl azide and sodium azide followed by removal of the mannofuranose fragment by acidic hydrolysis afforded the tetra-azide **7**. In order to obtain the glycocluster **1** featuring the azido group in close proximity of the macrocycle cavity, the free hydroxy group of **7** was alkylated with the short *N*-Boc ethylamino chain to give **8** (Scheme 2). The fixed cone conformation of the calix[4]arene macrocycle adopted by **8** was supported by the presence in its ^1H NMR spectrum of signals for the equatorial and axial protons of the methylene bridges as doublets at ca. 3.1 and 4.3 ppm, respectively. Then, click chemistry was performed on the tetra-azide **8** as described in earlier reports from our laboratory.^{24, 25} Accordingly, **8** was allowed to react with a stoichiometric amount (4.0 equiv.) of known³⁰ ethynyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-*C*-galactopyranoside **9** in the presence of CuI and Hünig's base to give the triazole-tethered tetravalent glycosylated calix[4]arene **10**. Quite remarkably, the four click reactions on the same substrate **8** must have occurred quite efficiently as compound **10** was obtained in 75% yield, corresponding to a 93% average yield for each cycloaddition reaction. This good result is very likely due to the postulated²⁵ complexation of a copper(I)-triazolide intermediate with the sugar alkyne, which is therefore placed in proximity of unreacted azido groups and can readily undergo an intramolecular cycloaddition. The regioisomeric assignment of the 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole rings was established by ^{13}C NMR spectroscopy as described in our earlier works.²⁴ Removal of the *N*-Boc group from **10** under acidic conditions followed by a diazo-transfer reaction³¹ to convert the amino function into the azido group afforded **11**. Finally, the latter compound was converted into the target calix[4]arene **1**, bearing carbohydrate residues at the upper rim and a single azido group at the lower rim, by treatment with ammonia in methanol.



Scheme 2

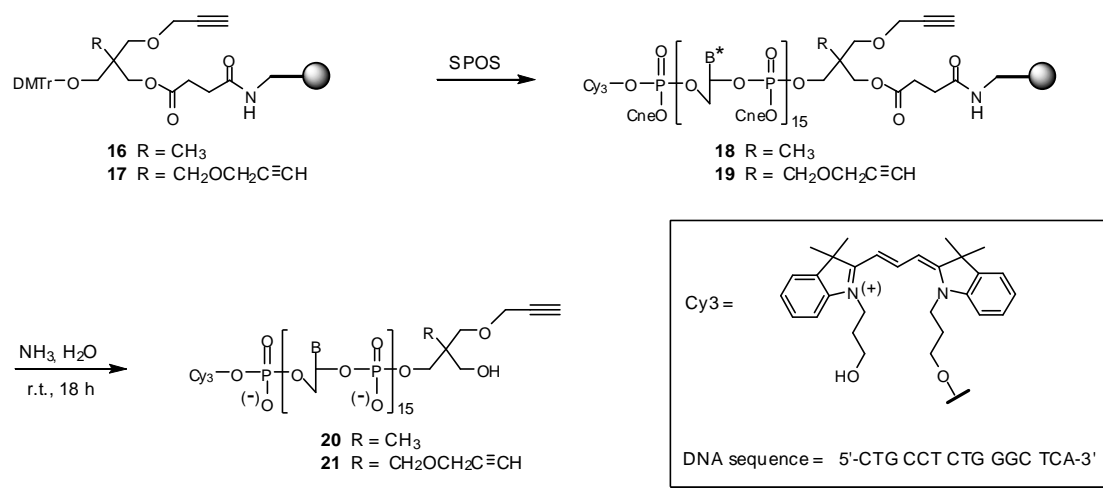
To obtain the glycocluster **2**, displaying a long tether holding the azido group at the lower rim, the calix[4]arene derivative **7** was derivatized as the ethyl ester **12** (Scheme 3), which was submitted to the standard click reaction with the sugar alkyne **9** to give the glycocluster **13** in high yield (80%). Also in this case, the fixed cone conformation of the calix[4]arene scaffold and the

1,4-disubstitution pattern of the triazole rings were readily confirmed by ^1H and ^{13}C NMR analyses, respectively. Transesterification of **13** followed by basic hydrolysis, afforded the compound **14** wherein not only the ester group at the lower rim of the macrocycle but also those of the sugar residues had been removed. Finally the azido group was introduced in **14** by *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl-carbodiimide (EDC) activated amidic coupling³² of the free carboxylic group with the commercially available 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine **15** to give the target product **2**. Compounds **1** and **2** were purified by reversed-phase column chromatography and characterized by NMR and MS analyses.



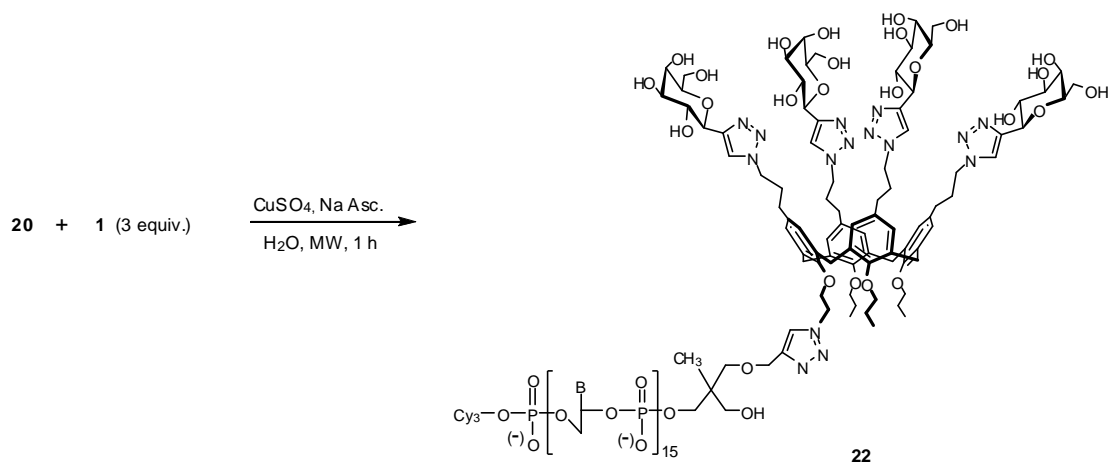
4.3 Synthesis and characterization of glycocluster-oligonucleotide hybrids.

The assembly of glycoclusters **1** and **2** with oligonucleotide chains was carried out in order to immobilize the resulting glycoconjugates on a microarray surface. To this aim, oligonucleotides were prepared by a DNA synthesizer using the standard phosphoramidite chemistry³³ on CPG (Controlled Pore Glass) solid support, a porous borosilicate material frequently used for DNA synthesis. Two different solid supported materials **16**³⁴ and **17**³⁵ (Scheme 4), displaying one and two alkyne residues respectively, were used for the synthesis of oligonucleotides **18** and **19** displaying the same sequence (CTG CCT CTG GGT TCA)¹² and labeled on the 5'-end with the fluorescent dye Cy3 (Scheme 4). Treatment of **18** and **19** with concentrated aqueous ammonia released the oligonucleotides from the solid support and removed the protecting groups (*i.e.* β -cyanoethyl, benzoyl, and isobutyryl) (Scheme 4). The oligonucleotides **20** and **21** were isolated, their purity was established by analytical HPLC, and they were characterized by MALDI-TOF mass spectrometry.

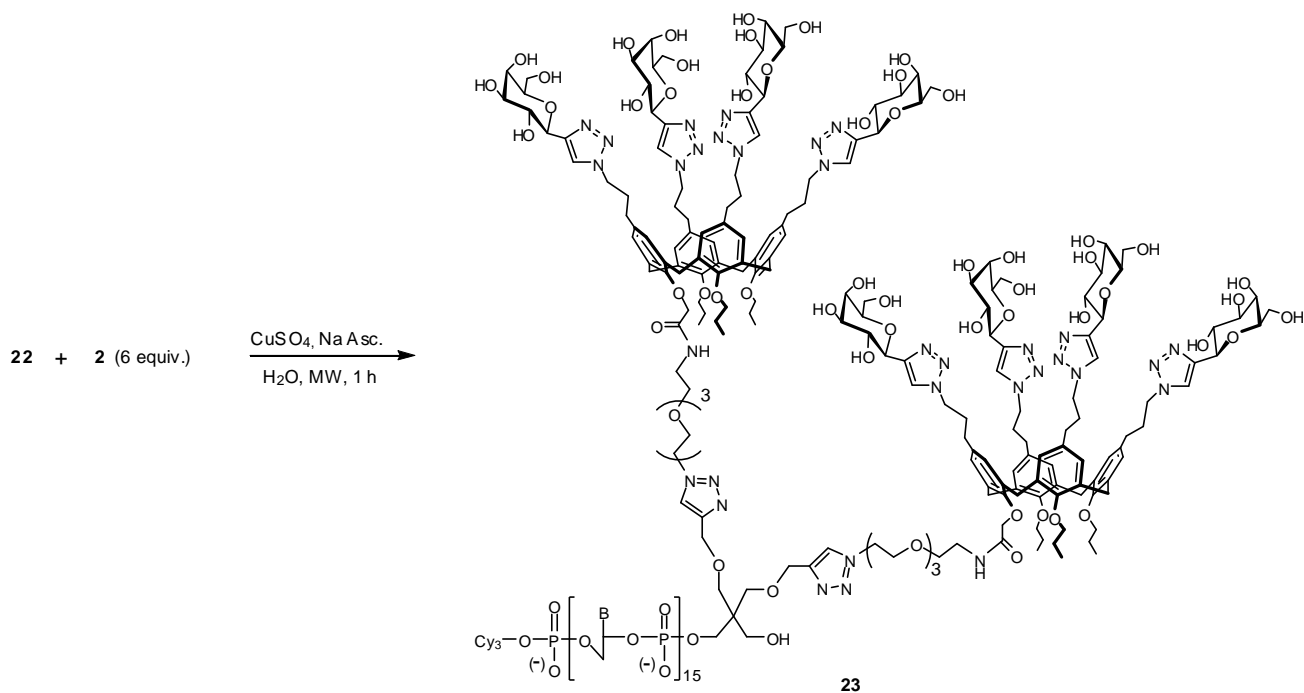


Scheme 4. Solid-phase oligonucleotide synthesis (SPOS) of 5'-fluorescently labeled DNA 3'-mono- or di-alkynes: (1) 2.5% Cl₂CHCO₂H, CH₂Cl₂; (2) phosphoramidite derivative + benzylthiotetrazole; (3) Ac₂O, *N*-methyl-imidazole, 2,6-lutidine; (4) 0.1 M I₂, THF-H₂O-pyridine. The grey ball represents long chain alkyl CPG. B* = A^{bz}, C^{bz}, G^{ibu} or T and B = A, C, G or T.

Since the alkyne-functionalized oligonucleotides **20** and **21** were water soluble compounds, we planned to carry out their coupling with azide functionalized glycoclusters **1** (Scheme 5) and **2** (Scheme 6), respectively, in water using CuSO₄ and sodium ascorbate as the source of copper(I). Both reactions were performed under microwave irradiation¹⁰ in order to achieve high reaction rates and therefore avoid some phosphodiester hydrolysis due to the presence of copper(I) ion.³⁶ The crude products from the click reactions were purified by preparative HPLC and characterized by MALDI-TOF mass spectrometry to give the final glycoconjugates **22** and **23**.



Scheme 5



Scheme 6

4.4 Preparation of DNA-based glycoarrays to probe lectin-carbohydrate interactions

Our methodology¹² for the surface immobilization of glycoconjugates on the microarrays was used as follows: a) construction of DNA chips, b) hybridization of the prepared glycocluster-oligonucleotide conjugates bearing the complementary DNA sequence and the fluorescent dye Cy3, and c) addition of the fluorescently labeled lectins Cy5 or Alexa 647 (Figure 2).

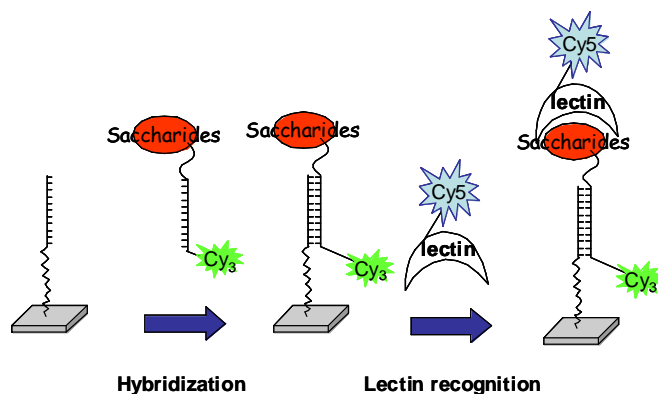


Figure 2. Schematic representation of the method used to study lectin-carbohydrate interactions.

Accordingly, first the 3'-amino-oligonucleotides (whose sequence was complementary to that of the glycoconjugates prepared) were covalently immobilized on functionalized³⁷ 52-well glass slides.³⁸ Then, the glycocluster oligonucleotide derivatives **22** and **23**, the previously tested¹² galactosyl conjugates **24a-d** (Figure 3), and an additional galactosyl conjugate **25** bearing ten

Scanning of the Cy3 fluorescence signal with the Microarray scanner GenePix 4100A displayed a homogeneous hybridization of all conjugates, except for **25**, which included an oligonucleotide sequence different from that of the linear glycoconjugates **24a-e** (Figure 5). Two different Cy3 signals were observed for compound **24e** (each value was the mean of four spots on the same row): for one row, the signal intensity was similar to that observed for the compounds **24a-d**, whereas it was approximately one third for the other row. Further experiments confirmed that compound **24e** hybridizes similarly to compounds **24a-d**.

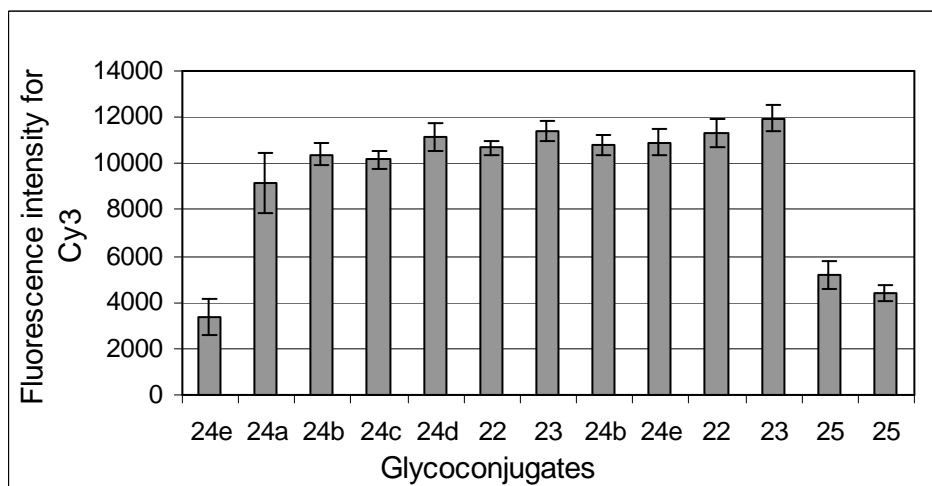


Figure 5. Fluorescence signals (a. u.) at 532 nm after hybridization monitoring the immobilization of glycoconjugates **22-25** on the DNA chip.

Next, we studied the interaction of **22** and **23** with two different galactose-binding lectins: PA-IL⁹ (*Pseudomonas aeruginosa* lectin) and RCA 120 (*Ricinus communis* agglutinin). PA-IL, the first Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* lectin isolated,³⁹ features a narrow specificity spectrum for D-galactose containing molecules. This protein is constituted by four identical monomers in which four calcium-dependent binding sites are located. After hybridization, the Alexa 647-labeled PA-IL was deposited in each well at 2.8 μ M concentration and, after incubation and washing of the glass slide with 0.02% Tween 20 in PBS solution, the chip was scanned at 532 and 635 nm. The fluorescence signal of each conjugate was determined as the average of the mean fluorescence signal of four spots (Figure 6). The fluorescence image of Cy3 (Figure 6, left) proved that the glycoconjugates were still present after lectin incubation, while fluorescence image of Alexa 647 (Figure 6, right) was observed as a result of the binding of PA-IL. The selectivity of PA-IL for the corresponding galactose derivatives **24a-d** and **25** was demonstrated by the Alexa 647 fluorescence signal at background level for mannose bearing glycoconjugate **24e** (Figure 7). The relative affinity of PA-IL to the glycoconjugates can be directly monitored through the intensity of the lectin's fluorescence signal.

As previously observed with RCA120,¹² glycoconjugates exhibiting three galactose residues (**24b** and **24d**) presented a better affinity for PA-IL than those with only one residue (**24a** and **24c**) due to the expected cluster effect.^{4, 5} The nature of the linker (L1 and L2) between the galactose residues has little effect (**24b** vs. **24d**). Surprisingly, lower affinities were observed when the number of galactose moieties was increased. Thus, the deca-galactosyl conjugate (**25**) displayed a two-fold decreased fluorescence signal while they were at background level for both glycoconjugates **22** and **23** as well as for the negative control **24e**, thus indicating that **22** and **23** did not have affinity for PA-IL lectin (Figure 6-7). Actually, it was expected that PA-IL would strongly recognize **22** and **23** because they featured a triazole ring β -D-linked to the galactose moiety, a molecular motif closely related to phenyl β -D-galactoside, the most potent ligand for PA-IL. Two possible explanations for this finding can be advanced by considering that 1) steric hindrance can arise or 2) glycosylated calixarenes can sequester calcium ions, thus removing them from the binding site of the lectin. Hence, ¹H NMR experiments were carried out to evaluate the complexation ability of glycoclusters **1** and **2** toward calcium(II) ions. The addition of anhydrous Ca(ClO₄)₂ to a solution of **1** in CD₃OD led to an upfield shift (ca. 0.1 ppm) and broadening of the signals due to the four aromatic protons resonating at $\delta = 6.47$ - 6.40 and to two ($\delta = 2.1$) of the four upper rim benzyl-type methylene groups. Downfield shifts of other signals in the central part of the spectrum ($\delta = 4.5$ - 3.7) were also observed. In a similar way, after treatment of glycocluster **2** with Ca(ClO₄)₂, its ¹H NMR spectrum (in CD₃OD) showed some changes. In particular, the signals of two ($\delta = 7.92$) of the four H-5 triazole atoms were slightly shifted downfield whereas the signals of four aromatic protons ($\delta = 6.3$) and four upper rim aliphatic protons ($\delta = 2.0$) underwent a ca. 0.1 ppm upfield shift. To confirm the cation selectivity of the recognition process, the same experiments were repeated replacing Ca(ClO₄)₂ with anhydrous NaClO₄ in the CD₃OD solutions. In this case, the spectra of **1** and **2** did not show any significant modification, suggesting that both glycoclusters can complex Ca²⁺ ions when installed onto the oligonucleotide chains and exposed to the lectin. This conclusion contrasted with the finding that no molecular recognition was detected even by increasing the amounts of calcium ions in the tris/HCl buffer used instead of phosphate buffer. Therefore, we conclude that the calcium sequestration cannot be taken as the causing effect for the lack of binding of **22** and **23** to PA-IL lectin. At this stage a convincing explanation for that observation is open to conjectures and may rather be related to steric hindrance.

The present data showed that PA-IL recognizes more efficiently glycoclusters with linear spatial structure than those with antenna (**25**) and calixarene (**22** and **23**) structure. This result suggests that a too close proximity between the galactose moieties has a negative effect on the recognition by PA-IL.

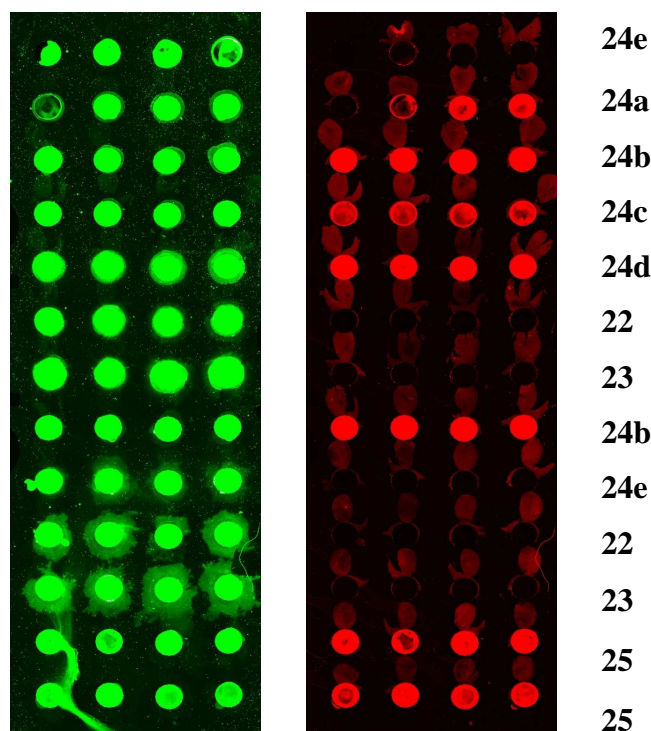


Figure 6. Fluorescence images (a. u.) recorded after incubation of immobilized glycoconjugates **22-25** with Alexa 647-labeled PA-IL at 532 nm (left) and at 635 nm (right).

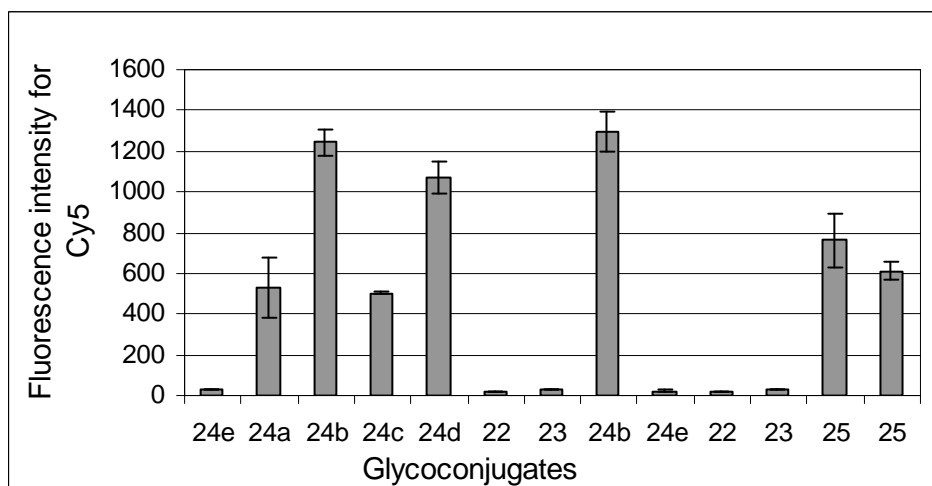


Figure 7. Fluorescence signals (a. u.) recorded at 635 nm after incubation of immobilized glycoconjugates **22-25** with Alexa 647-labeled PA-IL.

A similar affinity study was then performed employing RCA 120, another lectin recognizing galactose residues. RCA 120⁴⁰ is a heterodimeric protein with a MW of 60 kDa, made up of two S-S linked chains A and B, the latter containing two carbohydrate binding sites specific for galactose. Cy5-labeled RCA 120 was deposited in each well at 2 μ M concentration and, after incubation and washing of the glass slide with 0.02% Tween 20 in PBS solution, it was scanned at 532 and 635 nm. The fluorescence image of Cy3 (Figure 8, left) proved that the glycoconjugates were still

present after lectin incubation, while the fluorescence image of Cy5 (Figure 8, right) was observed as a result of the binding of RCA 120 with galactose residues.

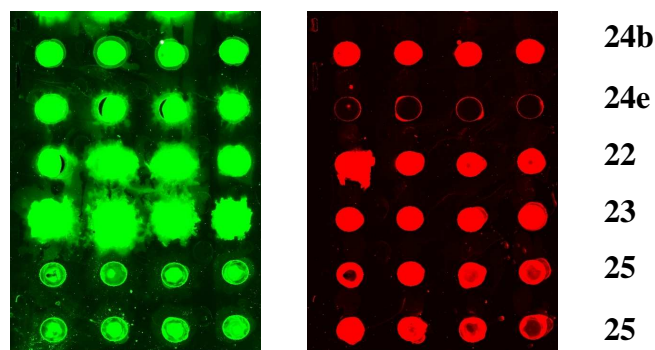


Figure 8. Fluorescence images (a. u.) recorded at 532 nm (left) and 635 nm (right) after incubation of immobilized glycoconjugates **22**, **23**, **24b**, **24e**, and **25** with Cy5-labeled RCA 120.

The fluorescence signal of each conjugate was determined as the average of the fluorescence signal of four spots. As expected, the Cy5 signal was at background level for the mannose bearing glycoconjugate **24e**, highlighting the selectivity of RCA 120 for galactose (Figure 9).

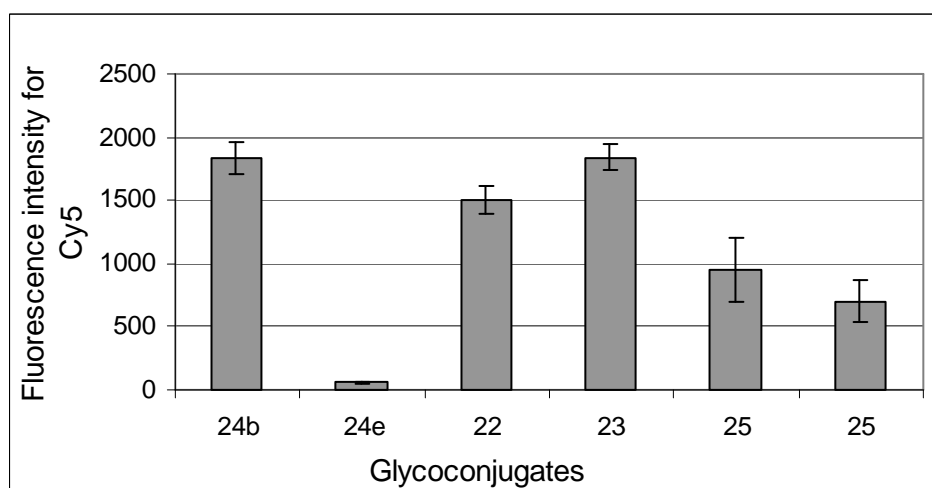


Figure 9. Fluorescence signals (a. u.) at 635 nm after incubation with RCA 120.

Interestingly and in contrast to the data obtained with PA-IL, we found that all galactosylated-glycoconjugates were able to bind RCA 120. Therefore, in this case, the use of the non-natural calixarene scaffold and triazole linker did not prevent the molecular recognition of the sugar ligand by the lectin. The glycoconjugate **23**, bearing eight galactose residues, displayed an affinity similar to that observed for **24b**, the most active compound, featuring only three galactose moieties. The ratio of the intensities of the Cy5 signals for **23** and **22** was in the 1.2-2 range (from independent experiments) while the ratio of the galactose residues linked to these glycoconjugates was of 2. Surprisingly, RCA 120 bound with a lower affinity to compound **25** bearing ten residues in an

antenna spatial arrangement. These results indicate that the three-dimensional orientation of the sugar units is more important than their number. In fact **24b**, bearing three galactose residues in a linear arrangement, was the most potent ligand among the seven glycoconjugates tested in the present study.

In order to have a quantitative analysis of the binding affinities between lectin RCA 120 and glycoconjugates **22** and **23**, the corresponding IC_{50} values were measured as previously reported⁴¹ and compared with the IC_{50} values determined for **24a** and **24b**.¹³ We determined IC_{50} values as the concentration of lactose required for the removal of 50% of RCA 120 bound to the immobilized glycoconjugates. The glycoconjugates **22** or **23** were immobilized by hybridization at the bottom of the microwells and further incubated with mixtures of Cy5-labeled RCA 120 (2 μ M) containing increasing concentrations of lactose (0.05 μ M to 30 mM). Fluorescence images at 532 and 635 nm were then obtained after washing of the glass slides to remove the unbound lectins (Figure 10). Each experimental point is an average value of four spots.

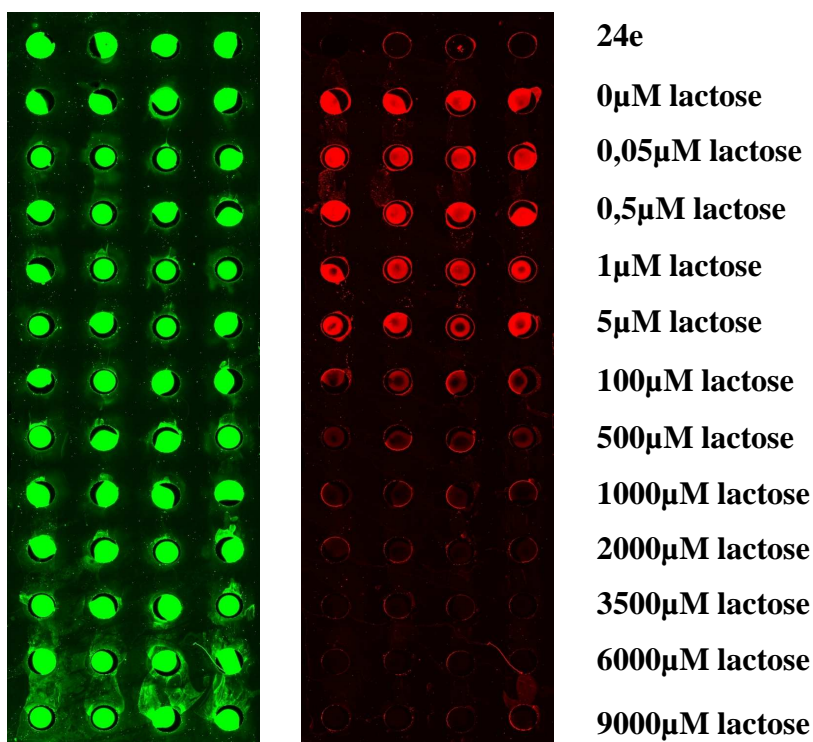


Figure 10. Typical fluorescence images recorded after incubation with Cy5-labeled RCA 120 and increasing concentrations of lactose.

The Cy5 fluorescence intensities were tabulated versus logarithmic lactose concentrations (Figure 11).

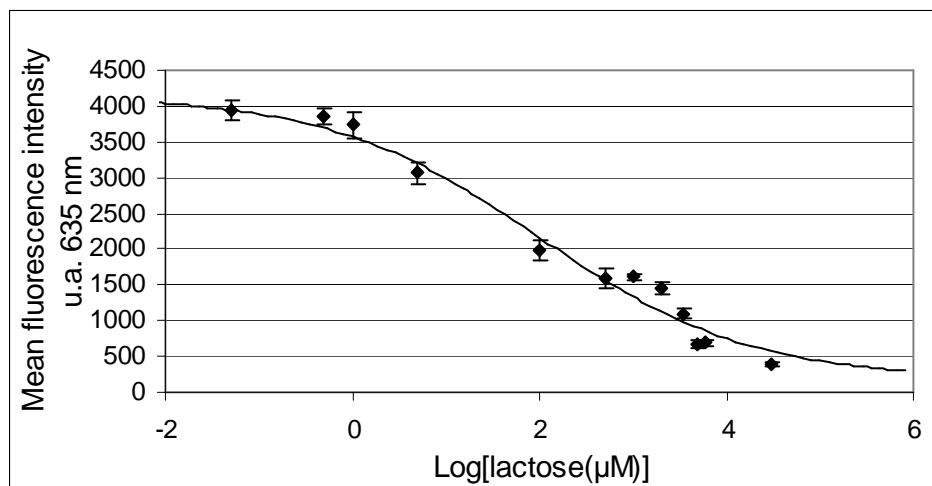


Figure 11. Competitive curves of Cy5-RCA120 with **22** immobilized on DNA chip in presence of an increasing concentration of lactose. Fluorescence intensity (a.u.) at 635 nm.

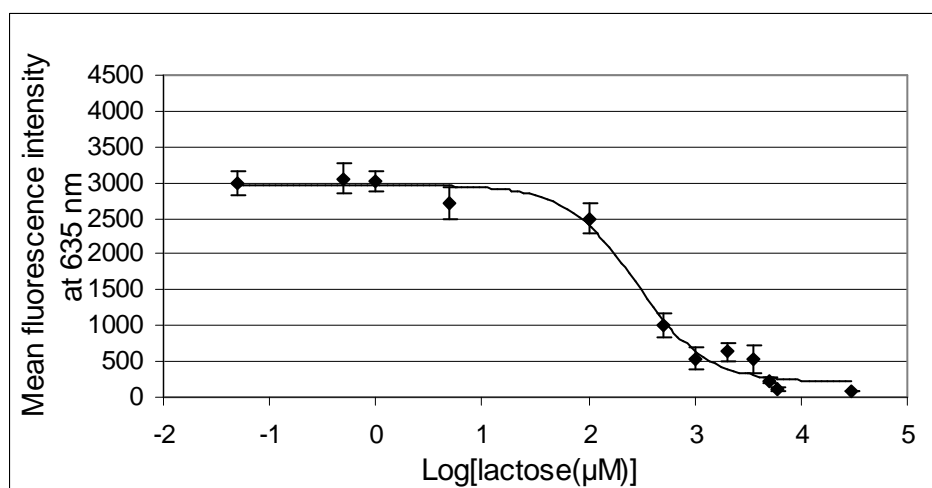


Figure 11. Competitive curves of Cy5-RCA120 with **23** immobilized on DNA chip in presence of an increasing concentration of lactose. Fluorescence intensity (a.u.) at 635 nm.

The IC_{50} values for the mono-galactose **24a**,¹³ the tri-galactose **24b**,¹³ the tetra-galactose **22** and the octa-galactose **23** glycoconjugates are displayed in Table 1.

Table 1. IC_{50} of glycoconjugates-RCA 120 binding.				
Glycoconjugate	Valency	IC_{50} μ M	Relative potency ^[a]	Potency per galactose residue ^[b]
24a	1	$5.6 \pm 2.8^{[13]}$	1	1.0
24b	3	$385 \pm 45^{[13]}$	69	23
22	4	114 ± 14	20	5
23	8	305 ± 22	54	7

[a] Calculated as the ratio of monomer glycoconjugate **24a** to other glycoconjugates IC_{50} values. [b] Calculated as the ratio of relative potency to the number of galactose residues.

As expected, we found that the affinity of RCA 120 increased along with the number of galactose residues due to a higher local galactose concentration. IC_{50} measurements confirmed that RCA 120 had affinity for compounds **24b** and **23** in the same range. Moreover, the IC_{50} for **23** was 2.7 times higher than that for **22** leading to an affinity per residues increased by a factor of 1.3, whereas values in the 1.2-2 range were obtained when analyzed by fluorescence of Cy5 (Figure 9). Therefore, as already reported,⁵ the measured cluster effect depends on the assay conditions.

4.5 Conclusion

The present study showed that each class of galactose cluster (linear, calixarene and antenna) is recognized with different affinity by PA-IL and RCA 120 lectins. Our result showed that the spatial arrangement is more important than the number of galactose residues since the linear trivalent clusters (**24b** and **24d**) were more able to bind lectins than antenna (**25**) and calixarene (**22** and **23**) ones exhibiting 10, 4 and 8 galactose moieties, respectively. Furthermore, we showed that PA-IL is more selective than RCA 120 since galactosyl-calixarene derivatives **22** and **23** were not recognized by PA-IL. The importance of spatial arrangement of the glycoside residues in the lectin recognition process has been assessed for the asialoglycoprotein receptor.^{12, 42, 43} It was showed that the trigalactose cluster with the higher distance between the sugar residues presents the optimal recognition.^{39, 42}

The recognition study was performed by direct fluorescence scanning and by the determination of the IC_{50} values, both techniques leading to similar results.

The carbohydrate microarray used in this study required only minute amounts of material. The synthesis of the glycoconjugates could therefore be performed on a rather small scale but the miniaturization through the microarray technology provided the biological data for a complete study.

4.6 Experimental Section

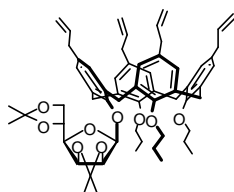
All moisture-sensitive reactions were performed under a nitrogen atmosphere using oven-dried glassware. Anhydrous solvents were dried over standard drying agents⁴⁴ and freshly distilled prior to use. Reactions were monitored by TLC on silica gel 60 F₂₅₄ with detection by charring with sulfuric acid. Flash column chromatography⁴⁵ was performed on silica gel 60 (40-63 μm). Melting points were determined with a capillary apparatus. Optical rotations were measured at 20 ± 2 °C in the stated solvent; $[\alpha]_D$ values are given in $\text{deg}\cdot\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dm}^{-1}$. ¹H NMR (300 and 400 MHz) and ¹³C NMR spectra (75 and 100 MHz) were recorded from CDCl₃ solutions at room temperature unless otherwise specified. Peak assignments were aided by ¹H-¹H COSY and gradient-HMQC

experiments. In the ^1H NMR spectra reported below, the n and m values quoted in geminal or vicinal proton-proton coupling constants $J_{n,m}$ refer to the number of the corresponding sugar protons.

High performance liquid chromatography (HPLC) analyses and purifications were performed on a Waters-Millipore instrument equipped with a Rheodyne injector, a 600S controller and a model 996 photodiode array detector. For analyses, a reverse phase C18 Nucleosil (5 μm) column (150 x 4.6 mm; Macherey-Nagel, Germany) was used at a flow rate of $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ using a linear gradient of acetonitrile 5% to 60% in 0.05 M aqueous triethylammonium acetate (pH 7) for 25 min. For purifications, a reverse phase C18 Delta-Pak (15 μm) column (7.8 x 300 mm; Waters, Japan) was used at a flow rate of $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ using a linear gradient of acetonitrile 24% to 48% in 0.05 M aqueous triethylammonium acetate (pH 7) for 25 min.

MALDI-TOF mass spectra were recorded on a Voyager mass spectrometer (Perspective Biosystems, Framingham, MA) equipped with a nitrogen laser. MALDI conditions: accelerating voltage 24 kV; guide wire 0.05% of the accelerating voltage; grid voltage 94% of the accelerating voltage; delay extraction time 500 ns. 1 μL of sample was mixed with 5 μL of a saturated solution of hydroxypicolinic acid (HPA) in acetonitrile-water (1:1, v/v) containing 10% of ammonium citrate, then a few beads of DOWEX 50W-X8 ammonium sulfonic acid resin were added. 1 μL of the above mixture was placed on a plate and dried at room temperature and pressure.

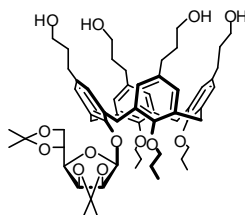
5,11,17,23-Tetraallyl-25-(2,3:5,6-di-*O*-isopropylidene- β -D-mannofuranosyl)-26,27,28-tripropoxy-calix[4]arene (5).



To a stirred solution of tetrol **3** (500 mg, 0.86 mmol) and triphenylphosphine (335 mg, 1.28 mmol) in anhydrous toluene (10 mL) was added diisopropyl azodicarboxylate (250 μ L, 1.28 mmol) and, after 15 min, hemiacetal **4** (243 mg, 0.94 mmol). Stirring was continued for an additional 1.5 h, then the mixture was concentrated. To a stirred solution of the residue in DMF (20 mL) was added NaH (0.30 g, 7.7 mmol, of a 60% dispersion in oil) and, after 10 min, 1-iodopropane (0.75 mL, 7.7 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h, then diluted with CH₃OH (0.5 mL) and, after 30 min, diluted with 1 M phosphate buffer at pH 7 (80 mL) and extracted with Et₂O (2 x 100 mL). The combined organic phases were dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with CH₂Cl₂-cyclohexane (from 1:1 to 3:1) to give **5** (652 mg, 80%) as a syrup; $[\alpha]_D = -19.2$ (*c* 0.6, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz): δ 6.98-6.92 (m, 4H, Ar), 6.08 (ddt, 2H, *J* = 6.0, 12.0, 16.5 Hz, 2 CH₂=CHCH₂), 6.05-5.96 (m, 4H, Ar), 5.59-5.48 (m, 2H, 2 CH₂=CHCH₂), 5.12-5.01 (m, 4H, 2 CH₂=CHCH₂), 4.87-4.75 (m, 4H, 2 CH₂=CHCH₂), 4.78 (dd, 1H, *J*_{1,2} = 3.0, *J*_{2,3} = 6.3 Hz, H-2), 4.71 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 4.0 Hz, H-3), 4.69 (d, 1H, H-1), 4.63 and 3.01 (2d, 2H, *J* = 13.8 Hz, ArCH₂Ar), 4.48-4.43 (m, 1H, H-5), 4.42 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz, H_{ax} of ArCH₂Ar), 4.40 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz, H_{ax} of ArCH₂Ar), 4.35 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz, H_{ax} of ArCH₂Ar), 4.23 and 3.88 (2dt, 2H, *J* = 5.5, 11.3 Hz, CH₃CH₂CH₂O), 4.14-3.97 (m, 4H, 2 H-6, CH₃CH₂CH₂O), 3.65-3.57 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂O), 3.42-3.36 (m, 5H, H-4, 2 CH₂=CHCH₂), 3.08 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz, H_{eq} of ArCH₂Ar), 3.07 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz, H_{eq} of ArCH₂Ar), 3.05 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz, H_{eq} of ArCH₂Ar), 2.77-2.72 (m, 4H, 2 CH₂=CHCH₂), 2.12-1.98 (m, 4H, 2 CH₃CH₂CH₂O), 1.94-1.82 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂O), 1.60, 1.44, 1.39 (3s, 12H, 4 Me), 1.10 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃CH₂CH₂O), 0.87 (t, 6H, *J* = 7.0 Hz, 2 CH₃CH₂CH₂O). ¹³C NMR (75 MHz): δ 156.2 (C), 156.1 (C), 153.6 (C), 152.4 (C), 138.75 (CH), 138.66 (CH), 138.0 (CH), 137.8 (CH), 137.1 (C), 136.9 (C), 136.8 (C), 136.3 (C), 134.0 (C), 133.8 (C), 132.9 (C), 132.7 (C), 131.8 (C), 129.4 (CH), 129.0 (CH), 127.3 (CH), 127.1 (CH), 115.0 (CH₂), 114.9 (CH₂), 114.8 (CH₂), 114.6 (CH₂), 112.9 (C), 109.0 (C), 106.6 (CH), 79.1 (CH), 78.9 (CH), 76.2 (CH), 73.3 (CH), 77.1 (CH₂), 76.5 (CH₂), 76.4 (CH₂), 66.6 (CH₂), 39.5 (CH₂), 39.35 (CH₂), 39.30 (CH₂), 31.7 (CH₂), 31.0 (CH₂), 30.9 (CH₂), 26.9 (CH₃), 26.1 (CH₃), 25.5

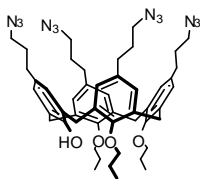
(CH₃), 24.7 (CH₃), 23.5 (CH₂), 22.7 (CH₂), 10.8 (CH₃), 10.1 (CH₃), 9.7 (CH₃). ESI MS (953.25):
971.7 (M + NH₄⁺).

5,11,17,23-Tetrakis(3-hydroxypropyl)-25-(2,3:5,6-di-*O*-isopropylidene- β -D-mannofuranosyl)-26,27,28-tripropoxy-calix[4]arene (6).



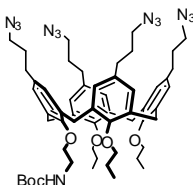
To a cooled (0 °C), stirred solution of **5** (950 mg, 1.00 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was added dropwise 9-boracyclo[3.3.1]nonane (32 mL, 16.0 mmol, of a 0.5 M solution in hexane). The solution was allowed to reach room temperature in 3 h, then cooled to 0 °C and slowly diluted with 10 M NaOH (1 mL) and 35% H₂O₂ (3 mL). The mixture was stirred at room temperature for 15 min and then warmed to 60 °C. Stirring was continued for an additional 2 h, then the mixture was cooled to room temperature, diluted with 1 M phosphate buffer at pH 7 (80 mL), concentrated to remove the organic solvents, and extracted with AcOEt (2 x 100 mL). The combined organic phases were dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residue was eluted from a column of Sephadex LH 20 with 1:1 CH₂Cl₂-MeOH to give **6** (840 mg, 82%) as a white solid. An analytical sample was obtained by preparative TLC (silica gel 60, 0.5 mm, 10:1 CHCl₃-CH₃OH); [α]_D = -15.6 (*c* 0.3, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz): δ 7.01-6.95 (m, 4H, Ar), 6.18-6.07 (m, 4H, Ar), 4.82 (dd, 1H, $J_{1,2}$ = 3.0, $J_{2,3}$ = 5.6 Hz, H-2), 4.73 (dd, 1H, $J_{3,4}$ = 3.9 Hz, H-3), 4.71 (d, 1H, H-1), 4.66 and 3.03 (2d, 2H, J = 13.5 Hz, ArCH₂Ar), 4.50-4.45 (m, 1H, H-5), 4.46 (d, 1H, J = 13.0 Hz, H_{ax} of ArCH₂Ar), 4.43 (d, 1H, J = 13.0 Hz, H_{ax} of ArCH₂Ar), 4.38 (d, 1H, J = 13.0 Hz, H_{ax} of ArCH₂Ar), 4.26 and 3.89 (2dt, 2H, J = 5.9, 11.0 Hz, CH₃CH₂CH₂O), 4.16-3.98 (m, 4H, 2 H-6, CH₃CH₂CH₂O), 3.64 (t, 6H, J = 7.0 Hz, CH₃CH₂CH₂O, 2 CH₂CH₂CH₂OH), 3.49 (t, 4H, J = 7.0 Hz, 2 CH₂CH₂CH₂OH), 3.42 (dd, 1H, $J_{4,5}$ = 6.8 Hz, H-4), 3.10 (d, 1H, J = 13.0 Hz, H_{eq} of ArCH₂Ar), 3.09 (d, 1H, J = 13.0 Hz, H_{eq} of ArCH₂Ar), 3.07 (d, 1H, J = 13.0 Hz, H_{eq} of ArCH₂Ar), 2.72 (t, 4H, J = 6.5 Hz, 2 CH₂CH₂CH₂OH), 2.19-1.98 (m, 16H, 4 CH₂CH₂CH₂OH, 2 CH₂CH₂CH₂OH, 2 CH₃CH₂CH₂O), 1.90 (tq, 2H, J = 7.0, 7.0 Hz, CH₃CH₂CH₂O), 1.60, 1.42, 1.40 (3s, 12H, 4 Me), 1.09 (t, 3H, J = 7.0 Hz, CH₃CH₂CH₂O), 0.89 (t, 6H, J = 7.0 Hz, 2 CH₃CH₂CH₂O). ¹³C NMR (75 MHz): δ 155.9 (C), 155.8 (C), 153.2 (C), 152.0 (C), 137.1 (C), 137.0 (C), 136.8 (CH), 136.3 (C), 135.8 (C), 134.8 (C), 134.6 (C), 133.8 (C), 132.7 (C), 132.5 (C), 131.6 (C), 129.0 (CH), 128.7 (CH), 127.0 (CH), 126.9 (CH), 126.8 (CH), 112.8 (C), 109.0 (C), 106.7 (CH), 79.1 (CH), 78.9 (CH), 77.4 (CH₂), 76.9 (CH₂), 76.5 (CH₂), 76.1 (CH), 73.3 (CH), 66.6 (CH₂), 62.45 (CH₂), 62.39 (CH₂), 62.2 (CH₂), 62.1 (CH₂), 34.2 (CH₂), 33.64 (CH₂), 33.57 (CH₂), 31.6 (CH₂), 31.1 (CH₂), 30.8 (CH₂), 26.9 (CH₃), 26.1 (CH₃), 25.5 (CH₃), 24.6

(CH₃), 23.5 (CH₂), 22.7 (CH₂), 10.8 (CH₃), 10.2 (CH₃), 9.8 (CH₃). ESI MS (1025.33): 1048.2 (M + Na⁺).

5,11,17,23-Tetrakis(3-azidopropyl)-25-hydroxy-26,27,28-tripropoxy-calix[4]arene (7).

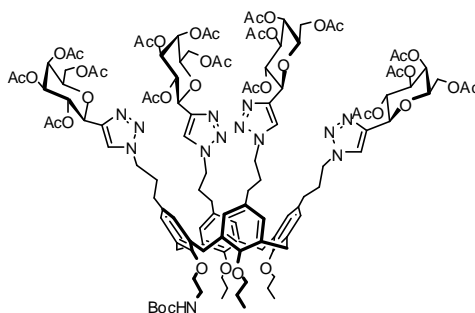
A mixture of calixarene tetrol **6** (774 mg, 0.76 mmol), sodium azide (390 mg, 6.00 mmol), diphenyl phosphoryl azide (980 μ L, 4.53 mmol), 1,8-diazabicyclo[5.4.0.]undec-7-ene (450 μ L, 3.02 mmol), and anhydrous DMF (4 mL) was stirred at 110 $^{\circ}$ C for 16 h then cooled to room temperature, diluted with Et₂O (100 mL), washed with H₂O (20 mL), dried (Na₂SO₄), and concentrated. A solution of the residue in 2:1 CH₂Cl₂-CF₃CO₂H (6 mL) was kept at room temperature for 3 h, then concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 2:1 CH₂Cl₂-cyclohexane to give **7** (397 mg, 60%) as a syrup. ¹H NMR (300 MHz): δ 6.99 (s, 2H, Ar), 6.90 (s, 2H, Ar), 6.25-6.20 (m, 4H, Ar), 4.84 (s, 1H, OH), 4.38 and 3.36 (2d, 4H, J = 13.0 Hz, 2 ArCH₂Ar), 4.35 and 3.24 (2d, 4H, J = 13.6 Hz, 2 ArCH₂Ar), 3.86-3.80 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂O), 3.73 (t, 4H, J = 7.0 Hz, 2 CH₃CH₂CH₂O), 3.33 (t, 2H, J = 7.0 Hz, CH₂CH₂CH₂N₃), 3.30 (t, 2H, J = 7.0 Hz, CH₂CH₂CH₂N₃), 2.96 (t, 4H, J = 6.8 Hz, 2 CH₂CH₂CH₂N₃), 2.75 (t, 2H, J = 7.0 Hz, CH₂CH₂CH₂N₃), 2.68 (t, 2H, J = 7.0 Hz, CH₂CH₂CH₂N₃), 2.37-2.24 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂O), 2.14 (t, 4H, J = 7.5 Hz, 2 CH₂CH₂CH₂N₃), 2.04-1.82 (m, 12H, 2 CH₂CH₂CH₂N₃, 2 CH₃CH₂CH₂O), 1.45 (tt, 4H, J = 7.0, 7.0 Hz, 2 CH₂CH₂CH₂N₃), 1.13 (t, 6H, J = 7.5 Hz, 2 CH₃CH₂CH₂O), 0.94 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH₃CH₂CH₂O). ¹³C NMR (75 MHz): δ 154.9 (C), 152.8 (C), 151.4 (C), 136.8 (C), 135.1 (C), 134.8 (C), 133.2 (C), 132.6 (C), 131.2 (C), 130.7(C), 129.0 (CH), 128.3 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 77.6 (CH₂), 76.6 (CH₂), 50.6 (CH₂), 50.3 (CH₂), 32.1 (CH₂), 31.9 (CH₂), 31.8 (CH₂), 30.8 (CH₂), 30.7 (CH₂), 30.5 (CH₂), 30.4 (CH₂), 23.4 (CH₂), 22.2 (CH₂), 10.8 (CH₃), 9.5 (CH₃). ESI MS (883.10): 901.4 (M + NH₄⁺).

5,11,17,23-Tetrakis(3-azidopropyl)-25-(2-*t*-butoxycarbonyl-aminoethoxy)-26,27,28-tripropoxy-calix[4]arene (8).



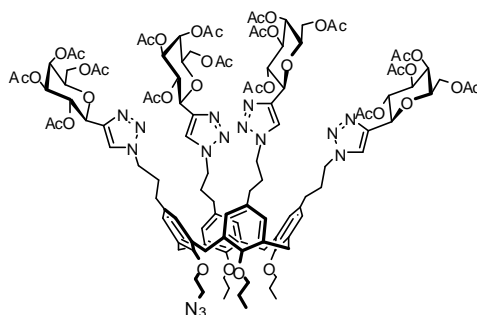
To a stirred solution of alcohol **7** (110 mg, 0.12 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) was added NaH (15 mg, 0.37 mmol, of a 60% dispersion in oil) and, after 15 min, 1-bromo-2-*t*-butoxycarbonylaminoethane (84 mg, 0.38 mmol). The mixture was stirred at 50 °C for 18 h, then cooled to room temperature, diluted with 1 M phosphate buffer at pH 7 (15 mL) and extracted with Et₂O (2 x 50 mL). The combined organic phases were dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 1:1 CH₂Cl₂-cyclohexane (containing 0.3% of Et₃N) to give **8** (64 mg, 50%) as a syrup; ¹H NMR (400 MHz): δ 6.98 (bt, 1H, *J* = 6.0 Hz, NH), 6.85 (s, 4H, Ar), 6.08 (s, 2H, Ar), 6.05 (s, 2H, Ar), 4.40 and 3.06 (2d, 4H, *J* = 12.8 Hz, 2 ArCH₂Ar), 4.25 and 3.09 (2d, 4H, *J* = 13.2 Hz, 2 ArCH₂Ar), 3.99 (t, 2H, *J* = 4.5 Hz, OCH₂CH₂N), 3.98-3.92 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂O), 3.86-3.79 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂O), 3.77-3.71 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂O), 3.64 (dt, 2H, *J* = 4.5, 6.0 Hz, OCH₂CH₂N), 3.28 (t, 4H, *J* = 6.8 Hz, 2 CH₂CH₂CH₂N₃), 3.04 (t, 4H, *J* = 7.2 Hz, 2 CH₂CH₂CH₂N₃), 2.67 (t, 4H, *J* = 6.8 Hz, 2 CH₂CH₂CH₂N₃), 2.07 (t, 4H, *J* = 7.2 Hz, 2 CH₂CH₂CH₂N₃), 1.93 (tt, 4H, *J* = 6.8, 6.8 Hz, 2 CH₂CH₂CH₂N₃), 1.87-1.76 (m, 6H, 3 CH₃CH₂CH₂O), 1.52 (s, 9H, *t*-Bu), 1.47 (tt, 4H, *J* = 7.2, 7.2 Hz, 2 CH₂CH₂CH₂N₃), 0.94 (t, 6H, *J* = 7.5 Hz, 2 CH₃CH₂CH₂O), 0.86 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, CH₃CH₂CH₂O). ¹³C NMR (75 MHz): δ 156.5 (C), 155.3 (C), 154.9 (C), 153.1 (C), 136.3 (C), 136.2 (C), 134.8 (C), 134.1 (C), 133.9 (C), 133.2 (C), 133.0 (C), 129.0 (CH), 128.7 (CH), 127.6 (CH), 127.4 (CH), 78.9 (C), 77.2 (CH₂), 76.5 (CH₂), 75.2 (CH₂), 50.6 (CH₂), 50.5 (CH₂), 41.0 (CH₂), 32.0 (CH₂), 31.0 (CH₂), 30.9 (CH₂), 30.6 (CH₂), 30.4 (CH₂), 28.7 (CH₃), 22.7 (CH₂), 22.5 (CH₂), 10.2 (CH₃). ESI MS (1026.28): 1044.7 (M + NH₄⁺).

5,11,17,23-Tetrakis{3-[4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galacto-pyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]propyl}-25-(2-*t*-butoxycarbonyl-aminoethoxy)-26,27,28-tripropoxy-calix[4]arene (10).



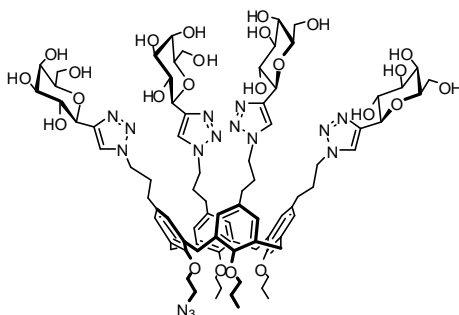
A mixture of calix[4]arene tetra-azide **8** (34 mg, 0.03 mmol), ethynyl *C*-galactoside **9** (47 mg, 0.12 mmol), freshly distilled *N,N*-diisopropylethylamine (105 μ L, 0.60 mmol), CuI (6 mg, 0.03 mmol), and anhydrous toluene (1 mL) was stirred in the dark at room temperature for 18 h, then concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with AcOEt (containing 0.3% of Et₃N) to give **10** (55 mg, 75%), a white foam; $[\alpha]_D = -8.8$ (*c* 0.7, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz): δ 7.72 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.71 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.58 (s, 2H, 2 H-5 Tr.), 6.90 (bt, 1H, *J* = 5.5 Hz, NH), 6.84 (s, 4H, Ar), 6.07 (s, 2H, Ar), 6.04 (s, 2H, Ar), 5.53-5.51 (4dd, 4H, 4 H-4), 5.47-5.38 (4dd, 4H, 4 H-2), 5.21-5.17 (4dd, 4H, 4 H-3), 4.76 (d, 2H, *J*_{1,2} = 10.0 Hz, 2 H-1), 4.72 (d, 2H, *J*_{1,2} = 10.0 Hz, 2 H-1), 4.40 and 3.07 (2d, 4H, *J* = 13.2 Hz, 2 ArCH₂Ar), 4.36-4.30 (4ddd, 4H, 4 H-5), 4.27 and 3.09 (2d, 4H, *J* = 13.2 Hz, 2 ArCH₂Ar), 4.14-4.07 (m, 16H, 8 H-6, 4 ArCH₂CH₂CH₂), 4.01-4.00 (m, 2H, OCH₂CH₂N), 3.97-3.93 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂O), 3.85-3.81 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂O), 3.76-3.72 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂O), 3.63-3.60 (m, 2H, OCH₂CH₂N), 2.63-2.58 (m, 4H, 2 ArCH₂CH₂CH₂), 2.24-2.19 (m, 4H, 2 ArCH₂CH₂CH₂), 2.17, 2.16, 2.03, 2.02, 1.99, 1.91, and 1.88 (7s, 48H, 16 Ac), 2.04-1.85 (m, 8H, 4 ArCH₂CH₂CH₂), 1.85-1.74 (m, 6H, 3 CH₃CH₂CH₂O), 1.52 (s, 9H, *t*-Bu), 0.95 (t, 6H, *J* = 7.5 Hz, 2 CH₃CH₂CH₂O), 0.86 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, CH₃CH₂CH₂O). ¹³C NMR (75 MHz): δ 170.4 (C), 170.1 (C), 170.0 (C), 169.7 (C), 169.6 (C), 156.4 (C), 155.3 (C), 155.1 (C), 153.3 (C), 144.4 (C), 144.1 (C), 136.3 (C), 136.2 (C), 134.0 (C), 133.4 (C), 133.1 (C), 129.0 (CH), 128.9 (CH), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 127.3 (CH), 122.1 (CH), 78.9 (C), 77.5 (CH₂), 76.7 (CH₂), 75.2 (CH₂), 74.7 (CH), 73.7 (CH), 71.8 (CH), 68.7 (CH), 67.6 (CH), 61.5 (CH₂), 49.7 (CH₂), 49.5 (CH₂), 40.9 (CH₂), 31.8 (CH₂), 31.0 (CH₂), 28.6 (CH₃), 22.7 (CH₂), 20.65 (CH₃), 20.57 (CH₃), 10.2 (CH₃). ESI MS (2451.58): 1227.4 (M + 2H⁺)/2.

5,11,17,23-Tetrakis{3-[4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galacto-pyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]propyl}-25-(2-azidoethoxy)-26,27,28-tripropoxy-calix[4]arene (11).



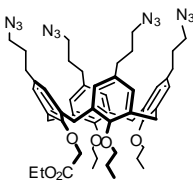
A solution of **10** (196 mg, 0.08 mmol) in CH_2Cl_2 (8 mL) and $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (4 mL) was kept at room temperature for 1 h, then concentrated. To a mixture of the crude ammonium salt, K_2CO_3 (60 mg, 0.44 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2 mg, 8 μmol), CH_3OH (4 mL), and CH_3CN (1 mL), was added imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride²⁹ (40 mg, 0.20 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 6 h, then concentrated, diluted with acetic anhydride (2 mL) and pyridine (2 mL), stirred for an additional 3 h, and concentrated. The residue was diluted with H_2O (10 mL) and extracted with AcOEt (2 x 50 mL). The combined organic phases were dried (Na_2SO_4) and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with AcOEt to give **11** (132 mg, 69%) as a white foam; $[\alpha]_{\text{D}} = -10.2$ (c 0.7, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz): δ 7.69 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.67 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.59 (s, 2H, 2 H-5 Tr.), 6.71 (s, 4H, Ar), 6.22 (s, 2H, Ar), 6.17 (s, 2H, Ar), 5.54-5.51 (4dd, 4H, 4 H-4), 5.44 (dd, 2H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 10.0$ Hz, 2 H-2), 5.42 (dd, 2H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 10.0$ Hz, 2 H-2), 5.22-5.16 (4dd, 4H, 4 H-3), 4.76 (d, 2H, 2 H-1), 4.73 (d, 2H, 2 H-1), 4.40 and 3.07 (2d, 4H, $J = 13.1$ Hz, 2 ArCH_2Ar), 4.34 and 3.10 (2d, 4H, $J = 13.1$ Hz, 2 ArCH_2Ar), 4.32-4.25 (m, 4H, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 4.18-4.07 (m, 18H, 4 H-5, 8 H-6, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.92-3.86 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.78-3.69 (m, 4H, 2 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.53-2.47 (m, 4H, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.17, 2.16, 2.03, 2.02, 1.99, 1.90, and 1.88 (7s, 48H, 16 Ac), 2.18-2.08 (m, 8H, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.94-1.84 (m, 10H, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 3 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.04 (t, 6H, $J = 7.4$ Hz, 2 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 0.94 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz): δ 170.4 (C), 170.1 (C), 170.0 (C), 169.7 (C), 155.6 (C), 155.0 (C), 154.1 (C), 144.4 (C), 144.2 (C), 135.8 (C), 135.6 (C), 134.0 (C), 133.8 (C), 133.6 (C), 133.4 (C), 128.5 (CH), 127.8 (CH), 127.5 (CH), 122.1 (CH), 77.2 (CH_2), 76.5 (CH_2), 74.7 (CH), 73.8 (CH), 71.9 (CH), 71.3 (CH_2), 68.6 (CH), 67.6 (CH), 61.5 (CH_2), 50.7 (CH_2), 49.7 (CH_2), 49.6 (CH_2), 31.9 (CH_2), 30.9 (CH_2), 30.8 (CH_2), 29.6 (CH_2), 23.3 (CH_2), 23.0 (CH_2), 20.7 (CH_3), 20.6 (CH_3), 10.5 (CH_3), 10.0 (CH_3). ESI MS (2377.46): 1189.7 ($\text{M} + 2\text{H}^+$)/2; 1200.7 ($\text{M} + \text{Na}^+ + \text{H}^+$)/2.

5,11,17,23-Tetrakis{3-[4-(β -D-galactopyranosyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]propyl}-25-(2-azidoethoxy)-26,27,28-tripropoxy-calix[4]arene (1).



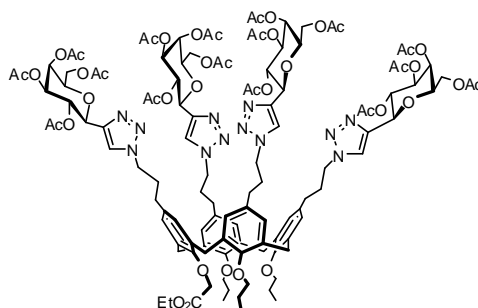
A solution of **11** (15 mg, 0.006 mmol) in a 2 M solution of NH_3 in CH_3OH (1 mL) was kept at room temperature for 16 h, then concentrated. The residue was eluted from a C18 silica gel cartridge with $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}$ (from 1:1 to 1:5), then CH_3OH , to give **1** (9.7 mg, 90%) as an amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}} = +14.2$ (c 0.4, CH_3OH). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.06, 8.03, 7.92, and 7.91 (4s, 4H, 4 H-5 Tr.), 6.79 (s, 4H, Ar), 6.47-6.45 (m, 2H, Ar), 6.40 (bs, 2H, Ar), 4.44 and 3.12 (2d, 4H, $J = 12.7$ Hz, 2 ArCH_2Ar), 4.39-4.34 (3d, 4H, 4 H-1), 4.37 and 3.14 (2d, 4H, $J = 12.8$ Hz, 2 ArCH_2Ar), 4.19 (t, 4H, $J = 7.3$ Hz, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 4.10-4.05 (m, 6H, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.99-3.87 (m, 12H, 4 H-4, 4 H-2, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.79-3.64 (m, 16H, 4 H-5, 8 H-6, 2 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.64-3.59 (3d, 4H, $J_{2,3} = 9.5$, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 4 H-3), 2.42-2.36 (m, 4H, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.11-2.04 (m, 8H, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.02-1.90 (m, 6H, 3 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.84-1.76 (m, 4H, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.08 (t, 6H, $J = 7.5$ Hz, 2 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.00 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$). ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ 155.3 (C), 147.5 (C), 136.7 (C), 135.3 (C), 130.0 (CH), 129.3 (CH), 124.9 (CH), 80.9 (CH), 78.3 (CH_2), 76.3 (CH), 72.1 (CH), 71.0 (CH), 62.9 (CH_2), 52.2 (CH_2), 50.3 (CH_2), 33.0 (CH_2), 31.7 (CH_2), 24.6 (CH_2), 11.1 (CH_3), 10.6 (CH_3). ESI MS (1704.87): 1706.3 ($\text{M} + \text{H}^+$).

5,11,17,23-Tetrakis(3-azidopropyl)-25-(ethoxycarbonylmethoxy)-26,27,28-tripropoxy-calix[4]arene (12).



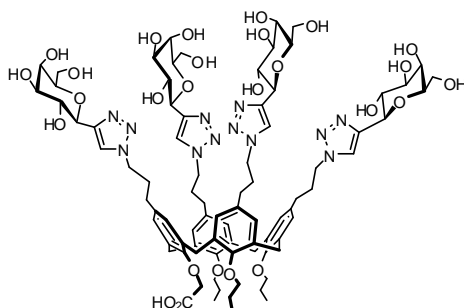
To a stirred solution of alcohol **7** (159 mg, 0.18 mmol) in anhydrous DMF (3 mL) was added NaH (15 mg, 0.37 mmol, of a 60% dispersion in oil) and, after 15 min, ethyl bromoacetate (60 μ L, 0.54 mmol). The mixture was stirred at 55 $^{\circ}$ C for 18 h, then cooled to room temperature, diluted with 1 M phosphate buffer at pH 7 (15 mL) and extracted with Et₂O (2 x 50 mL). The combined organic phases were dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 8:1 cyclohexane-AcOEt to give **12** (144 mg, 82%) as a syrup; ¹H NMR (400 MHz): δ 6.67 (s, 2H, Ar), 6.65 (s, 2H, Ar), 6.23 (s, 4H, Ar), 4.77 (s, 2H, OCH₂CO₂), 4.60 and 3.12 (2d, 4H, J = 13.5 Hz, 2 ArCH₂Ar), 4.39 and 3.07 (2d, 4H, J = 13.0 Hz, 2 ArCH₂Ar), 4.19 (q, 2H, J = 7.2 Hz, CO₂CH₂CH₃), 3.88-3.83 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂O), 3.80-3.70 (m, 4H, 2 CH₃CH₂CH₂O), 3.23 (t, 2H, J = 6.8 Hz, ArCH₂CH₂CH₂), 3.22 (t, 2H, J = 6.8 Hz, ArCH₂CH₂CH₂), 3.10 (t, 4H, J = 6.8 Hz, 2 ArCH₂CH₂CH₂), 2.55-2.50 (m, 4H, 2 ArCH₂CH₂CH₂), 2.22 (t, 4H, J = 7.5 Hz, 2 ArCH₂CH₂CH₂), 2.01-1.78 (m, 10H, 3 CH₃CH₂CH₂O, 2 ArCH₂CH₂CH₂), 1.66-1.56 (m, 4H, 2 ArCH₂CH₂CH₂), 1.30 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CO₂CH₂CH₃), 1.04 (t, 6H, J = 7.5 Hz, 2 CH₃CH₂CH₂O), 0.98 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH₃CH₂CH₂O). ¹³C NMR (75 MHz): δ 170.4 (C), 155.3 (C), 154.3 (C), 135.5 (C), 135.2 (C), 134.4 (C), 134.0 (C), 133.8 (C), 128.6 (CH), 128.3 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 77.0 (CH₂), 70.3 (CH₂), 60.2 (CH₂), 50.6 (CH₂), 32.0 (CH₂), 31.3 (CH₂), 30.8 (CH₂), 30.5 (CH₂), 23.2 (CH₂), 14.2 (CH₃), 10.5 (CH₃), 10.1 (CH₃). ESI MS (969.18): 987.4 (M + NH₄⁺).

5,11,17,23-Tetrakis{3-[4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galacto-pyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]propyl}-25-(ethoxycarbonyl-methoxy)-26,27,28-tripropoxy-calix[4]arene (13).



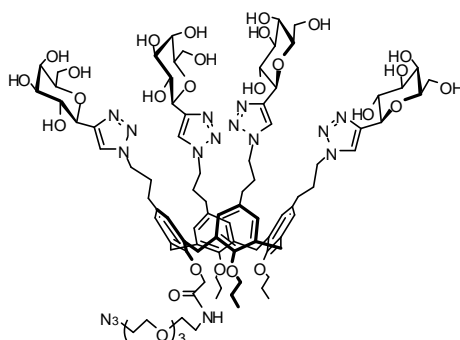
The cycloaddition between the tetra-azide **12** (140 mg, 0.14 mmol) and the ethynyl *C*-galactoside **9** (226 mg, 0.63 mmol) was carried out as described for the preparation of **10** to give, after column chromatography of silica gel (AcOEt), **13** (277 mg, 80%) as a white foam; $[\alpha]_D = -8.6$ (c 0.9, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz): δ 7.68 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.66 (s, 1H, H-5 Tr.), 7.59 (s, 2H, 2 H-5 Tr.), 6.66 (s, 2H, Ar), 6.65 (s, 2H, Ar), 6.23 (s, 2H, Ar), 6.22 (s, 2H, Ar), 5.53-5.51 (4dd, 4H, 4 H-4), 5.44 (dd, 2H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 10.0$ Hz, 2 H-2), 5.42 (dd, 2H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 10.0$ Hz, 2 H-2), 5.19 (dd, 2H, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 2 H-3), 5.18 (dd, 2H, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 2 H-3), 4.76 (s, 2H, OCH_2CO_2), 4.75 (d, 2H, 2 H-1), 4.73 (d, 2H, 2 H-1), 4.61 and 3.11 (2d, 4H, $J = 13.5$ Hz, 2 ArCH_2Ar), 4.39 and 3.06 (2d, 4H, $J = 13.0$ Hz, 2 ArCH_2Ar), 4.30-4.25 (m, 4H, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 4.18 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.16-4.08 (m, 16H, 4 H-5, 8 H-6, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.87-3.86 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.79-3.69 (m, 4H, 2 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.50-2.43 (m, 4H, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.17-2.09 (m, 8H, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.16, 2.02, 2.01, 1.99, 1.90, and 1.87 (6s, 48H, 16 Ac), 1.96-1.84 (m, 10H, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 3 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.27 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.01 (t, 6H, $J = 7.5$ Hz, 2 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 0.94 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz): δ 170.3 (C), 170.1 (C), 170.0 (C), 169.6 (C), 155.5 (C), 154.5 (C), 144.3 (C), 144.1 (C), 135.6 (C), 135.3 (C), 133.9 (C), 133.7 (C), 133.2 (C), 128.3 (CH), 127.6 (CH), 122.1 (CH), 76.9 (CH₂), 74.6 (CH), 73.7 (CH), 71.8 (CH), 70.2 (CH₂), 68.6 (CH), 67.5 (CH), 61.4 (CH₂), 60.2 (CH₂), 49.6 (CH₂), 31.8 (CH₂), 31.3 (CH₂), 30.8 (CH₂), 23.1 (CH₂), 20.6 (CH₃), 20.5 (CH₃), 14.1 (CH₃), 10.4 (CH₃), 10.0 (CH₃). ESI MS (2394.48): 1198.7 ($\text{M} + 2\text{H}^+$)/2.

5,11,17,23-Tetrakis{3-[4-(β -D-galactopyranosyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]propyl}-25-carboxymethoxy-26,27,28-tripropoxy-calix[4]arene (14).



A solution of **13** (100 mg, 0.04 mmol) in a 0.2 M solution of NaOEt in EtOH (2 mL, prepared from Na and EtOH immediately before the use) was kept at room temperature for 3 h in a nitrogen atmosphere, then neutralized with Dowex 50 X2-400 resin (H^+ form, activated and washed with H_2O and EtOH immediately before the use), and filtered through a sintered glass filter. The resin was washed with H_2O and DMF, and the solution was concentrated. A solution of the residue in 0.2 M aqueous NaOH (2 mL) was kept at room temperature for 24 h in a nitrogen atmosphere, then neutralized with Dowex 50 X2-400 resin (H^+ form, activated and washed with H_2O and EtOH immediately before the use), and filtered through a sintered glass filter. The resin was washed with H_2O and DMF, and the solution was concentrated. The residue was eluted from a C18 silica gel cartridge with 1:1 H_2O - CH_3OH , then CH_3OH , to give **14** (44 mg, 62%) as an amorphous solid; $[\alpha]_D = +14.2$ (c 0.5, DMF). 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6 + D_2O$) selected data: δ 8.04 (s, 2H, 2 H-5 Tr.), 7.96 (s, 2H, 2 H-5 Tr.), 6.76 (s, 4H, Ar), 6.50 (s, 2H, Ar), 6.47 (s, 2H, Ar), 4.60 (s, 2H, OCH_2CO_2), 4.45 and 3.14 (2d, 4H, $J = 13.0$ Hz, 2 $ArCH_2Ar$), 4.31 and 3.14 (2d, 4H, $J = 13.0$ Hz, 2 $ArCH_2Ar$), 2.37-2.26 (m, 4H, 2 $ArCH_2CH_2CH_2$), 2.18-2.08 (m, 4H), 2.04-1.75 (m, 14H), 0.96 (t, 6H, $J = 7.5$ Hz, 2 $CH_3CH_2CH_2O$), 0.93 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, $CH_3CH_2CH_2O$). ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6 + D_2O$) selected data: δ 146.9 (C), 135.5 (C), 134.7 (C), 128.5 (CH), 124.0 (CH), 80.0 (CH), 79.9 (CH), 75.5 (CH), 70.8 (CH), 69.5 (CH), 61.4 (CH_2), 49.3 (CH_2), 31.9 (CH_2), 23.3 (CH_2), 11.0 (CH_3). ESI MS (1693.84): 1694.7 ($M + H^+$).

5,11,17,23-Tetrakis{3-[4-(β -D-galactopyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]propyl}-25-[(11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amino)carbonyl-methoxy]-26,27,28-tripropoxy-calix[4]arene (2).



A mixture of **14** (21 mg, 0.012 mmol), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBT, 3 mg, 0.024 mmol), and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl-carbodiimide (EDC, 14 mg, 0.072 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) was stirred at room temperature for 30 min, then commercially available 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine **15** (10 μ L, 0.036 mmol) was added. Stirring was continued for an additional 48 h, then the solvent was removed under vacuum. The residue was eluted from a C18 silica gel cartridge with H₂O-CH₃OH (from 1:1 to 1:5), then CH₃OH, to give **2** (12 mg, 51%) as an amorphous solid; $[\alpha]_D = +14.5$ (*c* 0.4, CH₃OH). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.11, 8.10, 7.90, and 7.89 (4s, 4H, 4 H-5 Tr.), 6.94 (s, 2H, Ar), 6.91 (s, 2H, Ar), 6.30-6.26 (m, 4H, Ar), 4.82 (s, 2H, OCH₂CO₂), 4.43 and 3.27 (2d, 4H, *J* = 13.5 Hz, 2 ArCH₂Ar), 4.40 and 3.14 (2d, 4H, *J* = 13.0 Hz, 2 ArCH₂Ar), 4.39 (d, 2H, *J*_{1,2} = 9.8 Hz, 2 H-1), 4.34 (d, 2H, *J*_{1,2} = 9.8 Hz, 2 H-1), 4.28-4.22 (m, 4H, 2 ArCH₂CH₂CH₂), 4.11-4.06 (m, 4H, 2 ArCH₂CH₂CH₂), 3.99-3.91 (8 dd, 8H, 4 H-2, 4 H-4), 3.91-3.78 (m, 6H, 3 CH₃CH₂CH₂O), 3.76-3.56 (m, 30H), 3.31-3.29 (m, 2H), 2.58-2.51 (m, 4H, 2 ArCH₂CH₂CH₂), 2.27-2.16 (m, 4H, 2 ArCH₂CH₂CH₂), 2.05-1.97 (m, 4H, 2 ArCH₂CH₂CH₂), 1.95-1.72 (m, 10H, 2 ArCH₂CH₂CH₂, 3 CH₃CH₂CH₂O), 1.02 (t, 6H, *J* = 7.5 Hz, 2 CH₃CH₂CH₂O), 0.92 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, CH₃CH₂CH₂O). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 173.3 (C), 157.2 (C), 156.3 (C), 154.4 (C), 147.7 (C), 147.2 (C), 137.5 (C), 135.9 (C), 135.7 (C), 135.4 (C), 134.9 (C), 134.0 (C), 131.1 (CH), 130.3 (CH), 129.3 (CH), 128.9 (CH), 125.1 (CH), 124.9 (CH), 80.9 (CH), 78.9 (CH₂), 77.8 (CH₂), 76.3 (CH), 76.2 (CH), 75.0 (CH₂), 72.2 (CH), 72.0 (CH), 71.8 (CH₂), 71.7 (CH₂), 71.6 (CH₂), 71.2 (CH₂), 71.0 (CH), 70.9 (CH₂), 62.9 (CH₂), 51.7 (CH₂), 50.8 (CH₂), 50.4 (CH₂), 33.0 (CH₂), 32.5 (CH₂), 32.1 (CH₂), 24.2 (CH₂), 24.0 (CH₂), 10.8 (CH₃), 10.4 (CH₃). ESI MS (1894.08): 1895.3 (M + H⁺).

Mono- (16)³⁶ and di-alkyne (17)³⁶ solid supports were synthesized as previously described.

Synthesis of 5'-Cy3-oligonucleotides with 3'-mono- or 3'-di-alkyne functions.

The oligonucleotides were synthesized on a DNA synthesizer (ABI 394) using standard phosphoramidite chemistry starting from the monoalkyne **16** or the dialkyne **17** solid supports. Detritylation was performed with 3% DCA in CH₂Cl₂ for 35 s for the dimethoxytrityl groups and for 60 s for the monomethoxytrityl group (Cy3). For the coupling step, benzylmercaptotetrazole was used as activator (0.3 M in anhydrous CH₃CN), commercially available phosphoramidites (A, T, C, G, Cy3) (0.075 M in anhydrous CH₃CN) were introduced with a 20 s coupling time. The capping step was performed with acetic anhydride using commercial solution (Cap A: Ac₂O, pyridine, THF 10/10/80 and Cap B: 10% *N*-methylimidazole in THF) for 15 s. Oxidation was performed using a commercially available solution of iodine (0.1 M I₂, THF-pyridine-water 90:5:5) for 13 s.

Synthesis of 5'-Cy3-CCG CGT TGG ATT AGC (PePO galactosyl)₅ propanol (25).

Starting from 1,3-propanediol solid support five 3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)-2,2-bis(propargyloxymethyl)-propyl (2-cyanoethyl *N,N*-diisopropyl)-phosphoramidite¹¹ were coupled according to the phosphoramidite elongation cycle (see above) and the three first nucleotides. Solid supported DMTr-A^{bz}G^{ibu}C^{bz} decaalkyne derivative (0.6 μmol) was transferred into a microwave vial and 1-azido-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranoside^{12, 45} (30 μmol, 15.2 mg, in 100 μL of methanol), CuSO₄ (1.2 μmol, 6 μL of 200 mM water solution) and sodium ascorbate (6 μmol, 24 μL of 250 mM water solution) were added. The sealed vial was irradiated with microwaves for 20 min at 60 °C under magnetic stirring. After filtration, washing with methanol-water and dry acetonitrile, and drying under dessicator, the beads were transferred into a DNA column and the sequence was completed on the DNA synthesizer with a Cy3 at the 5'-end. After deprotection and HPLC purification the pure **25** was characterized by MALDI-TOF MS; *m/z* calculated for C₃₅₃H₅₃₁N₈₇O₂₀₈P₂₁ (M-H)⁻ 9972.02, found 9971.03.

General procedure for deprotection.

The beads were treated with concentrated aqueous ammonia (~1mL) at 55 °C for 6 h, then the supernatant was withdrawn and evaporated to dryness. The residue was dissolved in water for subsequent analyses.

Cu(I)-catalyzed cycloaddition for mono- and di-calix[4]arene oligonucleotide conjugates (22-23).

To monoalkyne oligonucleotide **20** (0.5 μmol) were added **1** (4 equiv., 100 μL of a 0.02 M solution in water), CuSO₄ (5 equiv., 2.5 μmol, 13 μL of a 0.2 M solution in H₂O), freshly prepared sodium ascorbate (25 equiv., 12.5 μmol, 64 μL of a 0.2 M solution in H₂O), and water (300 μL). The mixture was heated at 60 °C for 1 h in a sealed tube using a microwave synthesizer Initiator from Biotage (temperature monitored with an internal infrared probe). 500 μL of saturated aqueous EDTA solution was then added to the mixture and the resulting solution was desalted on NAP10. The crude product was purified on reversed-phase preparative HPLC to yield 111 nmol of pure compound **22**, determined by spectrophotometry at 550 nm ($\epsilon_{(Cy3)}=150000$). RT (HPLC) = 15.42 min; MALDI-TOF MS: m/z calculated for C₂₆₄H₃₄₅N₆₈O₁₂₄P₁₆ (M-H)⁻ 6950.62 found 6949.63.

The synthesis of conjugate **23** (70 nmol) was performed as described above using 6 equiv. of **2**. RT (HPLC) = 17.18 min; MALDI-TOF MS: m/z calculated for C₃₆₆H₄₉₀N₈₅O₁₅₇P₁₆ (M-H)⁻ 9087.98 found 9090.22.

Fabrication of Microarrays¹²

Silanisation of the glass slides. Borosilicate glass slides (Schott) bearing 52 microreactors³⁹ (2 mm diameter, 65-100 μm deep) were functionalised according to the protocol developed by Dugas *et al.*³⁷ In brief, after piranha treatment, the slides were heated under dry nitrogen for 2 h at 150 °C. Next, dry pentane (250 ml) and *tert*-butyl-11-(dimethylamino)silylundecanoate (300 μl) were added at room temperature. After 20 min of incubation, pentane was evaporated and the slides were heated at 150 °C overnight. Functionalised slides were obtained after washing in THF and rinsing in water. Deprotection of the ester function was performed using formic acid (7 h at room temperature). *N*-

Hydroxysuccinimide (0.1 M) and di(isopropyl)-carbodiimide (0.1 M) in dry THF were used for the activation of the acid functions.

Immobilization of DNA strands. 3'-Amino modified oligonucleotides were purchased from Eurogentec. Sequence 1 S1: 5'-GTG AGC CCA GAG GCA GGG-(CH₂)₇-NH₂, Sequence 2 S2: 5'-GCT AAT CCA ACG CGG GCC AAT CCT T-(CH₂)₇-NH₂ and Sequence 3 (negative control) S3: 5'-ATG CCC TCT TTG ATA TT-(CH₂)₇-NH₂ were used. At the bottom of the corresponding well, 1 µl of the desired sequence (25 µM in PBS 10x (pH 8.5)) were deposited. The coupling reaction was performed overnight at room temperature. Water was then allowed to slowly evaporate. The slides were washed with SDS 0.1% at 70 °C for 30 min and rinsed with deionized water.

Blocking. After immobilization all slides were blocked with Bovine Serum Albumin (BSA). Blocking was performed with a 4% BSA solution in PBS 1x (pH 7.4), at room temperature for 2 h. The glass slides were then washed in PBS 1x (pH 7.4)-Tween20 0.05% 3 x 3 minutes followed by PBS 1x (pH 7.4) 2-3 times, rinsed with deionized water, and dried by centrifugation.

Hybridization of the glycoconjugates on DNA array. Glycoconjugates bearing a DNA tag were hybridized with 1 µL of a solution at the desired concentrations (SSC 5x, 0.1% SDS) placed at the bottom of the corresponding well and allowed to hybridize overnight at room temperature in a H₂O vapor saturated chamber. The slides were washed in SSC 2x, 0.1% SDS at 51 °C for 1 min followed by SSC 2x at room temperature for an additional 5 min, and then rinsed with deionized water and dried by centrifugation.

Probing Microarrays

Cy5 Labelling of RCA 120 lectin. RCA 120 (Sigma) was labelled with Amersham Biosciences Cy5 Ab Labelling Kit according to the manufacturer's protocol. Protein concentration and the dye to protein ratio were estimated by optical density (nanodrop) reading the absorbance at 280 and 650 nm. Lectin concentration was estimated to be 4 µM bearing an average of 4 dyes per protein.

Labelling of PA-IL lectin (gift from A. Imberty, CERMAV) with Alexa 647 was performed with the microscale labelling kit from Invitrogen. Protein concentration was estimated according to the manufacturer protocol by reading the absorbance at 280 and 650 nm. The final lectin concentration was estimated at 28 μ M with a degree of labelling of 0.4.

The labeled lectin was diluted in PBS 1x (pH 7.4), CaCl₂ (final concentration 5 μ M) and 20% BSA (final concentration 2%) to the desired concentration. For IC₅₀ experiments, lactose was added into the solution at different final concentrations. 1 μ L of each solution was placed at the bottom of each well and incubated at 37 °C in a H₂O vapor saturated chamber for 2 h. Then the slides were washed in PBS1x (pH 7.4)-Tween20 0.02% for 10 min, dried by centrifugation, and scanned.

Fluorescence scanning. Fluorescent scanning was performed using a Microarray scanner, GenePix 4100A software package (Axon Instruments) (excitation 532/635 nm and emission 575/670 nm). The fluorescence signal of each conjugate was determined as the average of the mean fluorescence signal of four spots.

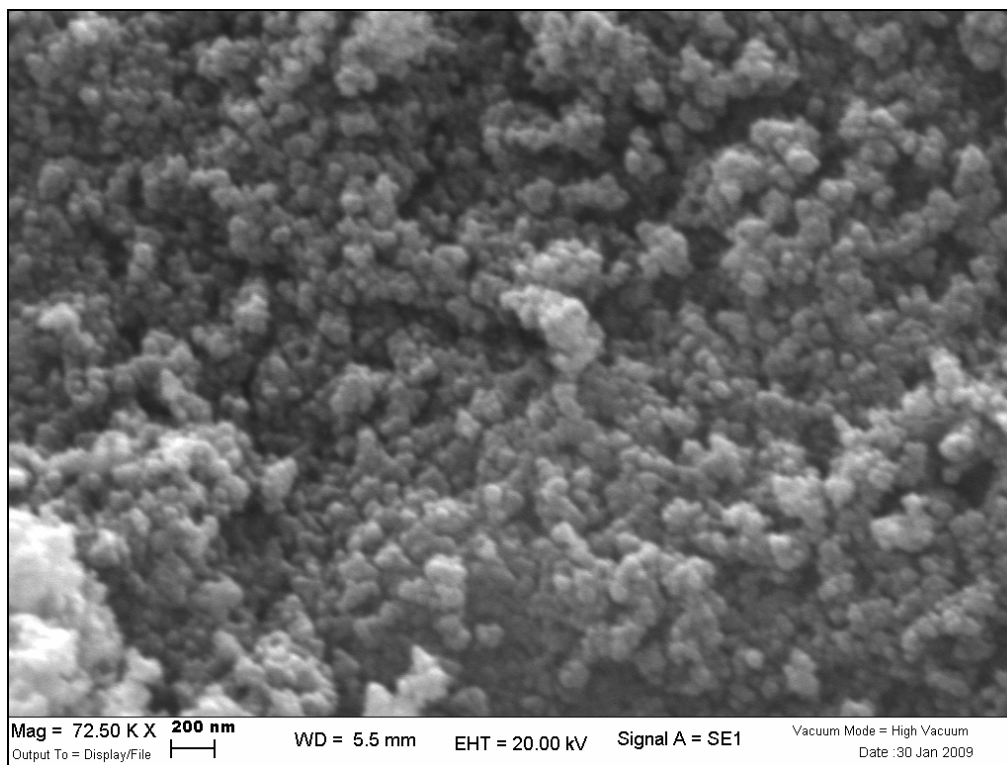
4.7 References

- 1) N. Firon, S. Ashkenasi, D. Mirelman, I. Ofek, N. Sharon, *Infect. Immun.* **1987**, *55*, 472-476.
- 2) R. Roy, M.-G. Baek, *Rev. Mol. Biotech.* **2002**, *90*, 291-309.
- 3) R. T. Lee, Y. C. Lee, C., in *Enhanced biochemical affinities of multivalent neoglycoconjugates* (Eds.: R. T. Lee, Y. C. Lee), Academic Press, San Diego, **1994**, pp. 23-50.
- 4) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327.
- 5) J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-576.
- 6) A. Salminen, V. Loimaranta, J. Joosten, A., A. Khan, S., J. Hacker, R. J. Pieters, J. Finne, *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 495-501.
- 7) a) K. Matsuura, M. Hibino, T. Ikeda, Y. Yamada, K. Kobayashi, *Chem. -Eur. J.* **2004**, *10*, 352-359; b) T. Ohta, N. Miura, N. Fujitani, F. Nakajima, K. Niikura, R. Sadamoto, C.-T. Guo, T. Suzuki, Y. Suzuki, K. Monde, S.-I. Nishimura, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5344-5347; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5186-5189; c) G. Glick, D., P. Toogood, L., D. Wiley, C., J. Skehel, J., J. Knowles, R., *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 23660-23669.
- 8) S. André, F. Sansone, H. Kaltner, A. Casnati, J. Kopitz, H.-J. Gabius, R. Ungaro, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1649-1661.

- 9) A. Imberty, M. Wimmerová, E. P. Mitchell, N. Gilboa-Garber, *Microbes Infect.* **2004**, *6*, 221-228.
- 10) C. Bouillon, A. Meyer, S. Vidal, A. Jochum, Y. Chevolut, J. P. Cloarec, J. P. Praly, J. J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4700-4702.
- 11) F. Morvan, A. Meyer, A. Jochum, C. Sabin, Y. Chevolut, A. Imberty, J. P. Praly, J. J. Vasseur, E. Souteyrand, S. Vidal, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1637-1643.
- 12) Y. Chevolut, C. Bouillon, S. Vidal, F. Morvan, A. Meyer, J. P. Cloarec, A. Jochum, J. P. Praly, J. J. Vasseur, E. Souteyrand, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2450-2454; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2398-2402.
- 13) J. Zhang, G. Pourceau, A. Meyer, S. Vidal, J. P. Praly, E. Souteyrand, J. J. Vasseur, F. Morvan, Y. Chevolut, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, in press.
- 14) a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708-2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599; b) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064; c) V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseven, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51-58; d) S. Dedola, S. A. Nepogodiev, R. A. Field, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1006-1017; e) A. Dondoni, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 700-708; f) J.-F. Lutz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1036-1043; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1018-1825; g) J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249-1262; h) P. Wu, V. V. Fokin, *Aldrichim. Acta* **2007**, *40*, 7-17; i) M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015.
- 15) Selected reviews: a) C. D. Gutsche, *Aldrichim. Acta* **1995**, *28*, 3-9; b) V. Böhmer, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 785-818; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 713-745; c) V. Böhmer, *Liebigs Ann. / Recueil* **1997**, 2019-2030; d) A. Ikeda; S. Shinkai, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1713-1734.
- 16) C. D. Gutsche, J. A. Levine, P. K. Sujeeth, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5802-5806.
- 17) a) J.-D. van Loon, A. Arduini, L. Coppi, W. Verboom, A. Pochini, R. Ungaro, S. Harkema, D. N. Renhoudt, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5639-5646; b) A. Arduini, M. Fabbri, M. Mantovani, L. Mirone, A. Pochini, A. Secchi, R. Ungaro, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1454-1457.
- 18) K. Iwamoto, K. Araki, S. Shinkai, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4955-4962.
- 19) Z.-C. Ho, M.-C. Ku, C.-M. Shu, L.-G. Lin, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13189-13200.
- 20) C.-M. Shu, W.-S. Chung, S.-H. Wu, Z.-C. Ho, L.-G. Lin, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2673-2679.

- 21) a) C. D. Gutsche, B. Dhawam, J. A. Levine, K. Hyun, L. J. Bauer, *Tetrahedron* **1983**, *39*, 409-426; b) K. Iwamoto, K. Araki, S. Shinkai, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 4325-4342; c) A. Dondoni, C. Ghiglione, A. Marra, M. Scoponi, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9535-9539.
- 22) a) A. Marra, M. C. Scherrmann, A. Dondoni, A. Casnati, P. Minari, R. Ungaro, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2533-2535; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 2479-2481; b) A. Dondoni, A. Marra, M. C. Scherrmann, A. Casnati, F. Sansone, R. Ungaro, *Chem. –Eur. J.* **1997**, *3*, 1774-1782.
- 23) a) A. Marra, A. Dondoni, F. Sansone, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5155-5158; b) A. Dondoni, M. Kleban, X. Hu, A. Marra, H. D. Banks, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4722-4733; c) A. Dondoni, A. Marra, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6339-6345.
- 24) a) A. Dondoni, A. Marra, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7546-7557; b) A. Marra, L. Moni, D. Pazzi, A. Corallini, D. Bridi, A. Dondoni, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1396-1409.
- 25) A. Vecchi, B. Melai, A. Marra, C. Chiappe, A. Dondoni, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6437-6440.
- 26) H. M. Chawla, N. Pant, B. Srivastava, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7259-7262.
- 27) L. C. Groenen, B. H. M. Ruël, A. Casnati, W. Verboom, A. Pochini, R. Ungaro, D. N. Reinhoudt, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 8379-8384.
- 28) F. Santoyo-González, A. Torres-Pinedo, A. Sánchez-Ortega, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4409-4414.
- 29) For two-step approaches to lower rim mono-alkylated calix[4]arene derivatives, see: a) A. Casnati, A. Arduini, E. Ghidini, A. Pochini, R. Ungaro, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2221-2228; b) S. Taghvaei-Ganjali, A. Modjallal, *Acta Chim. Slov.* **2001**, *48*, 427-430.
- 30) T. Lowary, M. Meldal, A. Helmboldt, A. Vasella, K. Bock, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9657-9668.
- 31) E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3797-3800.
- 32) R. K. Castellano, D. M. Rudkevich, J. Rebek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7132-7137.
- 33) S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- 34) G. Pourceau, A. Meyer, J. J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6014-6017.
- 35) J. Lietard, A. Meyer, J. J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 191-200.
- 36) R. Kumar, A. El-Sagheer, J. Tumpane, P. Lincoln, L. M. Wilhelmsson, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6859-6864.
- 37) V. Dugas, G. Depret, B. Chevalier, X. Nesme, E. Souteyrand, *Sens. Actuators B Chem.* **2004**, *101*, 112-121.
- 38) R. Mazurczyk, G. E. Khoury, V. Dugas, B. Hannes, E. Laurenceau, M. Cabrera, S. Krawczyk, E. Souteyrand, J. P. Cloarec, Y. Chevolut, *Sens. Actuators B Chem* **2008**, *128*, 552-559.

- 39) A. Imberty, M. Wimmerová, C. Sabin, E. P. Mitchell, In *Protein-Carbohydrate Interactions in Infectious Diseases* (Ed.: C. Bewley), RSC, Cambridge, **2006**, pp. 30-45.
- 40) H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674.
- 41) S. Park, M. R. Lee, S. J. Pyo, I. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4812-4819.
- 42) E. A. L. Biessen, D. M. Beuting, H. C. P. F. Roelen, G. A. Van de Marel, J. H. Van Boom, T. J. C. Van Berkel, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1538-1546.
- 43) Y. Lee, C., R. Townsend, R., M. Hardy, R., J. Lönngren, J. Arnarp, M. Haraldsson, H. Lönn, J., *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 199-202.
- 44) W. L. F. Armarego, C. L. L. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, 5th ed., Butterworth-Heinemann, Amsterdam, **2003**.
- 45) W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- 46) Z. Szurmai, L. Szabo, A. Liptak, *Acta Chim. Hung.* **1989**, *126*, 259-2.



5.1 Introduzione

La bionanotecnologia è un termine creato per indicare un'area di ricerca emergente che studia le proprietà e le applicazioni delle nanoparticelle nei sistemi biologici.¹ Le nanoparticelle infatti, grazie alle loro dimensioni (Figura 1) e forma, sono in grado di mimare le biomolecole presenti nei sistemi cellulari e per questo motivo offrono una vasta gamma di stimolanti opportunità per scoprire e studiare i processi biologici ed interferire con essi per scopi medici e diagnostici.² In particolare le nanoparticelle sono entità di dimensioni comprese fra 1 e 100 nm, e possiedono proprietà fisiche, elettroniche e chimiche strettamente dipendenti dalla dimensione, disposizione spaziale, caratteristiche della superficie, e forma.³

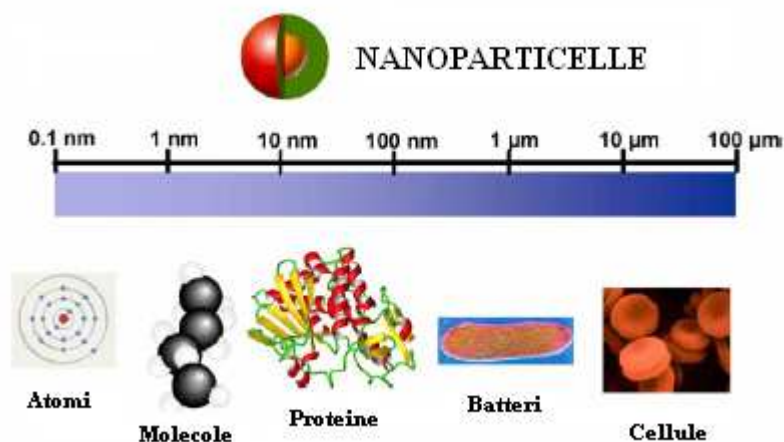


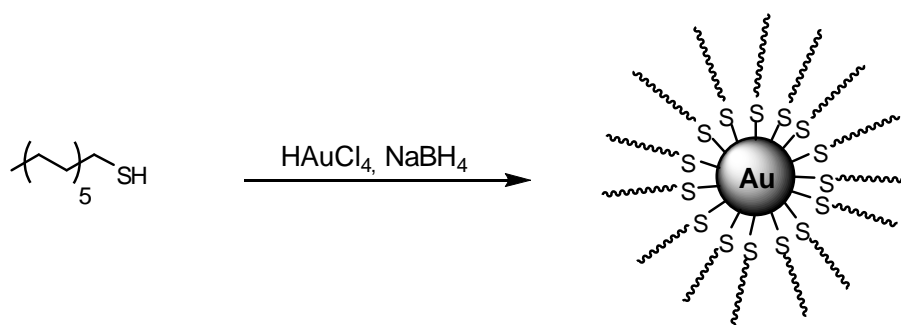
Figura 1: Confronto fra le dimensioni delle nanoparticelle e varie entità biologiche.

Le nanoparticelle possono essere composte da materiali isolanti, semiconduttori, o metalli (come tali o in altre forme, come ad esempio i loro ossidi).⁴ Le nanoparticelle costituite da materiali semiconduttori, sintetizzate con elementi appartenenti alle colonne II-VI e III-V della tavola periodica, sono chiamate “*quantum dots*”, e sono usate come marcatori biologici, grazie alle loro proprietà ottiche,⁵ o nelle celle fotovoltaiche per convertire la luce solare in energia elettrica.⁴ Anche le nanoparticelle magnetiche, come ad esempio quelle composte da atomi di oro e ferro (Au/Fe), hanno trovato ampio utilizzo nel campo industriale e biomedico. Un esempio è quello dell’ipertermia, una procedura terapeutica usata per uccidere selettivamente cellule tumorali, batteri o virus, che si basa sulla suscettibilità di alcune nanoparticelle magnetiche al riscaldamento ottenuto attraverso l’applicazione di un campo magnetico esterno.⁶ Tuttavia anche le nanoparticelle metalliche neutre godono di grande interesse nel campo delle nanotecnologie. A questo gruppo infatti appartengono le nanoparticelle di oro che probabilmente al giorno d’oggi sono le più studiate.²

All’interno di questo contesto negli ultimi anni è cresciuto l’interesse verso la sintesi di nanoparticelle rivestite da unità di carboidrato, chiamate gliconanoparticelle.^{2,7} Come già ampiamente spiegato nei capitoli precedenti, le cellule animali sono ricoperte sulla loro superficie da carboidrati, sottoforma di *glycocalyx*,⁸ cioè strutture complesse in cui appaiono per lo più coniugati a proteine e lipidi, ed è proprio in questa forma che esplicano la loro funzione biologica. Le gliconanoparticelle grazie alle loro dimensioni simili alle biomolecole, riescono a simulare la superficie delle cellule,⁹ e per questo motivo sono state utilizzate nello studio delle interazioni carboidrato-carboidrato e carboidrato-proteina, o come biomarcatori e biosensori.²

In letteratura sono noti tre tipi di gliconanoparticelle, caratterizzate da un differente materiale costituente il nucleo: quelle basate su oro e argento, i glico-*quantum dots* costituiti da materiali semiconduttori e le glicoparticelle magnetiche.

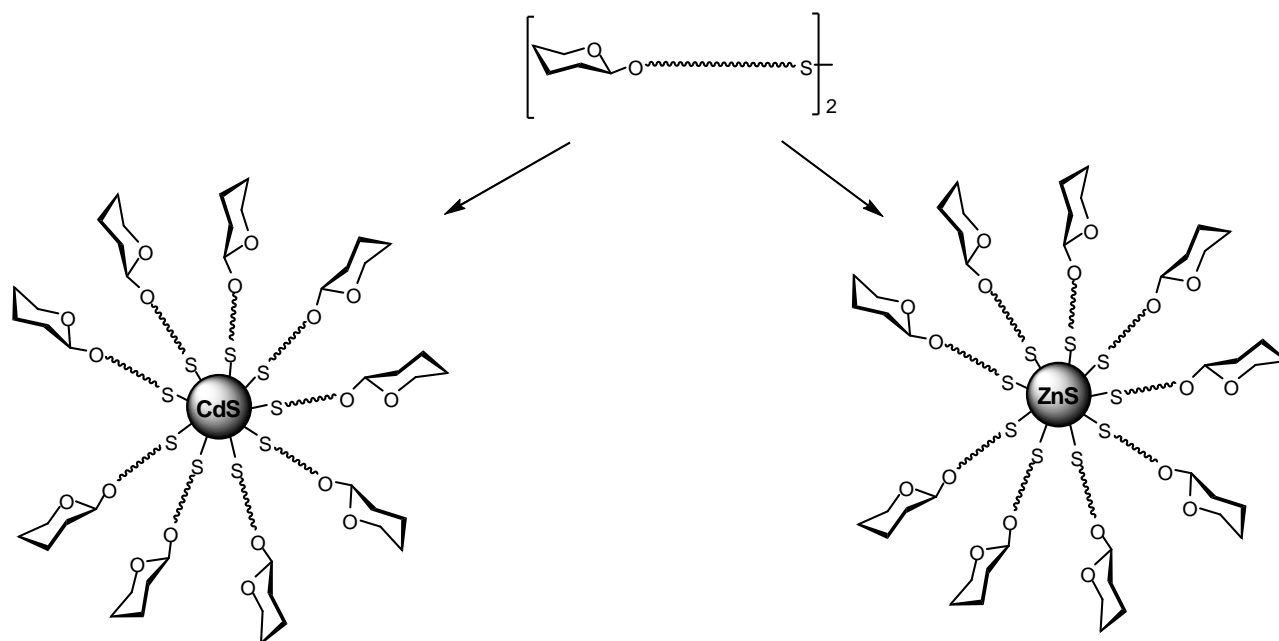
Le gliconanoparticelle di oro sono fra le più stabili, e possiedono proprietà molto interessanti che le hanno rese protagoniste nel campo delle nanotecnologie; il metodo di funzionalizzazione è stato messo a punto per la prima volta dal Prof. Brust,¹⁰ e si basa sul fatto che i tioli si legano fortemente agli atomi di oro formando un legame covalente oro-zolfo (Au-S) (Schema 1).



Schema 1

Utilizzando quindi glicoconiugati funzionalizzati con tioli sono state preparate nanoparticelle di oro ricoperte da monosaccaridi, come glucosio, galattosio e mannosio,¹¹ oppure da sistemi più complessi come oligosaccaridi.¹²

Il primo esempio di glico-*quantum dots* invece, è stato realizzato nel 2003 dal gruppo del Prof. Rosenzweig che ha preparato particelle di CdSe-ZnS rivestite con unità di carbossimetildestrano,¹³ saggiandone poi l'affinità verso la lectina glucosio specifica Concavalina A. Questi materiali sono particolarmente interessanti per il loro utilizzo come marcatori fluorescenti; essi presentano diversi vantaggi rispetto ai classici marcatori, come ad esempio il fatto che possono emettere ad una specifica lunghezza d'onda in dipendenza della loro dimensione, e che hanno una durata di emissione di fluorescenza più lunga. Nonostante questo non ci sono che pochi esempi in letteratura di *quantum dots* rivestiti da carboidrati, come le nanoparticelle di solfuro di cadmio e zinco funzionalizzate con unità tetrasaccaridiche di sLe^x (Sialil Lewis X),¹⁴ ottenute sfruttando una procedura simile a quella usata per le particelle di Au (Schema 2).



Schema 2

Le più comuni nanoparticelle magnetiche, infine, sono quelle di ossido di ferro. Il loro campo di applicazione è molto vasto, infatti negli ultimi anni sono state impiegate nello sviluppo di tecniche elettromagnetiche per la diagnosi selettiva di processi tumorali, nel controllo di processi biologici mediante campi elettromagnetici, e per la realizzazione di nano-macchine biologicamente attive, controllabili sempre per mezzo di un campo elettromagnetico esterno. Sebbene esistano numerosi esempi in cui le nanoparticelle magnetiche sono state funzionalizzate con proteine, peptidi o DNA, esistono pochi esempi di gliconanoparticelle.¹⁵

All'interno di questo contesto abbiamo pensato di studiare la possibilità di supportare *clusters* di zuccheri su nanoparticelle di biossido di titanio. Il biossido di titanio è un materiale non costoso, biocompatibile, che, grazie alle sue proprietà, viene sfruttato in molte applicazioni, fra le quali la fotocatalisi,¹⁶ le celle solari,¹⁷ la costruzione di biomateriali e come catalizzatore.¹⁸

In letteratura sono stati descritti tre modi per funzionalizzare con molecole di interesse biologico la superficie di un materiale. Uno dei più sfruttati è quello di rivestire le nanoparticelle con un polimero e successivamente legare in modo covalente le molecole bioattive al polimero stesso. Nonostante questa metodologia sia molto usata, spesso l'utilizzo di polimeri porta ad adsorbimenti aspecifici di sostanze non desiderate che possono interferire negativamente nel caso in cui le particelle vengano impiegate per scopi biologici. Un altro approccio è quello di coniugare covalentemente il composto capace di interagire con la superficie, con la molecola bioattiva e successivamente adsorbire il coniugato alle nanoparticelle: questo metodo apparentemente semplice porta lo svantaggio di dover realizzare composti bifunzionalizzati che possono avere sintesi anche molto laboriose.

Abbiamo quindi deciso di seguire il terzo approccio, secondo il quale un monostrato di molecole aventi gruppi capaci di interagire con la superficie è adsorbito sulle nanoparticelle, e successivamente i composti di interesse biologico vengono legati covalentemente al monostrato, ottenendo così nanoparticelle biofunzionalizzate.

In primo luogo abbiamo sintetizzato i calixareni **1** e **2** (Figura 2), che possiedono dei gruppi OH e COOH, capaci di ancorarsi alla superficie di biossido di titanio e di altri ossidi di metalli (ad esempio Fe_2O_3), e dei gruppi azidici che servono a legare le unità di zucchero opportunamente funzionalizzate con gruppi alchidici terminali, attraverso la reazione di cicloadizione catalizzata da ioni rame(I) CuAAC (*Copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition*).¹⁹

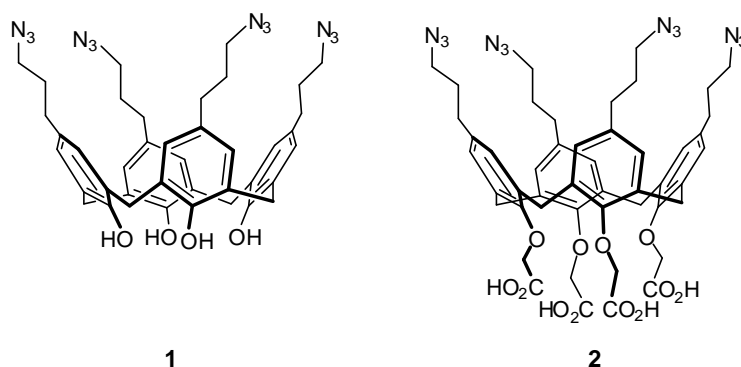


Figura 2

Il calix[4]arene è stato scelto per questo scopo in virtù delle sue proprietà: possiede una struttura tridimensionale che può essere predeterminata e che consente di legare facilmente gruppi funzionali sia al bordo inferiore che superiore; inoltre grazie alla multivalenza di questi composti siamo in grado di sintetizzare sulla superficie delle nanoparticelle dei *clusters* di zuccheri, e quindi di andarne a sfruttare l'eventuale effetto *cluster*.

La reazione di CuAAC è considerata un'ottima strategia per la funzionalizzazione di materiali e superfici. Sebbene la reazione possa essere condotta sia con le azidi che con i gruppi alchidici sulla superficie, esistono numerosi vantaggi quando sono le funzioni azidiche ad essere immobilizzate sul materiale, ad esempio, grazie al loro intenso assorbimento a 2098 cm^{-1} dovuto allo *stretching* asimmetrico del gruppo $\text{N}=\text{N}=\text{N}$, permettono di monitorare la reazione durante il processo per via spettroscopica. Inoltre avere le molecole che portano gli alchini in soluzione permette di rimuovere i sottoprodotti di *cross coupling* che eventualmente possono formarsi durante la reazione per la presenza di rame, semplicemente lavando la superficie.¹⁹

5.2 Sintesi di calix[4]areni bifunzionali

E' noto in letteratura che i fenoli²⁰ interagiscono fortemente con la superficie di biossido di titanio. Lo ione Ti-(IV) è infatti capace di spiazzare il protone dal gruppo OH, e formare un legame titanio-ossigeno. Questa reazione è particolarmente importante con i composti didrossi aromatici, e

specialmente nel caso dei catecoli, cioè gli 1,2-diidrossibenzene.²¹ In questo caso infatti il complesso di chelazione forma un anello a cinque termini, che conferisce una speciale stabilità al legame (Figura 3).

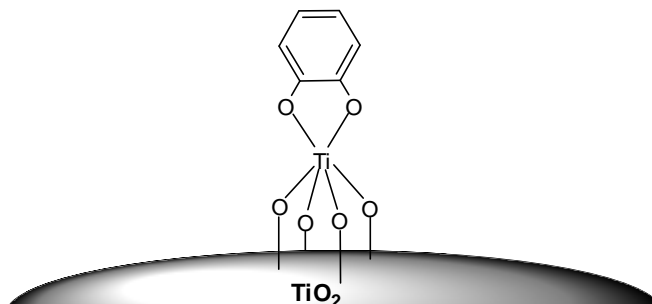


Figura 3

Anche i calixareni, grazie alla presenza dei gruppi fenolici al bordo inferiore, sono capaci di formare complessi con i metalli di transizione e con altri elementi della tavola periodica,²² tra i quali il titanio.²³ Sulla base di queste conoscenze abbiamo deciso di utilizzare il calixarene **1** che possiede i quattro gruppi ossidrilici liberi al bordo inferiore, come possibile ligando per le nanoparticelle di biossido di titanio.

Inoltre il Ti(IV) è capace di interagire con gli acidi organici, come ad esempio gli acidi carbossilici.²⁴ L'adsorbimento di acidi carbossilici semplici, come l'acido formico, sulla superficie di biossido di titanio è stato oggetto di molti studi, sperimentali²⁵ e teorici,²⁶ che hanno evidenziato come l'adsorbimento avvenga attraverso un processo di tipo dissociativo nel quale il protone dell'acido va a legarsi ad un ossigeno della superficie, formando un gruppo OH, e l'anione carbossilato si lega allo ione Ti⁴⁺.

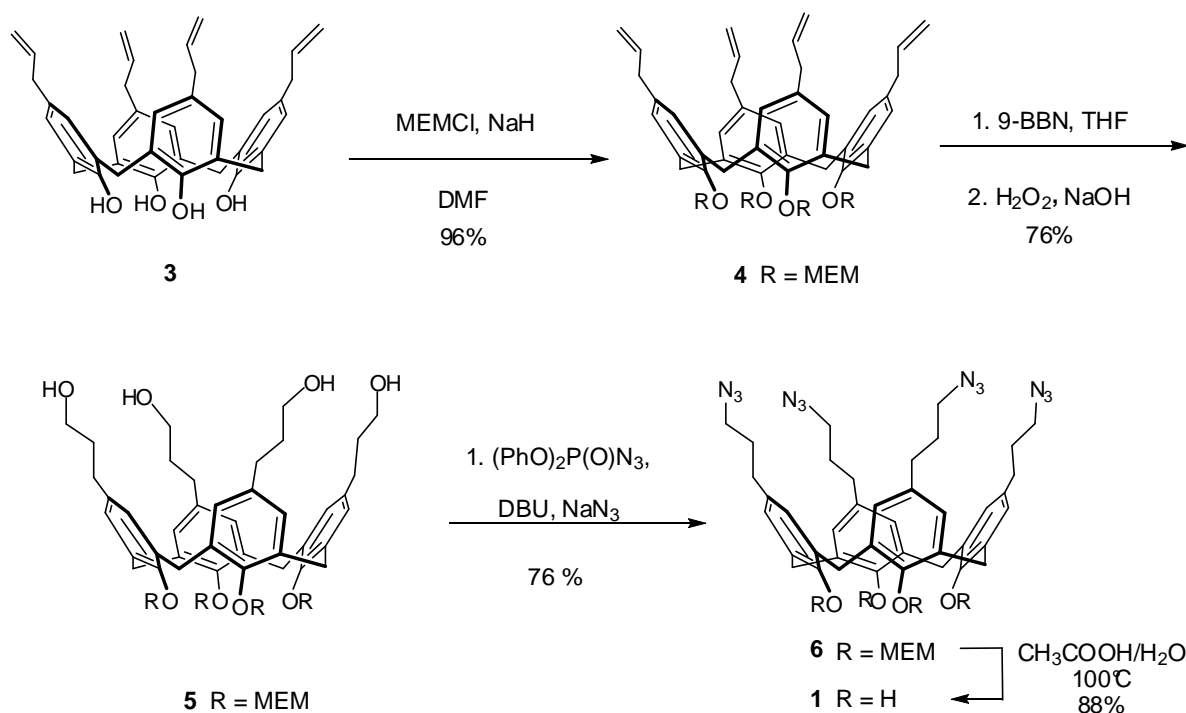
In base a studi teorici è stato anche stabilito che la natura dell'interazione è per lo più di tipo bidentato, nel quale entrambi gli ossigeni del carbossilato interagiscono con il titanio (Figura 4 - sinistra). Comunque in piccola percentuale è presente anche il legame diretto di un solo atomo di ossigeno al titanio, mentre l'altro forma un legame idrogeno con un ossigeno della superficie (Figura 4 - destra).

Sulla base di queste conoscenze è stato quindi sintetizzato come ulteriore ligando il calixarene **2**, in cui il bordo inferiore è funzionalizzato con quattro gruppi carbossilici.



Figura 4

Il derivato calix[4]arenico **1**, avente i gruppi fenolici liberi al bordo inferiore e quattro gruppi azidi al bordo superiore, è stato sintetizzato partendo dal derivato tetra-allilico **3** noto in letteratura.²⁷ Per raggiungere questo obiettivo dapprima sono stati protetti i gruppi OH attraverso l'alchilazione con cloruro di metossietossimetile (MEMCl) in presenza di NaH usando DMF come solvente (Schema 3). La classica reazione di Williamson per l'eterificazione di alcoli e fenoli porta al derivato tetra-allilico **4** che è stato isolato per cromatografia flash su colonna di gel di silice in resa del 96%.



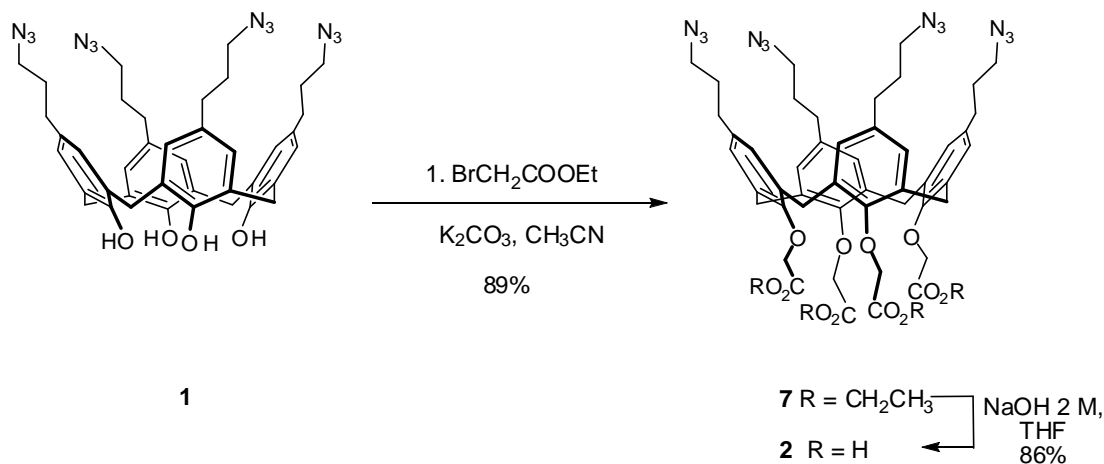
Schema 3

La trasformazione del tetra-allil-calixarene **4** in alcol primario **5** è stata ottenuta grazie alla reazione di idroborazione-ossidazione che permette l'aggiunta di acqua in maniera "anti-Markovnikov" al doppio legame carbonio-carbonio terminale (Schema 3). Il primo passaggio di questa sequenza si effettua usando un borano commerciale molto ingombrato stericamente, il 9-borabicyclo[3.3.1]nonano (9-BBN), che permette un'aggiunta all'alchene molto più regioselettiva

rispetto al semplice diborano (B_2H_6). Il tetrakis-trialchilborano intermedio viene poi ossidato con acqua ossigenata in presenza di idrossido di sodio per dare il tetrololo **5** in resa del 76% dopo cromatografia su una corta colonna di gel di silice.

Il prodotto desiderato **1** è stato quindi ottenuto attraverso l'utilizzo di un reattivo, la difenil fosforil azide (DPPA), che in ambiente basico (1,8-diaza-biciclo[5.4.0]undec-7-ene, DBU) consente di attivare in situ l'alcol come difenil fosfato e generare contemporaneamente lo ione azoturo N_3^- . L'alchil difenil fosfato così formato subisce la sostituzione nucleofila bimolecolare (S_N2) liberando lo ione fosfato e generando il calixarene tetra-azide **5**, che per successiva idrolisi acida del gruppo protettivo ha dato il prodotto desiderato **1** (Schema 3).

Il derivato calix[4]arenico **1** è stato utilizzato anche come intermedio per la sintesi del secondo ligando, il calix[4]arene **2**, che presenta quattro gruppi carbossilici al bordo inferiore come funzioni capaci di ancorarsi alla superficie delle nanoparticelle di biossido di titanio. Semplicemente per alchilazione con bromoacetato di etile utilizzando il carbonato di potassio come base, è stato ottenuto il derivato **7**, che per idrolisi in ambiente basico degli esteri etilici, ha condotto in buona resa al prodotto desiderato **2** (Schema 4).



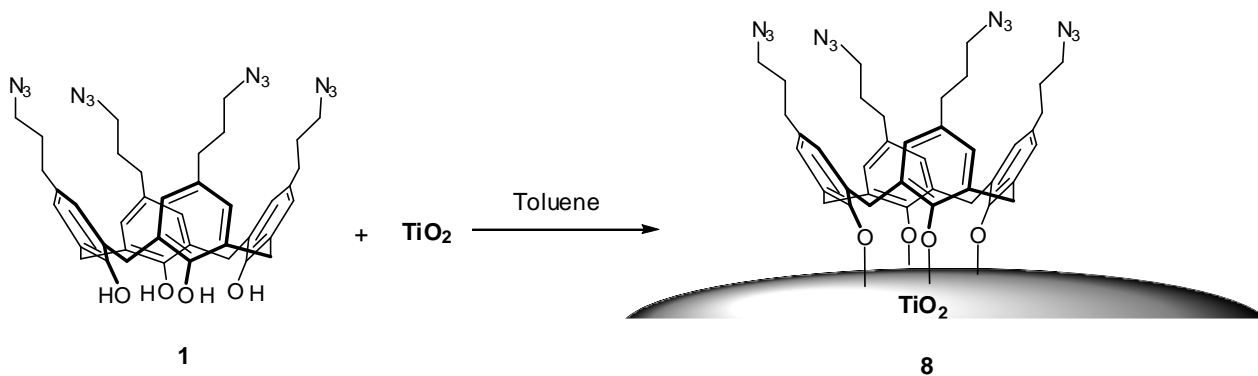
Schema 4

L'analisi spettroscopica ha confermato la conformazione a cono dei prodotti **1** e **2**; infatti nello spettro 1H -NMR di questi prodotti si notano i due doppietti a $\delta = ca. 3$ e $\delta = ca. 4$ ppm, dovuti agli idrogeni equatoriali e assiali, rispettivamente, dei ponti metilenici congiungenti le unità fenoliche.²⁸

5.3 Sintesi e caratterizzazione di *glycoclusters* supportati su nanoparticelle di TiO_2

Le nanoparticelle di biossido di titanio impiegate (tipo P25 della ditta Degussa) sono disponibili in commercio, sono formate da una miscela di due strutture cristalline, l'anatasio (90%) ed il rutilo (10%) ed hanno una granulometria media di circa 21 nm.

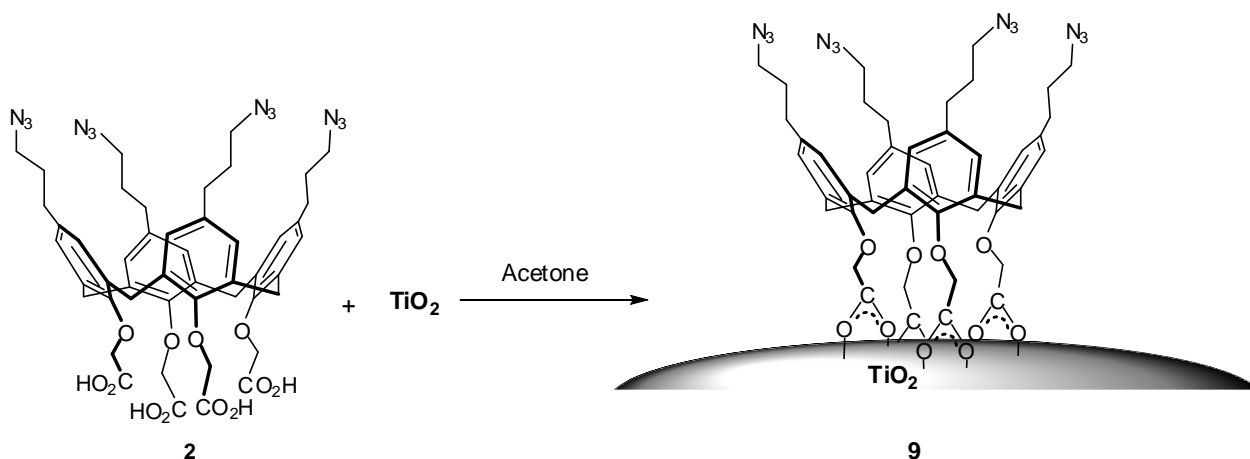
Durante il lavoro di tesi, è stata ottimizzata la tecnica di funzionalizzazione delle nanoparticelle, secondo la quale il biossido di titanio viene disperso in una soluzione dei derivati calix[4]arenici **1** e **2** negli opportuni solventi (Schema 5 e 6). La sospensione è stata mantenuta sotto agitazione, al riparo della luce, per 48 h. Le nanoparticelle così funzionalizzate sono state poi recuperate per centrifugazione e lavate abbondantemente con l'opportuno solvente per rimuovere l'eccesso di materiale organico non adsorbito.



Schema 5

Le nanoparticelle di TiO_2 , originariamente bianche, divengono arancio-giallo nel caso del prodotto **8**. Questo fenomeno è imputabile ad un trasferimento di carica tra il sistema aromatico del calixarene ed il TiO_2 , analogamente a quanto succede nel caso dei catecoli²¹ e, come recentemente dimostrato, dei calixareni.^{23c}

Questo cambiamento di colore non si nota, invece, nel caso del prodotto **9**, dove, presumibilmente, il trasferimento di carica sarebbe bloccato dalla presenza del braccio spaziatore acetato, che separa la parte aromatica dalla superficie del TiO_2 .



Schema 6

La quantità di calix[4]arene adsorbito sulle nanoparticelle è stata determinata mediante termogravimetria e spettroscopia all'infrarosso.

L'analisi termogravimetrica (TGA) è una tecnica comunemente utilizzata per la caratterizzazione dei materiali. Essa sfrutta la stimolazione termica per valutare la reattività chimica dei materiali

stessi; sperimentalmente questo avviene misurando la variazione in peso del campione all'aumentare della temperatura. Durante tali prove, il campione è stato dapprima sottoposto ad una pirolisi, attraverso un riscaldamento in atmosfera inerte, e poi ad un'ossidazione in aria. La somma delle perdite in peso, relative ai due processi, corrisponde alla quantità di materiale organico adsorbito su TiO₂.

I risultati ottenuti in TGA sono stati poi avvalorati mediante spettroscopia infrarossa. Come sottolineato in precedenza, i prodotti sintetizzati presentano dei gruppi azide, facilmente rivelabili grazie all'intensa banda a 2098cm⁻¹, dovuta allo stiramento fuori fase del gruppo azide, che cade in una regione dello spettro solitamente priva di altre bande. In particolare, è stata usata la spettroscopia infrarossa (in trasformata di Fourier) in riflettanza diffusa (DRIFT), una tecnica che è di solito applicata nelle regioni spettrali del medio e del vicino infrarosso. Questa possiede numerosi vantaggi, come: elevata sensibilità (100-200 ppm) e minima preparazione del campione.²⁹ In particolare questa tecnica sfrutta il fenomeno della riflessione delle radiazioni infrarosse, che possono essere riflesse in due modi: riflessione senza penetrazione nel campione, quindi con lo stesso angolo della radiazione incidente (riflettanza speculare), e riflessione con penetrazione parziale della radiazione all'interno del campione e successiva riflessione, sulle superfici delle particelle del campione, con conseguente riemersione della radiazione dal campione con angoli diversi da quelli di incidenza (riflettanza diffusa).

Utilizzando la teoria di Kubelka-Munk (KM, Eq. 1), si possono ottenere, in riflettanza diffusa, delle misure semiquantitative:³⁰

$$KM = \frac{1 - R_{\infty}^2}{2R_{\infty}} = \frac{K}{S} \quad \text{Eq. 1}$$

dove R_∞ è la riflettanza di un campione con spessore infinito, K è il coefficiente di assorbimento ed S è il coefficiente di diffusione della radiazione del campione. L'Eq. 2 mostra come l'intensità delle bande dello spettro DRIFT, in unità KM, siano direttamente proporzionali alla concentrazione del campione in polvere, diluito con KBr, e come la riflettanza misurata sia inversamente proporzionale al coefficiente di diffusione (e quindi alle dimensioni delle particelle).

Attraverso la retta di calibrazione, realizzata con i prodotti **1** e **2** opportunamente miscelati con aliquote di TiO₂ (Figura 5) e KBr, sono state determinate le percentuali (in peso) di prodotto organico contenete un gruppo azide presente nei campioni incogniti. I risultati ottenuti sono sostanzialmente in accordo con quelli ottenuti per via termogravimetrica.

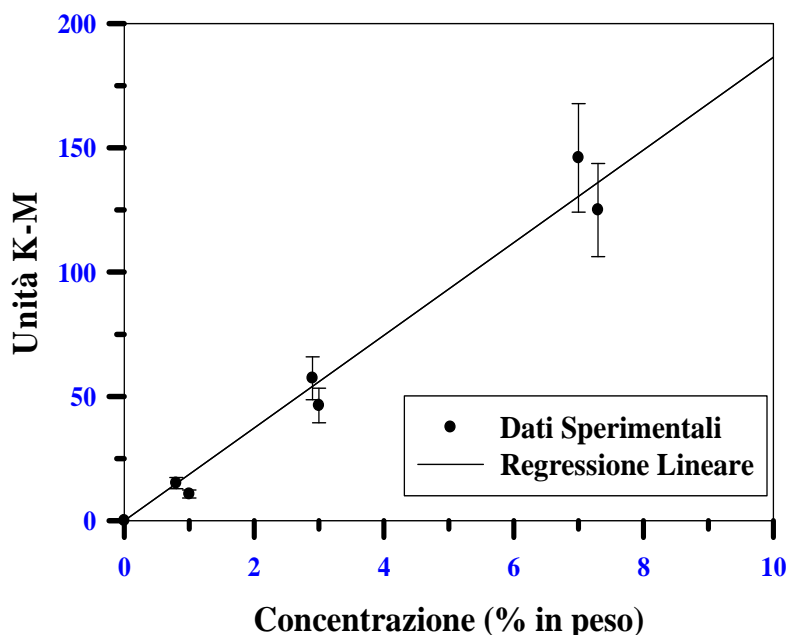


Figura 5 Retta di calibrazione ottenuta con DRIFT.

I valori ottenuti con le varie tecniche, per il complesso **8**, sono riportati in Tab.1; l'adsorbimento di **1** sulle nanoparticelle è stato eseguito, con la stessa procedura sperimentale, su TiO₂ come tale (a) e TiO₂ seccato sotto vuoto per eliminare le molecole d'acqua eventualmente presenti (b): in entrambi i casi la quantità di calix[4]arene **1** adsorbito è paragonabile e compresa fra il 4 ed il 5% in peso.

Tabella 1. Risultati ottenuti per il complesso **8**.

	Concentrazione (DRIFT) % in peso	Concentrazione (TGA) % in peso
(a)	5.6±0.1	5.2±0.4
(b)	3.2±0.4	4.2±0.1
(c)	2.3±0.6	3.5±0.1

Per rilevare un'eventuale modifica chimica del prodotto organico **1**, che potrebbe verificarsi durante il processo di adsorbimento, il materiale ibrido **8** è stato sottoposto ad un trattamento di deadsorbimento in ambiente basico utilizzando diisopropiletilamina (c). Il prodotto recuperato per centrifugazione³¹ è stato analizzato con ¹H-NMR. I risultati non hanno mostrato modifiche del prodotto di partenza **1**.

Con lo stesso procedimento è stato caratterizzato anche il materiale ibrido **9**, ottenendo valori di concentrazione di prodotto organico leggermente superiori rispetto a quelli trovati per **8** (5.9±0.6).

Come *partners* per la reazione di cicloadizione sono stati utilizzati gli propargil glicosidi **10** e **11**, aventi i gruppi idrossilici liberi (Figura 6).

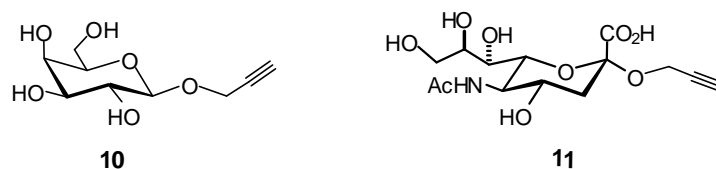
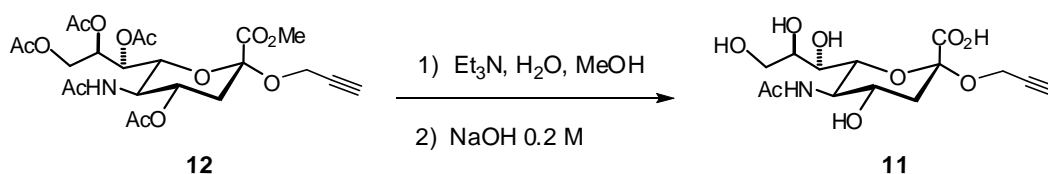


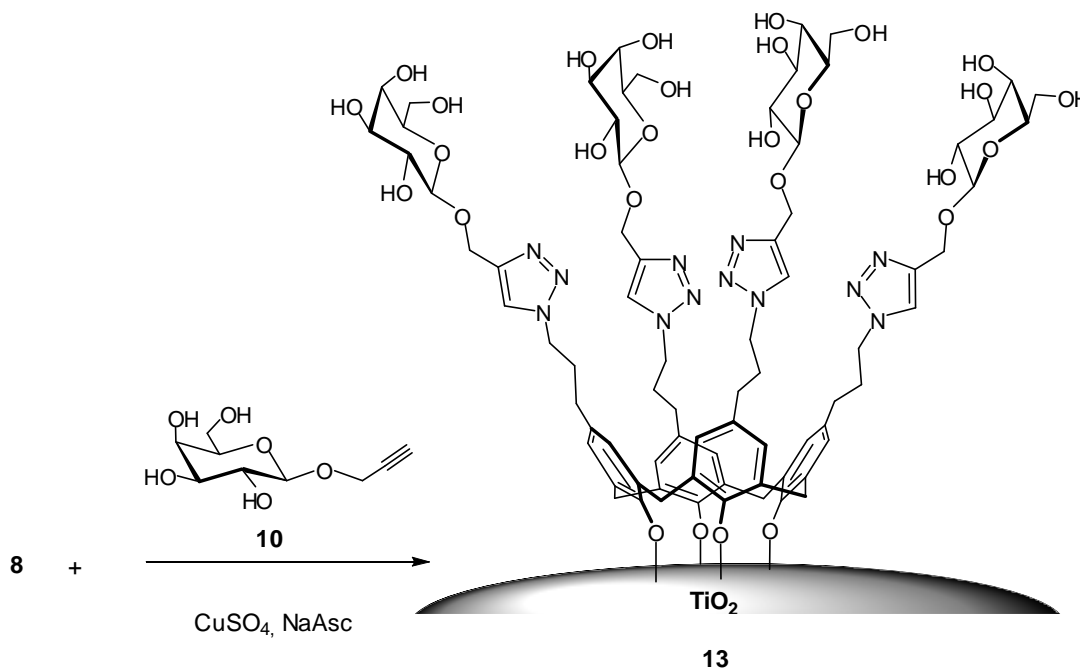
Figura 6 Propargil glicosidi impiegati nella CuAAC.

Il propargil galattosio **10** è una molecola già descritta in letteratura,³² ed è stata preparata seguendo la procedura riportata in bibliografia;^{32b} il propargil sialoside **11**, avente gli ossidrili deprotetti e la funzione carbossilica libera, è stato invece ottenuto per idrolisi basica a partire dal composto **12**, già noto in letteratura (Schema 7).³³



Schema 7

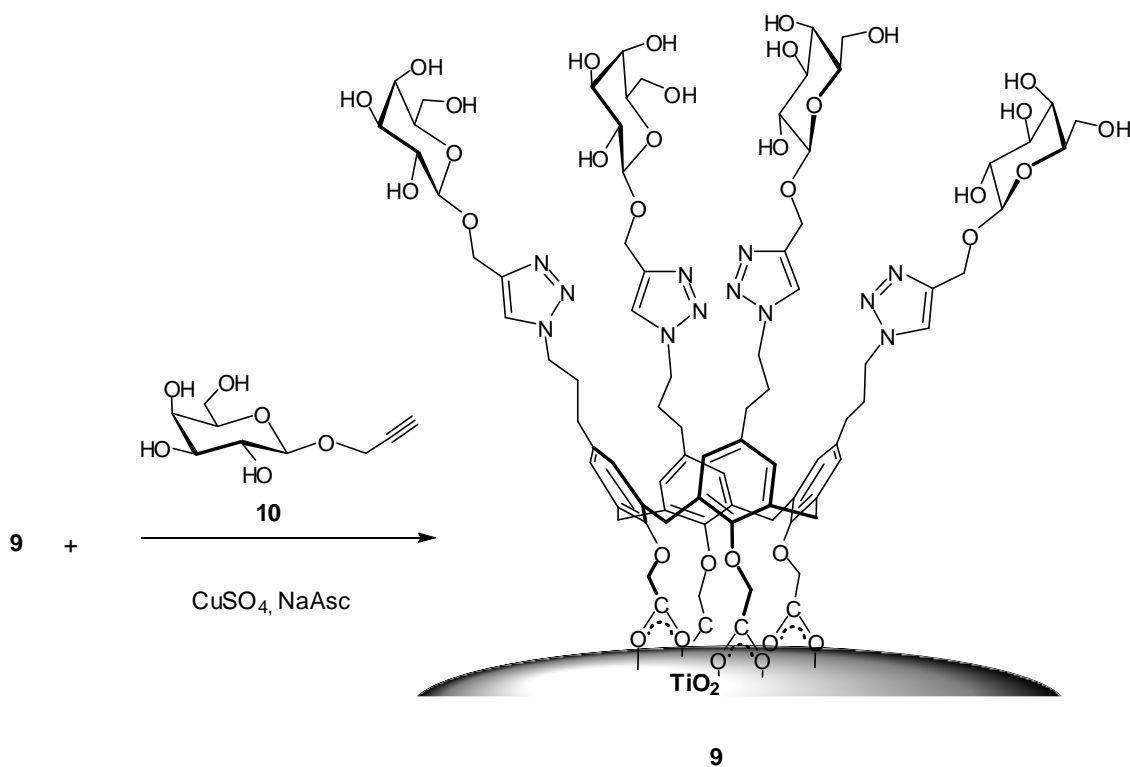
Le nanoparticelle funzionalizzate con i tetraazido calix[4]areni **8** e **9** sono state quindi sottoposte alla reazione di cicloaddizione catalizzata da ioni rame(I) con il propargil galattosio **10** (Schema 8 e 9).



Schema 8

La reazione è stata condotta con un eccesso di carboidrato (2 eq.), usando come catalizzatore il CuSO_4 , ridotto *in situ* dall'ascorbato di sodio.^{19c} I prodotti **13** e **14** sono stati isolati per centrifugazione, e lavati ripetutamente con una soluzione di $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ per rimuovere l'eccesso di materiale organico in soluzione, fra cui il carboidrato. Essendo ben nota²⁴ la capacità degli ioni

metallici di interagire con le superfici di biossido di titanio, le polveri sono state infine lavate con una soluzione di EDTA disodico 0.05 M per rimuovere il rame eventualmente adsorbito.



Schema 9

Gli spettri DRIFT dei composti **8** e **13** (Figura 7) mostrano la completa scomparsa della banda, relativa allo stiramento fuori fase dell'azide, già dopo 24 ore confermando l'elevata resa della reazione (Tabella 2).

Tabella 2. Risultati ottenuti per i complessi **13** e **14**.

	Concentrazione (DRIFT) % in peso	Concentrazione (TGA) % in peso
(a)	0.1±0.0	5.6±0.3
(b)	0.1±0.0	5.4±0.3
(c)	0.2±0.0	6.3±0.4
(d)	0.1±0.1	7.1±0.5

(a) Prodotto **13**, 24 h; (b) Prodotto **13**, 48 h; (c) Prodotto **13**, 72 h;

(d) Prodotto **14**, 24 h.

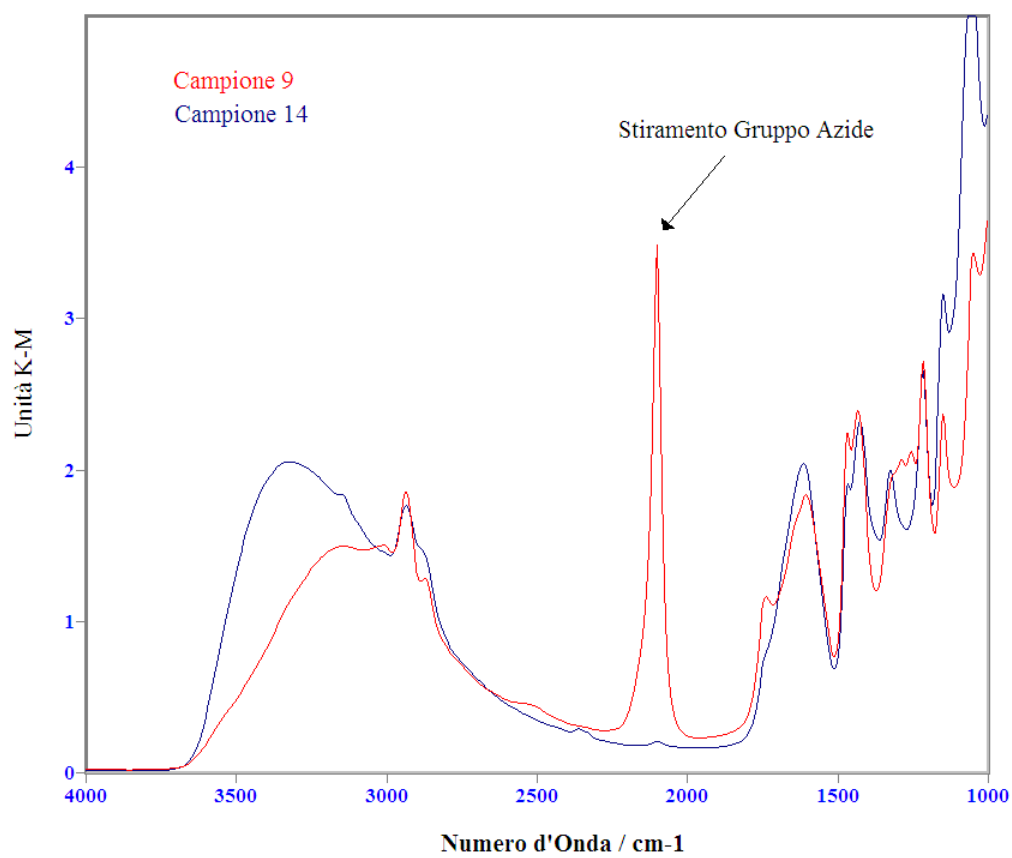
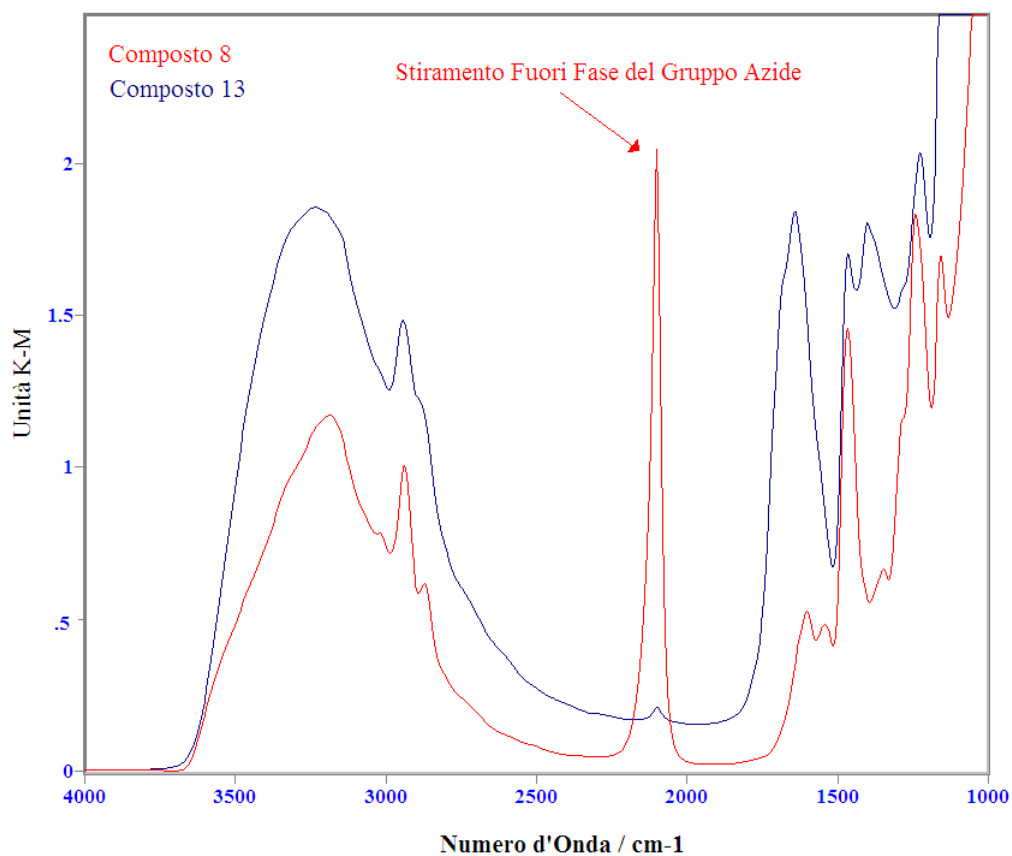


Figura 7 Spettri DRIFT dei composti **13** e **14**.

In Tabella 2 sono riportati anche i valori ottenuti dalle analisi termogravimetriche (Figura 8), dalle quali è possibile stimare una resa media del processo del 65%.

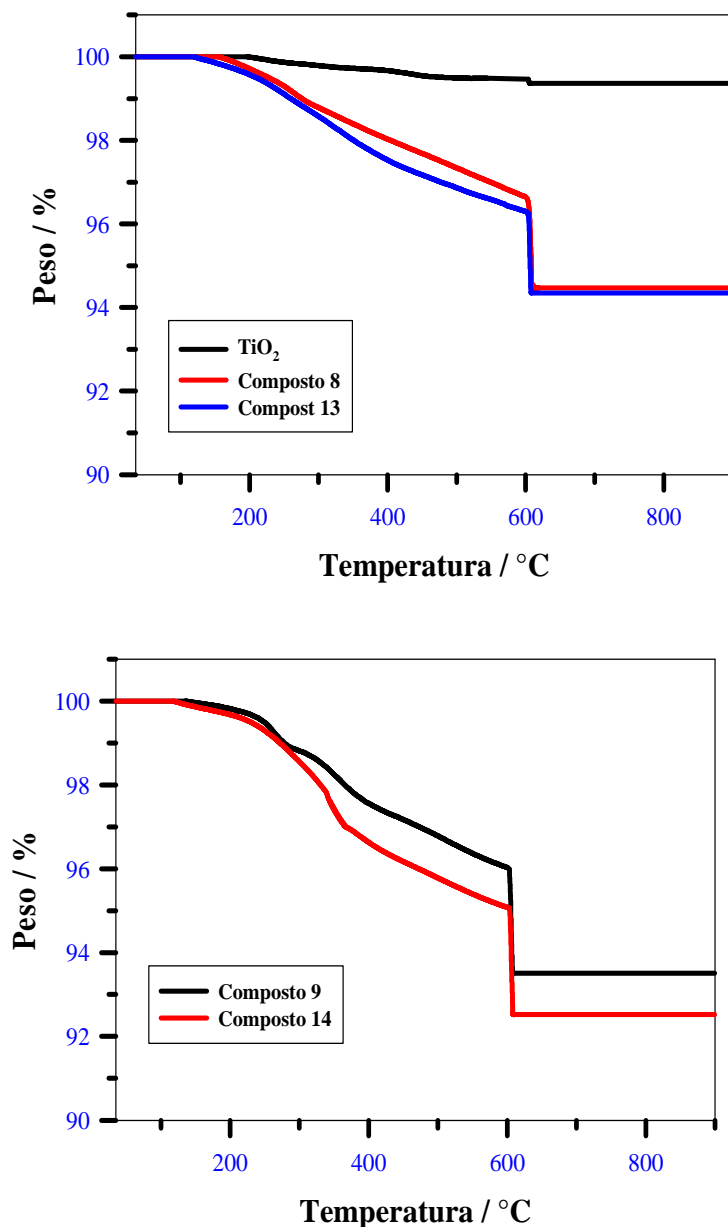
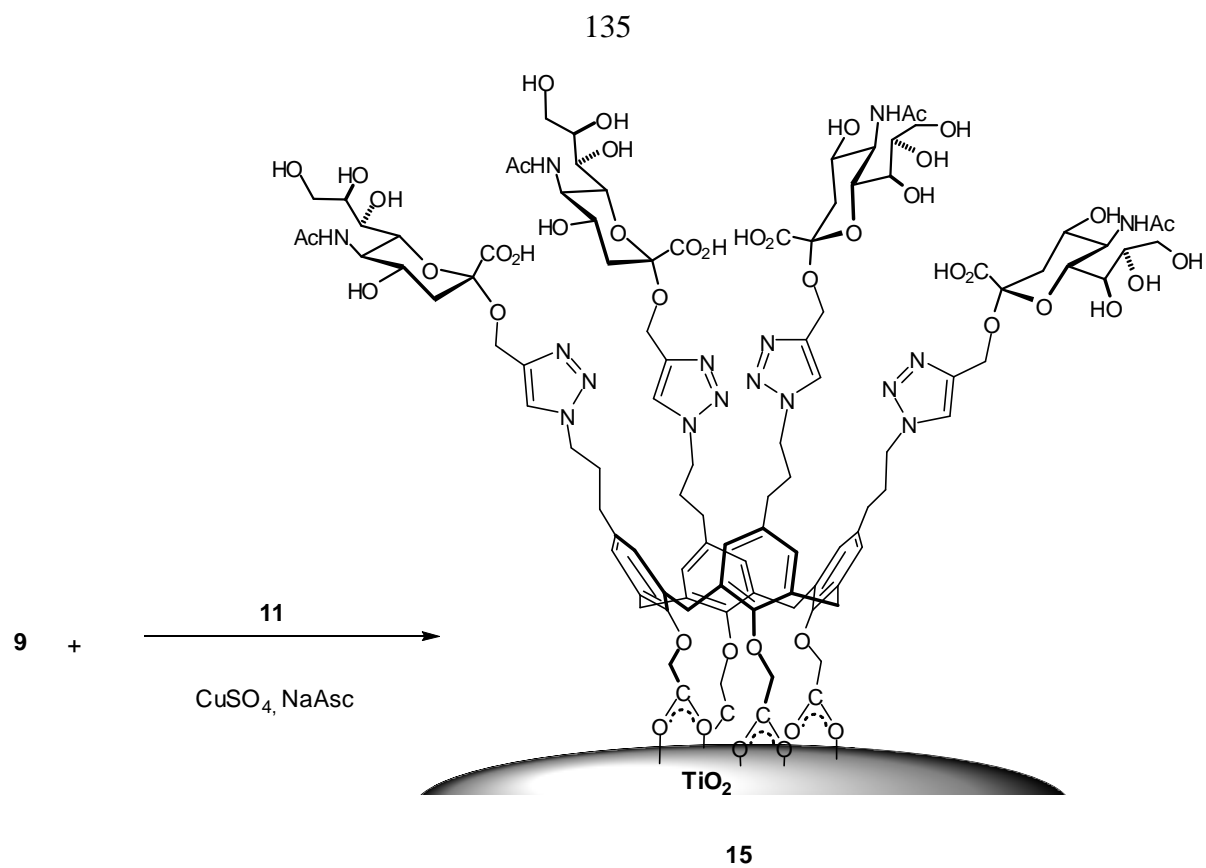


Figura 8 Analisi termogravimetrica dei prodotti **13** e **14**.

Essendo riusciti a sintetizzare nanoparticelle di TiO₂ ricoperte di *clusters* multivalenti di galattosio, si è deciso di applicare la stessa metodologia ad uno zucchero più complesso ed importante per il suo ruolo nei processi biologici:³⁵ l'acido sialico, o acetil neuraminico, utilizzando il derivato **11** (Schema 15). Le analisi termogravimetriche e spettroscopiche (DRIFT) hanno, in questo caso, dimostrato come la reazione non vada a completamento (resa 70% circa), ottenendo una resa finale del processo del 50% circa (Figura 9 e 10). La resa modesta della reazione potrebbe essere dovuta al gruppo carbossilico libero del composto **11**, che interagendo con la superficie delle nanoparticelle di TiO₂, potrebbe non essere più disponibile per la cicloaddizione.



Schema 15

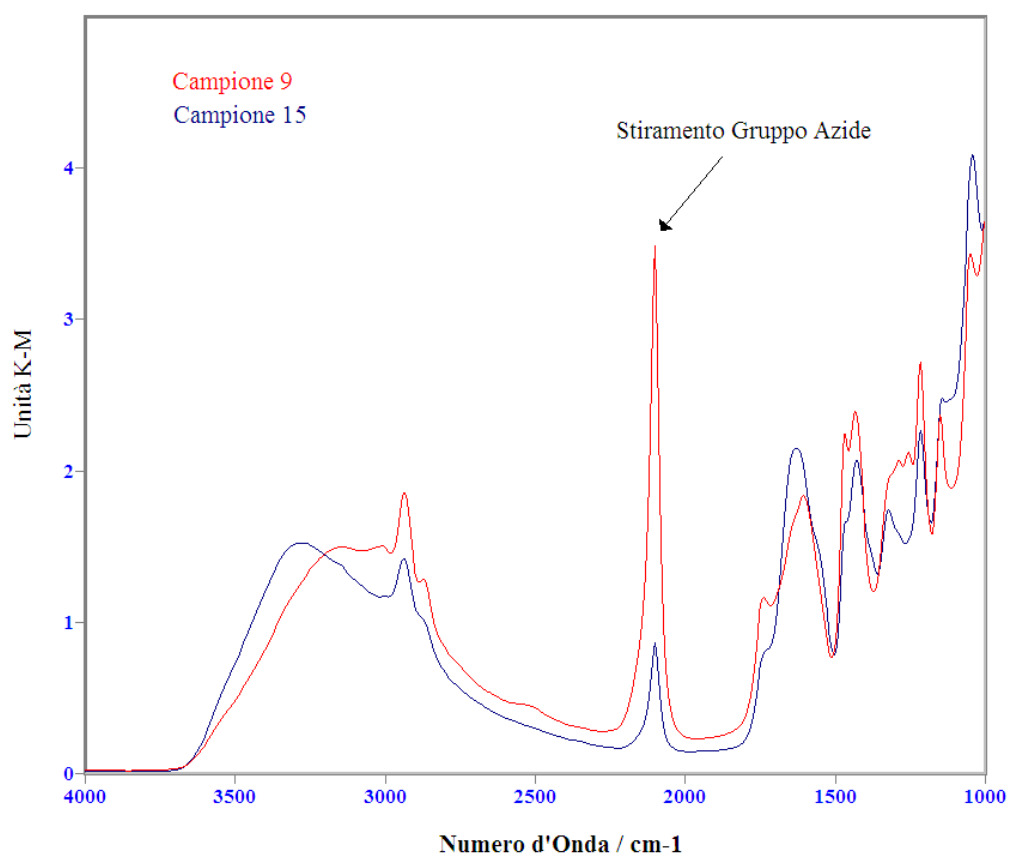


Figura 9: Spettri DRIFT e termogravimetogramma dei composti **9** e **15**.

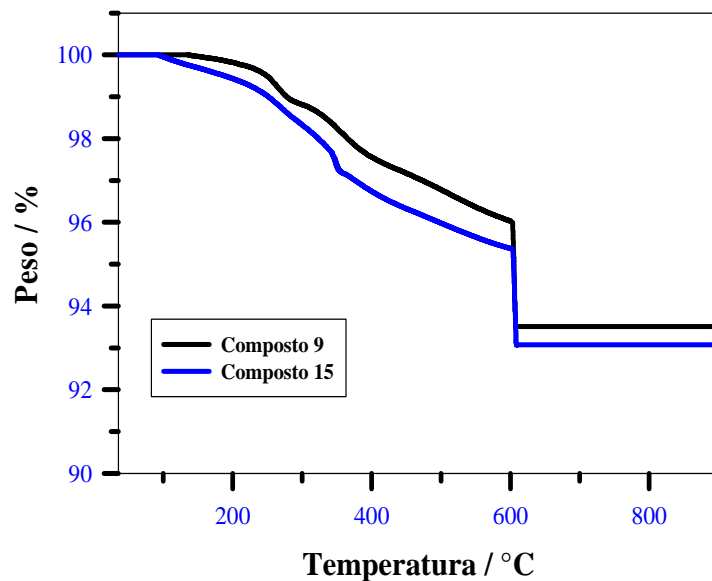


Figura 10 Analisi termogravimetrica del prodotto 15.

L'analisi delle polveri, attraverso microscopia elettronica a scansione (SEM), ha dimostrato come le nanoparticelle sintetizzate mantengano le loro dimensioni iniziali (nanometriche), sia durante il processo di adsorbimento dei derivati calixarenici, sia dopo la reazione di cicloadizione con gli *O*-propargilsialosidi (Figura 11 e 12). La formazione di aggregati sarebbe infatti un fenomeno indesiderato, poiché potrebbe limitarne le eventuali applicazioni in campo biologico.

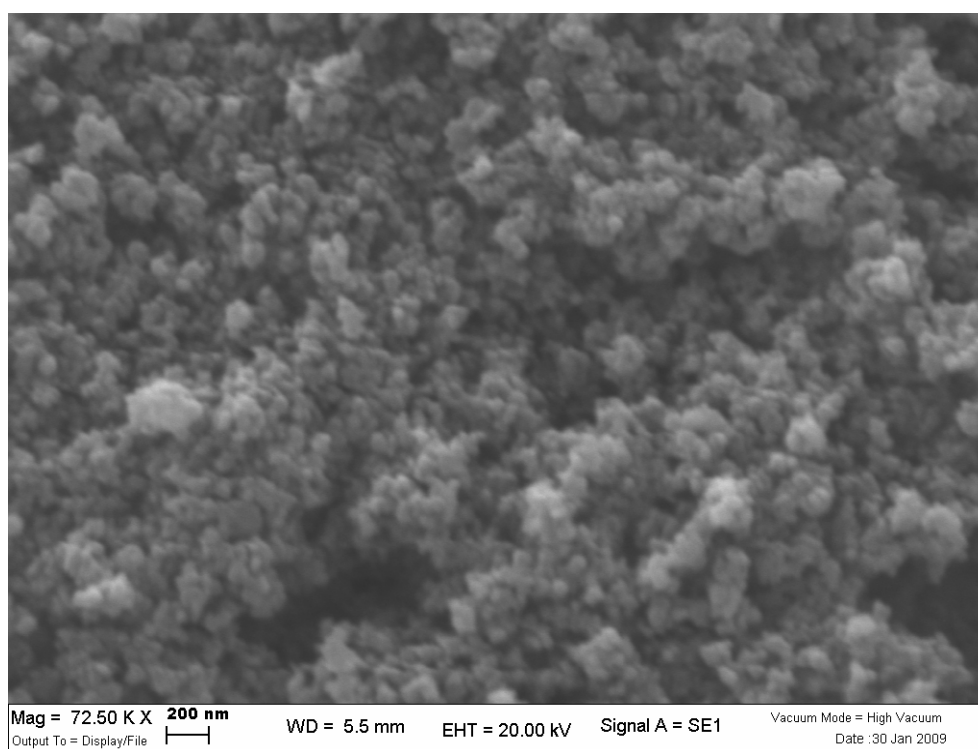


Figura 11 Immagine SEM di 9.

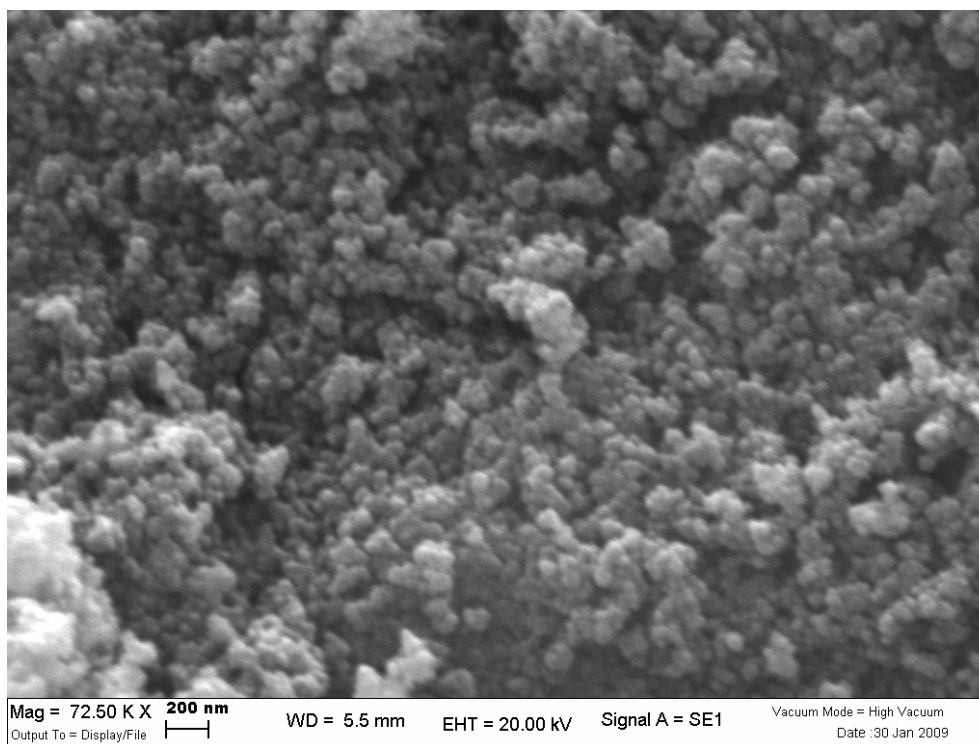


Figura 121 Immagine SEM di 14.

5.4 Conclusioni

Questo lavoro di ricerca ha avuto lo scopo di supportare *clusters* glicosidici multivalenti su nanoparticelle di biossido di titanio. Per questa ragione prima di tutto sono stati sintetizzati i derivati calixarenici **1** e **2**, che, grazie ai gruppi OH o COOH presenti rispettivamente al bordo inferiore dell'anello, sono stati adsorbiti sulla superficie delle nanoparticelle. I materiali ottenuti **8** e **9**, sono stati sottoposti alla reazione di cicloadizione rame(I) mediata CuAAC (*Copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition*) con propargil glicosidi per formare dei *clusters* direttamente sul supporto inerte. Le nanoparticelle così ottenute sono state caratterizzate per analisi termogravimetrica e spettroscopia infrarossa. Inoltre l'immagine al microscopio elettronico ha dimostrato come le particelle abbiano mantenuto le loro dimensioni originali (nanometriche).

Questa nuova metodologia ha permesso di ottenere per la prima volta gliconanoparticelle di biossido di titanio. Un ulteriore sviluppo di questo lavoro sarà quello di realizzare una classe di nanoparticelle variando opportunamente i carboidrati, e studiarne poi le proprietà di riconoscimento e legame con entità biologiche (lectine, virus, batteri).

5.5 Parte sperimentale

Tutte le reazioni in cui è richiesto un ambiente anidro sono state condotte in atmosfera di azoto utilizzando vetreria anidrificata in stufa a 110 °C. Tutti i solventi sono stati anidrificati seguendo metodi noti.³⁶ Le purificazioni dei prodotti mediante cromatografia su colonna (*flash chromatography*)³⁷ sono state effettuate utilizzando gel di silice 60 (40-63 μm). Le cromatografie su strato sottile sono state eseguite su fogli di alluminio al gel di silice 60 F₂₅₄ usando come

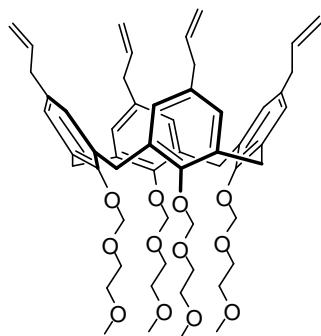
rivelatore una soluzione al 10% di H_2SO_4 in etanolo. I punti di fusione sono stati rilevati in capillare con uno strumento Buchi SMP 20. I poteri ottici rotatori sono stati misurati a 20 ± 2 °C utilizzando un polarimetro Perkin Elmer 241. Gli spettri ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) NMR sono stati registrati per soluzioni in CDCl_3 se non specificato diversamente. Gli spettri di massa MALDI-TOF sono stati registrati usando l'acido 2,5-diidrossi-benzoico come matrice. Gli spettri di massa ESI sono stati registrati usando una soluzione del prodotto in $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ in presenza di formiato di ammonio 5 mM.

Il biossido di titanio Degussa P25 è stato utilizzato senza ulteriori purificazioni. La dimensione media delle particelle è di circa 21 nm, e l'area superficiale specifica (BET) è di circa $50 \text{ m}^2/\text{g}$.

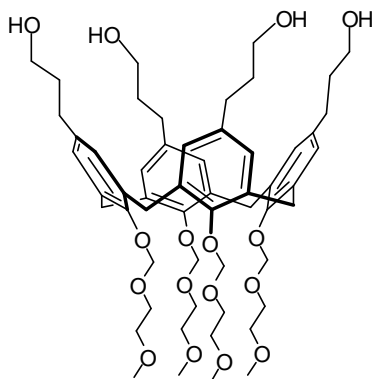
Le prove termogravimetriche sono state svolte con una termobilancia TGA/SDTA 851 della ditta Mettler Toledo. Lo strumento è stato precedentemente calibrato con standard di In e Zn puri. I campioni, di 10 mg circa, sono stati introdotti in crogioli di allumina da 70 μl e successivamente collocati all'interno della termobilancia. Gli esperimenti sono stati condotti in atmosfera inerte, mantenuta con un flusso di N_2 di 70 ml min^{-1} , da 35 a 600°C ed in flusso d'aria secca, di 70 ml min^{-1} , da 600 a 900 °C. I campioni sono stati sottoposti ad un riscaldamento a velocità variabile tra 1 e $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, in base alla velocità di perdita di peso del campione. La velocità di riscaldamento è stata di 1°C min^{-1} , quando la perdita di peso era superiore a $2 \mu\text{g s}^{-1}$, e di $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, quando la perdita in peso era inferiore a $1 \mu\text{g s}^{-1}$ (la velocità, per perdite di peso intermedie tra 1 e $2 \mu\text{g s}^{-1}$, variava tra 1 e $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$).

Le prove spettroscopiche all'infrarosso sono state eseguite con uno spettrometro IFS88 della ditta Bruker. Lo spettrometro è stato dotato di sorgente di SiC, separatore di raggio in KBr, interferometro di Michelson e di un rivelatore di tipo MCT. Le prove sono state condotte in riflettanza diffusa (DRIFT), nell'intervallo spettrale da 400 a 4000 cm^{-1} con una risoluzione di 16 cm^{-1} . I campioni sono stati preventivamente diluiti in KBr (Sigma-Aldrich di grado spettroscopico), mentre l'atmosfera interna dello strumento è stata mantenuta anidra da un flusso costante di aria secca. Le prove sono state condotte a temperatura ambiente.

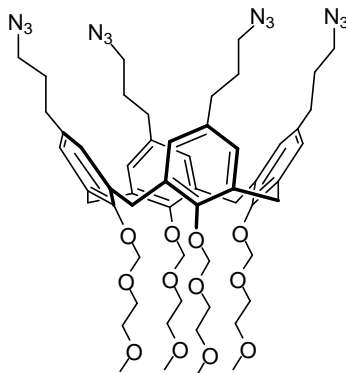
Le immagini al microscopio elettronico a scansione (SEM) sono state catturate con un microscopio EVO40 della ditta Zeiss. I campioni, prima delle misure, sono stati dorati (sottovuoto), per impedire un loro caricamento e riscaldamento.

5,11,17,23-Tetra-allil-25,26,27,28-tetrametossietossimetossi-calix[4]arene (4).

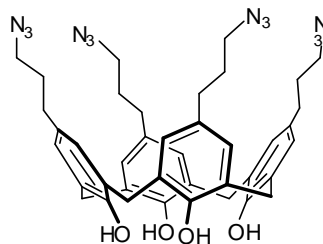
Ad una soluzione del tetraallilcalixarene **3** (1.00 g, 1.70 mmol) raffreddata a 0 °C in DMF (20 mL) sono aggiunti NaH (0.27 g, 6.80 mmol, di una dispersione al 60% in olio) e metossietossimetilcloruro (0.77 mL, 6.80 mmol). La miscela è tenuta sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per 1 h, quindi raffreddata (0 °C). Sono aggiunti nuovamente NaH (0.27 g, 6.80 mmol, di una dispersione al 60% in olio) e metossietossimetilcloruro (0.77 mL, 6.80 mmol), e la miscela è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 h aggiuntiva, quindi diluita con H₂O (1 mL), dopo 30 min, con tampone fosfato 1M a pH 7 (80 mL) ed estratta con Et₂O (2 x 100 mL). Le fasi organiche riunite sono anidrificate con Na₂SO₄ e concentrate. Il residuo ottenuto è cromatografato su colonna di gel di silice con 1:3 cicloesano-AcOEt per dare **4** (1.53 g, 96%) come olio giallo; ¹H-NMR: δ 6.50 (s, 8 H, Ar), 5.81 (ddt, 4 H, *J* = 6.5, 10.0, 16.8 Hz, 4 CH₂CH=CH₂), 5.17 (s, 8H, 4 OCH₂OCH₂CH₂OCH₃), 4.98 (ddt, 4 H, *J* = 1.2, 2.0, 10.2 Hz, H_{cis} di CH₂CH=CH₂), 4.90 (ddt, 4 H, *J* = 1.5 Hz, H_{trans} di CH₂CH=CH₂), 4.40 e 3.14 (2 d, 8 H, *J* = 13.2 Hz, 4 ArCH₂Ar), 3.98-3.94 (m, 8 H, 4 OCH₂OCH₂CH₂OCH₃), 3.60-3.55 (m, 8 H, 4 OCH₂OCH₂CH₂OCH₃), 3.40 (s, 12 H, 4 OCH₂OCH₂CH₂OCH₃), 3.08 (ddd, 8 H, 4 CH₂CH=CH₂); ¹³C NMR: δ 152.5 (C), 138.1 (CH), 134.5 (C), 133.9 (C), 128.5 (CH), 114.9 (CH₂), 99.2 (CH₂), 72.1 (CH₂), 69.6 (CH₂), 59.0 (CH₃), 39.3 (CH₂), 31.5 (CH₂); MALDI-TOF MS (937.16): 960.0 (M + Na), 975.9 (M + K).

5,11,17,23-Tetra-(3-idrossipropil)-25,26,27,28-tetrametossietossimetossi-calix[4]arene (5).

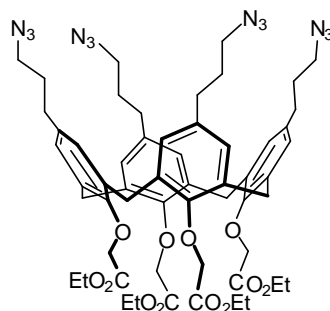
Ad una soluzione di **4** (1.53 g, 1.63 mmol) in THF anidro (10 mL) raffreddata a 0 °C è aggiunto goccia a goccia 9-boraciclo[3.3.1]nonano (52 mL, 26.0 mmol, di una soluzione 0,5 M in THF). La soluzione viene portata a temperatura ambiente in 1 h, quindi è raffreddata a 0 °C e lentamente diluita con NaOH 10 M (2.0 mL) e 30% H₂O₂ (6.0 mL). La miscela è tenuta sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per 30 min e poi scaldata a 60 °C, tenuta sotto agitazione per altre 2 h, poi raffreddata a temperatura ambiente. Si diluisce con tampone fosfato 1 M a pH 7, si concentra per rimuovere il solvente organico e si estrae con AcOEt (2 x 100 mL). Le fasi organiche riunite sono anidrificate con Na₂SO₄ e concentrate. Il residuo ottenuto è cromatografato su una corta colonna di gel di silice (5 cm) con AcOEt, 1:1 AcOEt-acetone, acetone ed infine 9:1 acetone-metanolo in presenza di Et₃N 0.3%, per dare **4** (1.25 g, 76%) come olio incolore; ¹H-NMR: δ 6.56 (s, 8 H, Ar), 5.18 (s, 8H, 4 OCH₂OCH₂CH₂OCH₃), 4.40 e 3.13 (2 d, 8 H, *J* = 13.0 Hz, 4 ArCH₂Ar), 3.98-3.94 (m, 8 H, 4 OCH₂OCH₂CH₂OCH₃), 3.61-3.56 (m, 8 H, 4 OCH₂OCH₂CH₂OCH₃), 3.53 (t, 8 H, *J* = 6.5 Hz, 4 CH₂CH₂CH₂OH), 3.40 (s, 12 H, 4 OCH₂OCH₂CH₂OCH₃), 3.34 (s, 4 H, 4 OH), 2.38 (t, 8 H, *J* = 7.0 Hz, 4 CH₂CH₂CH₂OH), 1.70 (tt, 8 H, 4 CH₂CH₂CH₂OH); ¹³C NMR: δ 152.1 (C), 135.8 (C), 134.4 (C), 128.1 (CH), 99.3 (CH₂), 72.1 (CH₂), 69.6 (CH₂), 62.1 (CH₂), 59.0 (CH₃), 33.9 (CH₂), 31.4 (CH₂), 31.2 (CH₂); MALDI-TOF MS (1009.22): 1032.1 (M + Na).

5,11,17,23-Tetrakis(3-azidopropil)-25,26,27,28-tetrametossietossimetossi -calix[4]arene (6).

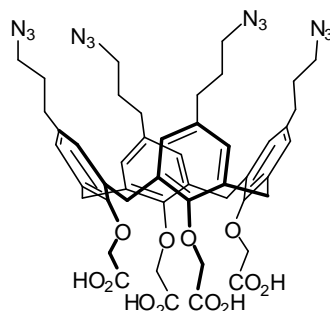
Una miscela di calixarene tetrolo **5** (1.25 g, 1.24 mmol), sodio azide (0.65 g, 9.98 mmol), difenil fosforil azide (1.60 mL, 7.44 mmol), 1,8-diazabicyclo[5.4.0.]undec-7-ene (0.74 mL, 4.96 mmol) e DMF anidra (10 mL) è agitata a 120 °C per 14 h, poi raffreddata a temperatura ambiente. Si diluisce con Et₂O (150 mL), si lava con H₂O (30 mL), si anidrifca con Na₂SO₄, e si concentra. Il residuo ottenuto è purificato tramite cromatografia su colonna di gel di silice con 1:2 cicloesano-AcOEt (con 0.3% di Et₃N) per dare **6** (1.05 g, 76%) come sciroppo; ¹H-NMR: δ 6.49 (s, 8 H, Ar), 5.18 (s, 8H, 4 OCH₂OCH₂CH₂OCH₃), 4.41 e 3.14 (2 d, 8 H, *J* = 13.0 Hz, 4 ArCH₂Ar), 3.98-3.94 (m, 8 H, 4 OCH₂OCH₂CH₂OCH₃), 3.60-3.56 (m, 8 H, 4 OCH₂OCH₂CH₂OCH₃), 3.41 (s, 12 H, 4 OCH₂OCH₂CH₂OCH₃), 3.18 (t, 8 H, *J* = 6.7 Hz, 4 CH₂CH₂CH₂N₃), 2.40 (t, 8 H, *J* = 7.5 Hz, 4 CH₂CH₂CH₂N₃), 1.72 (tt, 8 H, 4 CH₂CH₂CH₂N₃); ¹³C NMR: δ 152.5 (C), 134.9 (C), 134.5 (C), 128.2 (CH), 99.3 (CH₂), 72.1 (CH₂), 69.6 (CH₂), 62.1 (CH₂), 59.1 (CH₃), 50.5 (CH₂), 31.9 (CH₂), 31.5 (CH₂), 30.5 (CH₂); ESI MS (1109.28): 1012.2 (M + NH₄⁺), 1132.5 (M + Na).

5,11,17,23-Tetrakis(3-azidopropil)-25,26,27,28-tetraidrossi-calix[4]arene (1).

Ad una soluzione di **6** (1.05 g, 0.94 mmol) in acido acetico (16 mL) riscaldata a 100 °C è aggiunta H₂O (4 mL). La miscela è tenuta sotto agitazione magnetica per 1 h, poi raffreddata a temperatura ambiente e concentrata. Il residuo ottenuto è triturato con Et₂O (2 x 5 mL), per dare **1** (0.63 g, 88%) come solido bianco; ¹H-NMR: δ 10.21 (s, 4 H, 4 OH), 6.89 (s, 8 H, Ar), 4.25 e 3.48 (2 bd, 8 H, *J* = 13.0 Hz, 4 ArCH₂Ar), 3.26 (t, 8 H, *J* = 6.8 Hz, 4 CH₂CH₂CH₂N₃), 2.53 (t, 8 H, *J* = 7.5 Hz, 4 CH₂CH₂CH₂N₃), 2.03 (tt, 8 H, 4 CH₂CH₂CH₂N₃); ¹³C NMR: δ 147.1 (C), 134.4 (C), 128.9 (CH), 128.2 (C), 50.5 (CH₂), 31.8 (CH₂), 30.4 (CH₂); ESI MS (756.86): 379.9 (M+2)/2).

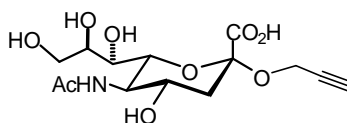
5,11,17,23-Tetrakis(3-azidopropil)-25,26,27,28-tetraetilacetossi-calix[4]arene (7).

Ad una sospensione di tetraazidocalix[4]arene **1** (300 mg, 0.39 mmol) e carbonato di potassio anidro (330 mg, 2.37 mmol) in acetonitrile anidro (10 mL) viene aggiunto bromoacetato di etile (0.35 mL, 3.12 mmol) e la miscela è tenuta sotto agitazione magnetica ad 80 °C per la notte. La miscela è diluita con tampone fosfato 1 M a pH 7 (50 mL) ed estratta con AcOEt (2 x 100 mL). Le fasi organiche riunite sono anidrificate con Na₂SO₄ e concentrate. Il residuo ottenuto è cromatografato su colonna di gel di silice con 4:1 cicloesano-AcOEt per dare **2** (390 mg, 89%) come olio incolore; ¹H-NMR: δ 6.50 (s, 8 H, Ar), 4.85 e 3.16 (2 d, 8 H, *J* = 13.2 Hz, 4 ArCH₂Ar), 4.75 (s, 8 H, 4 CH₂COOEt), 4.22 (q, 8 H, *J* = 7.0 Hz, 4 CH₂COOCH₂CH₃), 3.18 (t, 8 H, *J* = 6.5 Hz, 4 CH₂CH₂CH₂N₃), 2.40 (t, 8 H, *J* = 7.5 Hz, 4 CH₂CH₂CH₂N₃), 1.72 (tt, 8 H, 4 CH₂CH₂CH₂N₃), 1.30 (t, 12 H, 4 CH₂COOCH₂CH₃); ¹³C NMR: δ 170.2 (C), 154.1 (C), 134.8 (C), 134.3 (C), 128.4 (CH), 71.3 (CH₂), 60.4 (CH₂), 50.5 (CH₂), 31.9 (CH₂), 31.4 (CH₂), 30.5 (CH₂), 14.21 (CH₃); ESI MS (1101.21): 1019.5 (M + NH₄⁺), 1124.5 (M + Na).

5,11,17,23-Tetrakis(3-azidopropil)-25,26,27,28-tetraacetossi-calix[4]arene (2).

Ad una soluzione di **7** (390 mg, 0.35 mmol) in THF anidro (10 mL) si aggiunge una soluzione 2 M di NaOH in H₂O (1.5 mL). La miscela viene lasciata a temperatura ambiente per 18 h in atmosfera d'azoto, poi acidificata con una soluzione 1 M di HCl in H₂O (15 mL), concentrata per rimuovere il solvente organico, ed estratta con AcOEt (2 x 80 mL). Le fasi organiche riunite sono anidrificate con Na₂SO₄ e concentrate. Il residuo ottenuto è triturato con MeOH, per dare **2** (300 mg, 86%) come solido bianco; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 160 °C): δ 6.69 (s, 8 H, Ar), 4.72 e 3.22 (2 d, 8 H, *J* = 13.0 Hz, 4 ArCH₂Ar), 4.60 (s, 8 H, 4 CH₂COOH), 3.20 (t, 8 H, *J* = 6.5 Hz, 4 CH₂CH₂CH₂N₃), 2.42 (t, 8 H, *J* = 7.5 Hz, 4 CH₂CH₂CH₂N₃), 1.72 (tt, 8 H, 4 CH₂CH₂CH₂N₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, selected data): δ 170.9 (C), 153.2 (C), 135.0 (C), 134.3 (C), 128.7 (CH), 71.7 (CH₂), 50.2 (CH₂), 31.5 (CH₂), 30.8 (CH₂), 29.8 (CH₂); ESI MS (989.00): 1012.2 (M+Na).

Acido 5-acetamido-3,5-dideossi-2-(*O*-prop-2-inil)- α -D-glicero-D-galatto-2-nonulopiranosilico (11).



Una soluzione di **12** (200 mg, 0.37 mmol) in una miscela 1:1:5 di Et₃N / H₂O / MeOH (3 mL) viene lasciata a temperatura ambiente per 24 h, poi concentrata. Una soluzione dell'estere metilico (150 mg) in una soluzione acquosa 0,2 M di NaOH (2 mL) viene lasciata a temperatura ambiente per 18 h in atmosfera d' azoto, poi neutralizzata con la resina Amberlite IR-120 (forma H⁺, attivata e lavata con H₂O e MeOH momento dell'uso), e filtrata mediante un filtro di vetro sinterizzato. La resina viene lavata con MeOH e H₂O e la soluzione concentrata. Il residuo si cromatografa su una corta colonna di silice C18 preimpaccata (1 x 3 cm) eluendo con H₂O, per ottenere **11** (115 mg, 90%) come sciroppo incolore; $[\alpha]_D = -4.5$ (*c* 0.9, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) dati selezionati: 4.42 e 4.22 (2dd, 2H, *J* = 15.0, *J* = 2.5 Hz, OCH₂), 3.88-3.80 (m, 2H, H-7, H-8), 3.52 (ddd, 1H, *J*_{3ax,4} = 11.2, *J*_{3eq,4} = 4.8 Hz, H-4), 2.64 (dd, 1H, *J*_{3ax,3eq} = 12.8 Hz, H-3eq), 1.88 (s, 3H, Ac), 1.68 (dd, 1H, H-3ax). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 175.3 (C), 171.9 (C), 80.3 (CH), 75.4 (C), 74.9 (CH), 72.7 (CH), 70.1 (CH), 68.8 (CH), 64.5 (CH₂), 53.8 (CH), 53.0 (CH₂), 41.7 (CH₂), 22.6 (CH₃); ESI MS (347.32): 348.1 (M+H), 370.1 (M+Na).

5.6 Bibliografia

1. Penn S. G.; He L.; Natan M. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, 7, 609.
2. a) de la Fuente J. M.; Penadès S. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1760, 636 b) Niemeyer C. M. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, 40, 4128.
3. a) Daniel M. C.; Astruc D. *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 293 b) Brust M.; Kiely C. J. *Colloids Surf.*, **2002**, A 202, 175.
4. Link S.; El-Sayed M. A. *Int. Rev. Phys. Chem.*, **2000**, 19, 409.
5. a) Ozkan M. *Drug Discovery Today*, **2004**, 9, 1065 b) Tan W. B.; Zhang Y. *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **2005**, 75A, 56.
6. a) Hilger I.; Andra W.; Bähring R.; Daum A.; Hergt R.; Kaiser W. A. *Invest. Radiol.*, **1997**, 32, 705 b) Andra W.; d'Ambly C. G.; Hergt R.; Hilger I.; Kaiser W. A. *J. Magn. Magn. Mater.*, **1999**, 194, 197 c) Hilger I.; Hergt R.; Kaiser W. A. *Invest. Radiol.*, **2000**, 35, 170.
7. de la Fuente J. M.; Penadès S. *Glycoconj.*, **2004**, 21, 149.
8. Frey A.; Giannasca K. T.; Weltzin R.; Giannasca P. J.; Reggio H.; Lencer W. I.; Neutra M. R. *J. Exp. Med.*, **1996**, 184, 1045.
9. Rojo J.; Diaz V.; de la Fuente J. M.; Segura I.; Barrientos A. G.; Riese H. H.; Bernade A.; Penadès S. *Chembiochem*, **2004**, 5, 291.
10. Brust M.; Walker M.; Bethell D.; Schiffrin D. J.; Whyman R. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1994**, 801.
11. a) Lin C. C.; Yeh Y. C.; Yang C. Y.; Chen G.F.; Chen Y. C.; Wu Y. C.; Chen C. C. *Chem. Commun.*, **2003**, 2920 b) Nolting B.; Yu J. J.; Liu G. Y.; Cho S. J.; Kauzlarich S.; Gervay-Hague J. *Langmuir*, **2003**, 6465.
12. a) Barrientos A. G.; de la Fuente J. M.; Rojas T. C.; Fernandèz A.; Penadès S. *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 1909 b) de la Fuente J. M.; Barrientos A. G.; Rojas T. C.; Rojo J.; Canada J.; Fernandèz A.; Penadès S. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, 40, 2257 c) de Paz J. L.; Ojeda R.; Barrientos A. G.; Penadès S. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 149 d) Svarovsky S. A.; Szekely Z.; Barchi J. J. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 587 e) de Souza A. C.; Halkens K. M.; Meeldijk J. D.; Verkleij A. J.; Vliegthart J. F. G.; Kamerling J. P. *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 4323 f) Halkens K. M.; de Souza A. C.; Maljaars C. E. P.; Gerwig G. J.; Kamerling J. P. *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 3650.
13. Chen Y.; Ji T.; Rosenzweig Z. *Nano Lett.*, **2003**, 3, 581.
14. de la Fuente J. M.; Penadès S. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 387.
15. a) Penadès S.; Martin-Lomas M.; de la Fuente J. D.; Caneva E.; Delveno E.; Russo G.; Prospero D. *Chem. Comm.*, **2008**, 621.

16. Hore S.; Palomares E.; Smit H.; Bakker N. J.; Comte P.; Liska P.; Thampi K. R.; Karoon J. M.; Hinsh A.; Durrant J. R. *J. Mater. Chem.*, **2005**, *15*, 412.
17. Hagfeldt A.; Gratzel M. *Acc. Chem. Res.*, **2000**, *33*, 269.
18. Vedere riferimenti contenuti in: J. M. Pettibone, D. M. Cwiertny, M. Scherer and V. H. Grassian, *Lamgmuir*, 2008, **24**, 6659.
19. a) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057 b) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
20. Araujo P. Z.; Morando P. J.; Blesa M. A. *Lamgmuir*, **2005**, *21*, 3470.
21. Rajh T.; Chen L. X.; Lukas K.; Liu T.; Thurnauer M. C.; Tiede D. M. *J. Phys. Chem. B*, **2002**, *106*, 10543.
22. a) Wieser C.; Dieleman C. B.; Matt D. *Coord. Chem. Rev.*, **1997**, *165*, 93 b) Floriani C.; Floriani-Moro R. *Adv. Organomet. Chem.*, **2001**, *47*, 167.
23. a) Takeshita M.; Shinkai S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1995**, *68*, 1088 b) Danil de Namor A. F.; Clevery R. M.; Zapata-Ormachea M. L. *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 2495 c) Notestein J. M.; Iglesia E.; Katz A. *Chem. Mater.*, **2007**, *19*, 4998.
24. a) Diebold U. *Surface Science Reports.*, **2003**, *48*, 53.
25. a) Onishi H.; Iwasawa Y. *Chem. Phys. Lett.*, **1994**, *226*, 111 b) Chambers S. A.; Henderson M. A.; Kim Y. J.; Thevuthasan S. *Surf. Rev. Lett.*, **1998**, *5*, 381 c) Chambers S. A.; Thevuthasan S.; Kim Y. J.; Herman G. S.; Wang Z.; Tober E.; Ynzunza R.; Morais J.; Peden C. H. F.; Ferris K.; Fadley C. S. *Chem. Phys. Lett.*, **1997**, *267*, 51 d) Gutierrez-Sosa A.; Martinez-Escolano P.; Raza H.; Lindsay R.; Wincott P. L.; Thorthon G. *Surf. Sci.*, **2001**, *471*, 163 e) Henderson M. A. *J. Phys. Chem. B*, **1997**, *101*, 221 f) Hayden B. E.; King A.; Newton M. A. *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103*, 203 g) Rotzinger F. P.; Kesselman-Truttman J. M.; Hug S. J.; Shoklover V.; Gratzel M. *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 5004.
26. a) Rotzinger F. P.; Kesselman-Truttman J. M.; Hug S. J.; Shoklover V.; Gratzel M. *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 5004 b) Ahdjoudj J.; Minot C. *Catal. Lett.*, **1997**, *46*, 83 c) Bates S. P.; Kresse G.; Gillian M. J. *Surf. Sci.*, **1998**, *409*, 336 d) Kackell P.; Terakura K. *Appl. Surf. Sci.*, **2000**, *166*, 370 e) Kackell P.; Terakura K. *Surf. Sci.*, **2000**, *461*, 191.
27. Gutsche, C. D.; Levine J. A.; Sujeeth P. K. *J. Org. Chem. B*, **1985**, *50*, 5802.
28. Gutsche, C. D. *Calixarenes, Monograph in Supramolecular Chemistry, Vol. 1*; (Ed.: J. F. Stoddart), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1989.
29. a) Harrick N. J. *International Reflection Spectroscopy*, Harrick Scientific Co., New York, 1975 b) Mirabella F. M.; Harrick N. J. *International Reflection Spectroscopy, Review and Supplement*, Harrick Scientific Co., New York, 1975

30. Minto F.; Fambri L.; Scoponi M.; Gleria M.; Bortolus P.; Pradella F. *European Polymer Journal*, **1992**, 28, 167.
31. E' stato stimato per analisi con TGA e FTIR-DR che il calixarene desorbito in queste condizione è intorno al 40 %.
32. a) Blinkovsky A. M.; Dordick J. S. *Tetrahedron:Asymmetry*, **1993**, 4, 1221 b) Muthana S.; Yu H.; Huang S.; Chen X. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 39, 11919.
33. Gan Z.; Roy R. *Can. J. chem.*, **2002**, 80, 908.
34. a) Billesa F. et al. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, **2000**, 530, 183 b) Lin-Vien D.; Colthup N. B.; Fateley W.G.; Grasselli J.G. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, **1991**.
35. Per ulteriori informazioni vedere paragrafo 3.1 e riferimenti citati.
36. Armarego W. L. F.; Chai C. L. L. *Purification of Laboratory Chemicals*, 5th ed., Butterworth-Heinemann, Amsterdam, **2003**.
37. Still W. C.; Kahn M.; Mitra A. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923.