

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”

FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE
CHIMICHE
(XVII CICLO)

Nuove strategie sintetiche per l'ottenimento di
nucleosidi, nucleotidi e oligonucleotidi
modificati

Tutore:

Ch.mo Prof.

LORENZO DE NAPOLI

Candidata:

Dott.ssa

JENNIFER D'ONOFRIO

Relatore:

Ch.mo Prof.

MATTEO ADINOLFI

Coordinatore:

Ch.ma Prof.ssa

ROSA LANZETTA

INDICE

CAPITOLO 1	pag.
SINTESI IN FASE SOLIDA DI NUCLEOSIDI MODIFICATI	
1. INTRODUZIONE:	"
Nucleosidi modificati molecole dalle molteplici attività biologiche.....	1
Sintesi organica combinatoriale.....	" 11
Approccio Combinatoriale: sintesi di librerie di piccole molecole organiche.....	" 13
Approccio combinatoriale: Sintesi di librerie di analoghi nucleosidici	" 15
Approccio combinatoriale: Sintesi di librerie di nucleosidi 5'- modificati.....	" 19
2. RISULTATI E DISCUSSIONE:	
Nuova strategia sintetica: supporti funzionalizzati con analoghi nucleosidici ancorati attraverso la base eterociclica.....	" 23
Nuovi supporti solidi funzionalizzati con analoghi dell'uridina.....	" 25
Nuovi supporti solidi funzionalizzati con analoghi della 2'-deossi guanosina e inosina.....	" 33
Sintesi di matrici polimeriche funzionalizzate con alcol 4-idrossi benzilico.....	" 36
Studi relativi all'ancoraggio di analoghi nucleosidici (lead compound) mediante reazione di Mitsunobu.....	" 40
Nuovi supporti ancoranti analoghi dell'AZT.....	" 46
Sintesi di nuovi nucleosidi 5'-fosfodiesteri e 5'-fosforammidato.....	" 50
3. CONCLUSIONI.....	" 56
BIBLIOGRAFIA.....	" 57

CAPITOLO 2	
SINTESI IN FASE SOLIDA DI OLIGONUCLEOTIDI MODIFICATI	" pag.
1. INTRODUZIONE:	
Oligonucleotidi modificati	" 61
Strategie per il design di nuovi farmaci antisenso.....	" 65
Sintesi di oligonucleotidi coniugati.....	" 66
Oligonucleotidi coniugati all'estremità 5'	" 70
Oligonucleotidi coniugati all'estremità 3'	" 71
Glicoconiugati.....	" 73
2. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	" 79
Nuova metodologia sintetica per l'ottenimento di oligonucleotidi coniugati con oligosaccaridi.....	" 80
Sintesi del supporto funzionalizzato con un derivato del glucosio.....	" 81
Sintesi del supporto funzionalizzato con un derivato del lattosio.....	" 84
Assemblaggio del dominio oligosaccaridico.....	" 86
Studi di stabilità chimica ed enzimatica.....	" 91
Studi di denaturazione termica.....	" 93
Nuova strategia sintetica per la coniugazione in 3' e in 5' degli oligonucleotidi.....	" 94
Coniugazione <i>pre</i> -assemblaggio dell'ODN.....	" 97
Coniugazione <i>post</i> -assemblaggio dell'ODN.....	" 100
3. CONCLUSIONI.....	" 103
BIBLIOGRAFIA.....	" 105

CAPITOLO 3	
SINTESI IN FASE SOLIDA DI OLIGONUCLEOTIDI ADATTI ALLA FORMAZIONE DI STRUTTURE QUADRUPLEX	pag.
1. INTRODUZIONE.....	" 109
Arrangiamento strutturale delle G-quadruplex.....	" 111
Utilizzo di ODN G-quadruplex nelle terapie anticancro.....	" 113
ODN formanti G-quadruplex come aptameri.....	" 115
TG ₃ AG modificati in 5'.....	" 117
2. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	" 120
Sintesi della sequenza ^{DMT} TG ₃ AG.....	" 121
Sintesi della sequenza ^{TBDPhSi} TG ₃ AG.....	" 121
Sintesi della sequenza ^{DBB} TG ₃ AG.....	" 123
3. CONCLUSIONI.....	" 129
BIBLIOGRAFIA.....	" 130
PARTE SPERIMENTALE	
CAPITOLO 1.....	" 133
PARTE SPERIMENTALE	
CAPITOLO 2.....	" 161
PARTE SPERIMENTALE	
CAPITOLO 3.....	" 175
ABSTRACT.....	" 183
ABBREVIAZIONI.....	" 191

CAPITOLO 1

SINTESI IN FASE SOLIDA DI NUCLEOSIDI MODIFICATI

1. INTRODUZIONE

1.1 Nucleosidi Modificati

molecole dalle molteplici attività biologiche^{1a-b}

L'evento scientifico più interessante del ventesimo secolo, in campo medico, è stato certamente la scoperta degli antibiotici, molecole che possono impedire la proliferazione dei batteri in un organismo infetto senza creare grosse conseguenze all'organismo stesso. Sfortunatamente il progresso nel trattamento di malattie quali cancro ed infezioni virali, che sono tra le maggiori cause di mortalità nei paesi industrializzati, è stato molto più lento e limitato. Tuttavia, le conoscenze accumulate circa la replicazione virale e cellulare ha reso possibile l'identificazione di numerose sostanze in grado di interferire selettivamente con le funzioni virali o le cellule neoplastiche.

Alla metà degli anni ottanta, per la cura delle infezioni virali esisteva solo qualche vaccino; oggi il quadro è decisamente cambiato, poiché sono disponibili decine di terapie antivirali e centinaia di altri farmaci sono in fase di sviluppo.

I primi farmaci antivirali (diretti principalmente contro i virus erpetici) sono stati introdotti sul mercato negli anni sessanta ed erano il frutto dei metodi di ricerca tradizionali usati in farmacologia.

I virus sono organismi strutturalmente semplici con una struttura che ne prevede la replicazione all'interno di una cellula ospite. Per studiarne le proprietà, si infettavano le cellule, le si faceva crescere in coltura e si esponevano successivamente le colture all'azione di sostanze chimiche che si pensava potessero inibire le attività virali note a quell'epoca. Gli agenti che mostravano ridurre il titolo

virale in coltura erano poi selezionati per ricerche più approfondite. Oltre ad essere un processo casuale, questo tipo di analisi forniva ben pochi indizi su eventuali altre funzioni virali che potessero rivelarsi utili bersagli. Ciò ha ostacolato i tentativi di mettere a punto farmaci che fossero più efficaci o che mostrassero minori effetti collaterali. La genomica ha permesso di scoprire nuovi target promuovendo lo sviluppo di nuove classi di farmaci ad attività antivirale.

Tra questi composti i nucleosidi modificati svolgono un ruolo importantissimo; basti pensare che la maggior parte dei farmaci approvati per il trattamento di infezioni virali sono analoghi nucleosidici.

Il termine nucleoside fu coniato per la prima volta da Levene e Jacobs nel 1909 ed è associato agli acidi nucleici, dalla cui idrolisi furono isolati per la prima volta².

La caratteristica sostanziale di questa classe di molecole è la sostituzione di uno o più atomi, o gruppi funzionali, rispetto ai metaboliti naturali che sono i costituenti essenziali di DNA ed RNA.

Essi sono in grado di interagire con un terzo delle classi di proteine del genoma umano, incluso polimerasi, chinasi, reduttasi, recettori di membrana e proteine strutturali. I nucleosidi sono considerati fondamentali in molte vie metaboliche e di particolare interesse risultano i loro meccanismi di riconoscimento associati ad un ampio spettro d'azione. I nucleosidi modificati sono alla base di una serie di terapie farmacologiche. Essi, mantenendo inalterate le proprietà metaboliche dei composti naturali di partenza, sono in grado di penetrare all'interno della cellula e di sottostare ai normali processi metabolici, inibendo in maniera reversibile o irreversibile gli enzimi target, così da bloccarne le normali funzioni. Nel corso degli ultimi anni, la sintesi degli analoghi nucleosidici ha interessato un numero sempre crescente di studiosi. È utile suddividere queste specie in tre grandi categorie a seconda delle caratteristiche strutturali che li differenziano rispetto ai corrispondenti composti naturali:

- Nucleosidi contenenti la base eterociclica modificata;
- Nucleosidi contenenti l'unità di zucchero, ribosio o 2'-deossiribosio, modificata;
- Nucleosidi altamente modificati.

Molti derivati strutturali semplici dei nucleosidi fungono da costituenti minori degli acidi nucleici e da essi sono stati isolati. Tutte le specie di *t*RNA contengono basi “non usuali” che per la maggior parte sono di natura pirimidinica e presentano modificazioni relative sia alla base eterociclica che all’unità ribosidica (Figura 1) (ad esempio la 5-metiluridina, 3-metilcitidina, 4-tiouridina, 2-tiocitidina, 5-carbossimetiluridina o la N-4,2’-O-dimetilcitidina). L’introduzione nell’RNA di queste molecole può avvenire o in una fase post-trascrizionale, generalmente attraverso modificazioni enzimatiche di nucleosidi già esistenti, oppure, per azione delle glicosidasi, una base è eliminata, e sostituita con una base modificata.

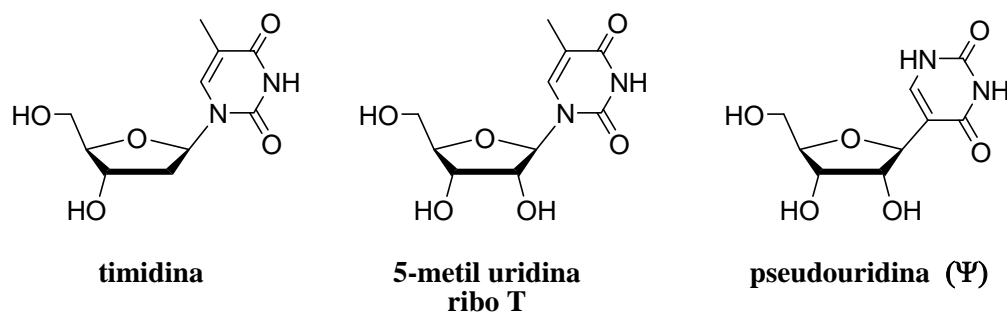


Figura 1. Nucleosidi con basi 'non usuali', ritrovati in *t*RNA

Molto meno numerosi sono i 2’-deossiribonucleosidi con strutture ‘non usuali’ riscontrati quali componenti minori del DNA; ciò è facilmente spiegabile tenendo conto del maggior controllo enzimatico al quale sono sottoposte le catene di DNA in crescita.

Un gruppo molto interessante di nucleosidi modificati, ritrovati in natura e dotati generalmente di spiccate attività antibiotiche, sono i nucleosidi altamente modificati (Figura 2). Essi comprendono un gran numero di prodotti naturali costituiti da una parte nucleosidica e da un’altra a struttura variabile, comprendente unità monosaccaridiche, disaccaridiche, peptidiche o lipidiche. Esempi di tali molecole sono le specie conosciute come polioossina J, tunicamicinaV e acido ottasilico.

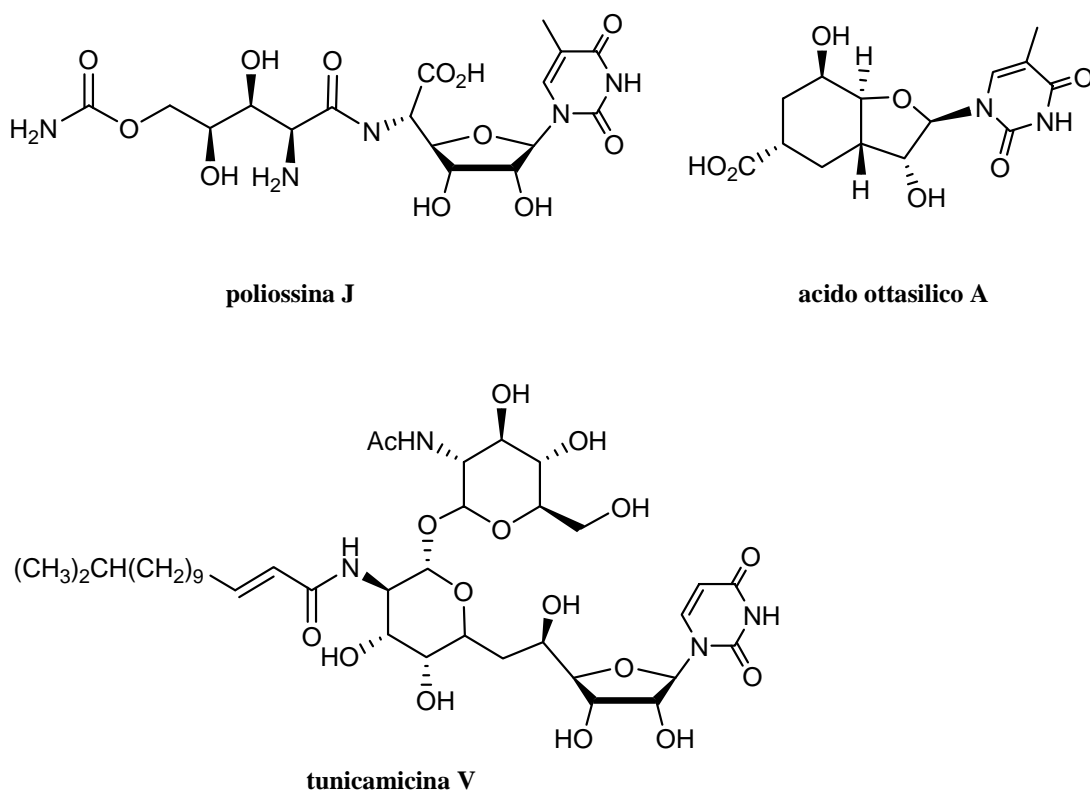


Figura 2. Nucleosidi altamente modificati

Il crescente interesse rivolto dalla ricerca scientifica alla sintesi di nuovi nucleosidi modificati³ è legata alle attività antibiotiche, antivirali e/o antitumorali esplicate da alcuni analoghi nucleosidici. Ad esempio analoghi arabinosidici di adenosina e citidina hanno una potente attività antivirale e antitumorale.

Analoghi nucleosidici come la 5-iodo-5'-ammino-5'-deossiuridina (AIU), 5-iodo-5'-ammino-2',5'-dideossicitidina (AIC), 5'-ammino-5'-deossitimidina (Figura 3) hanno attività antivirale contro il virus dell'Herpes Simplex (HSV).

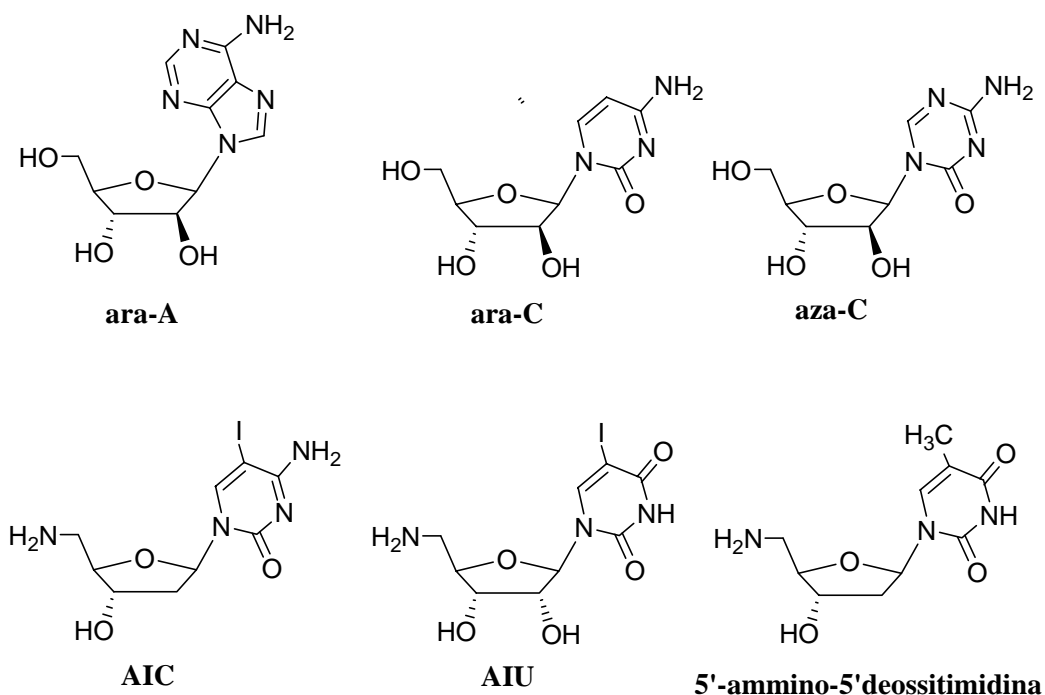


Figura 3. Nucleosidi modificati ad attività antivirale e antitumorale

Un altro gruppo di analoghi nucleosidici molto interessanti sono la ddC (2',3'-dideossicitidina), la ddi (2',3'-dideossiinosina) e l'AZT (3'-azido-3'-deossitimidina). Queste molecole sono state approvate dall'*American Food and Drug Administration* (FDA) come farmaci anti-HIV. Altre molecole, come ad esempio il d4T (2',3'-dideidro-2',3'-dideossitimidina), l'AZddU (3'-azido-2',3'-dideossiuridina), il carbovir (2',3'-dideossi-2',3'-dideidroganosina) e l'ossetanocina A (Figura 4) esplicano un'azione antivirale contro il virus dell'HIV e sono in avanzata fase di sperimentazione clinica.

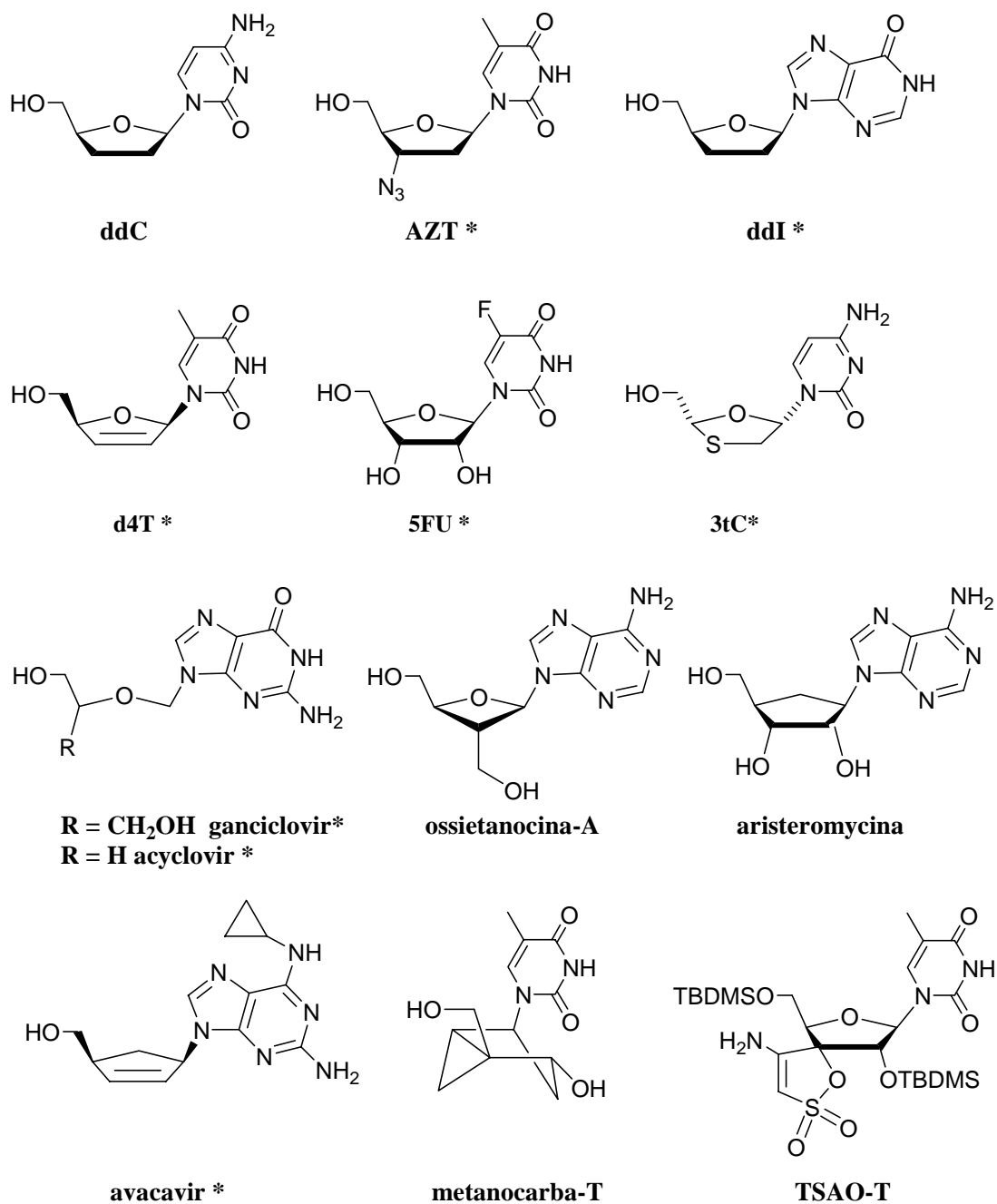


Figura 4. Alcuni nucleosidi modificati

* : approvati dalla *Food and Drug administration* per la sperimentazione sull'uomo

L'esatto meccanismo d'azione di ciascuno di questi agenti non è ancora del tutto noto⁴. I moderni metodi della ricerca farmacologica hanno fornito nuove possibilità per bloccare i virus in ogni fase del loro ciclo vitale. Le specie virali presentano lievi

differenze nei dettagli specifici delle loro strategie riproduttive, ma generalmente le diverse fasi del ciclo vitale possono essere suddivise come segue:

- formazione del legame e fusione con la cellula ospite;
- introduzione dei geni virali e loro replicazione;
- sintesi proteica (con l'ausilio dell'apparato di sintesi della cellula ospite);
- assemblaggio delle diverse componenti in nuove particelle virali e la fuoriuscita dalla cellula ospite di queste particelle, che possono quindi ricominciare il loro ciclo vitale in altre cellule dell'organismo.

I vaccini si dimostrano utili nella fase iniziale di un'infezione, perchè stimolano il sistema immunitario a distruggere specificamente l'agente patogeno responsabile della malattia quasi nel momento stesso in cui penetra nell'organismo. Oggi, l'alternativa più comune sono i cosiddetti vaccini a subunità, che contengono semplici frammenti dell'agente patogeno; questi frammenti non possono di per sé scatenare un'infezione ma, se selezionati in maniera appropriata, possono indurre una risposta immunitaria protettiva.

Quando non sono disponibili vaccini efficaci, diventano importanti le strategie antivirali anche se la maggior parte di esse riesce solo a ridurre la gravità e la durata dell'infezione virale.

Un gruppo di terapie limita l'attività virale interferendo con l'ingresso del virus all'interno della cellula, altre, invece, possono agire a livello di trascrizione del DNA o di sintesi proteica.

I nucleosidi modificati agiscono in molti casi come inibitori dell'espressione genica, interferendo con la sintesi di acidi nucleici e promuovendo la resistenza alla replicazione del virus nelle cellule infette. Altre volte generano un effetto antiproliferativo delle particelle virali, agendo come inibitori della sintesi proteica e della diffusione virale da cellula a cellula. In generale i nucleosidi modificati sono profarmaci e sono sequenzialmente fosforilati dalle chinasi cellulari ai corrispondenti derivati 5'-trifosfato (Figura 5). Il grado di efficienza del processo di fosforilazione può provocare differenze nell'attività di tali molecole. Dopo la fosforilazione,

l'azione farmacologica dipende dal tipo di modifiche chimiche contenute nella molecola.

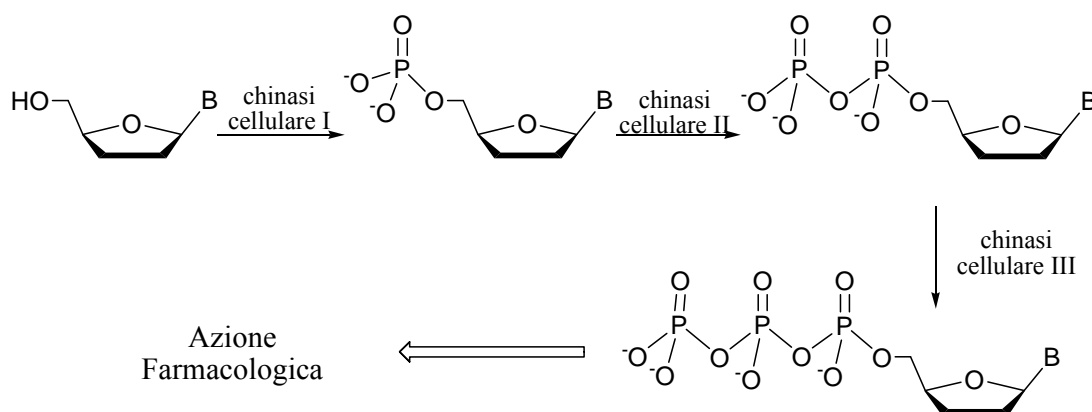


Figura 5. Fosforilazioni sequenziali di nucleosidi (profarmaci)

Analoghi come l'aciclovir (Figura 4), un nucleoside purinico modificato, in cui mancano il C-2' e C-3', fungono da terminatori di catena ponendo fine alla sintesi del DNA virale. Lo stesso meccanismo di azione⁵ è riscontrabile anche per la 3'- α -azido-3'-deossitimidina (**AZT**, Figura 4). Grazie alla sua somiglianza con il nucleoside naturale timidina, le chinasi cellulari sono in grado di fosforilare l'**AZT**, convertendola nella sua forma attiva, **AZT-5'-trifosfato**, che risulta un analogo della timidina trifosfato (**TTP**). L'inibizione della sintesi del DNA virale viene espletata con almeno due meccanismi: inibizione competitiva e terminazione di catena. Nell'inibizione competitiva, l'**AZT** compete con la **TTP** per il sito attivo della trascrittasi inversa provocando una diminuzione della forma attiva di tale enzima. Una volta incorporato in catena di DNA, si ha blocco irreversibile dell'allungamento, mancando tale nucleoside dell'ossidrilico in 3'.

L'**AZT**, messo a punto inizialmente come farmaco antitumorale, può provocare gravi effetti collaterali, come l'anemia. Tuttavia, gli studi compiuti sulla trascrittasi inversa, basati sulla conoscenza della sequenza genica dell'enzima, hanno permesso di utilizzare analoghi nucleosidici meno tossici. L'impiego di uno di questi, la lamivudina, è stato approvato anche per trattare le infezioni causate dal virus

dell'epatite B, che utilizza la trascrittasi inversa per convertire copie di RNA del suo genoma a DNA nuovamente in una molecola di DNA.

Nel caso dei nucleosidi antitumorali, invece, i meccanismi molecolari attraverso i quali si esplica l'attività sono particolarmente complessi. In generale si ha interferenza nella sintesi del DNA, dell'RNA e in alcuni casi anche nella sintesi proteica, come accade per il 5-aza-C⁶. L'interferenza si verifica sia per le cellule sane che per quelle neoplastiche, ma poiché la velocità di replicazione di queste ultime è molto più elevata, l'effetto finale si traduce in una riduzione della neoplasia.

I nucleosidi antivirali presenti oggi sul mercato sono stati progettati con lo scopo di confondere il virus utilizzando analoghi strutturali di substrati naturali. Una possibile strategia da seguire consiste nel trovare la giusta combinazione tra un'unità zuccherina e base eterociclica basandosi su studi di analisi configurazionale e conformazionali di enzimi e substrati. Una volta mappati i geni virali, si possono studiare le funzioni delle corrispondenti proteine e costruire così un quadro delle fasi molecolari con cui il virus si introduce e si sviluppa nell'organismo. Da qui si possono anche individuare quali sono le proteine, e i domini, all'interno delle proteine stesse, che sarebbe opportuno disattivare. In generale si preferiscono quei bersagli la cui distruzione determina la massima inattivazione virale, e si cerca di concentrarsi su domini proteici che assomigliano solo in piccola parte a quelli delle proteine umane, in modo da non danneggiare le cellule sane e da non causare eccessivi effetti collaterali. Allo stesso tempo, però, si cercano domini proteici sostanzialmente identici in tutti i principali ceppi del virus, per consentire l'impiego del farmaco nei confronti della gamma di varianti virali più ampia possibile.

Una volta individuato un bersaglio virale, si possono sfruttare diverse tecniche per identificare farmaci in grado di danneggiarlo: si possono, per esempio, utilizzare tecniche standard di ingegneria genetica per produrre copie molto pure di una data proteina da usare per mettere a punto farmaci. A questo scopo, si inserisce il gene corrispondente in batteri o in altre specie cellulari che siano capaci di sintetizzare un gran numero di copie della proteina codificata. Le molecole proteiche così prodotte costituiscono una base per lo screening rapido: solo le sostanze che sono in grado di legarsi ad esse saranno studiate in maniera più approfondita.

Le applicazioni farmacologiche dei nucleosidi modificati presentano, sfortunatamente, numerosi limiti. Innanzitutto non sempre è possibile prevedere correttamente la relazione tra struttura del nucleoside modificato e la sua attività farmacologica poiché quest'ultima è complicata dai processi di attivazione a cui è sottoposto il nucleoside in vivo, i quali implicano numerosi stadi (i principali sono il passaggio attraverso la membrana cellulare e i vari passaggi di fosforilazione). Ogni stadio di attivazione richiede il riconoscimento del substrato da parte di numerosi enzimi.

Nei processi biologici successivi diventa di fondamentale importanza la specificità d'azione. Dal punto di vista applicativo, considerando l'attività dei nucleosidi modificati dapprima come farmaci antivirali, si rileva che essi, a causa della mancanza di specificità di azione, presentano due inconvenienti principali:

- Possono fungere da terminatori di catena anche nella sintesi del DNA delle cellule sane;
- Presentano affinità di legame anche per alcuni enzimi che svolgono un ruolo chiave nel metabolismo cellulare.

Tale processo può comportare fenomeni di mutagenesi e/o di proliferazione cellulare incontrollata. Gli enzimi utilizzati dai virus e dalla cellula ospite per attivare i nucleosidi sono molto simili, come simili sono i meccanismi di attivazione. Ciò significa che un substrato riconosciuto da un enzima virale ha elevate possibilità di essere riconosciuto anche dall'enzima della cellula ospite.

La linea di confine tra attività e tossicità dipende esclusivamente dalla selettività verso due enzimi simili. Inoltre, è molto probabile che i virus sviluppino resistenza nei confronti di molti farmaci; ad esempio, quando i farmaci sono assunti per periodi di tempo molto lunghi, come accade nel caso di malattie croniche come l'AIDS e in un buon numero di casi di epatite B e C.

Anche nel caso dei nucleosidi antitumorali la tossicità rappresenta un ostacolo notevole all'utilizzo clinico dei farmaci. Gli effetti collaterali sono dovuti essenzialmente all'aspecificità degli analoghi nucleosidici, che comporta fenomeni immunodepressivi, dal momento che le cellule immunitarie, come quelle tumorali, possiedono un'elevata velocità di riproduzione.

Nonostante i notevoli progressi effettuati nel campo della realizzazione di analoghi nucleosidici e della determinazione delle loro proprietà biologiche, la messa a punto di nuove tecniche di screening farmacologico rapide ed efficienti (metodi HTS) e di nuove metodologie per la realizzazione di un elevato numero di molecole in tempi molto brevi (chimica combinatoriale), lascia, alla ricerca di base, notevoli possibilità per lo studio di tali specie.

1.2 Sintesi organica combinatoriale

L'approccio sintetico convenzionale per la sintesi di molecole biologicamente attive fa uso delle cosiddette metodiche classiche della sintesi organica, da sempre utilizzate nella ricerca di nuovi farmaci e di molecole d'interesse biologico in generale. Tali strategie prevedono essenzialmente tre fasi:

- sintesi chimica attraverso reazioni tradizionali;
- purificazione e caratterizzazione strutturale;
- determinazione delle proprietà biologiche del target in esame, usando saggi biologici convenzionali.

Recentemente, invece, la ricerca nel campo della scoperta di nuovi agenti terapeutici, si è rivolta alla preparazione di "librerie chimiche" come potenziali fonti di candidati per lo sviluppo di nuovi farmaci. Le librerie chimiche costituiscono vere e proprie collezioni di molecole strutturalmente correlate che possono essere ottenute sinteticamente o biosinteticamente ed essere successivamente sottoposte a test di attività biologica.

Inoltre, lo sviluppo di nuove metodiche di screening farmacologico sempre più veloci, sensibili ed efficienti anche su miscele di composti (HTS – high –throughput screening assays)^{7a-b}, ha in parte rivoluzionato il lavoro del chimico organico, introducendo la velocità di sintesi, o più precisamente, il numero di sostanze sintetizzate nell'unità di tempo, insieme alla resa ed alla selettività, come altro parametro per valutare l'efficienza del processo sintetico.

In tale contesto risulta cruciale disporre di una strategia sintetica che consenta l'ottenimento di un gran numero di molecole.

La chimica combinatoriale è una tecnica che consente la sintesi e lo screening farmacologico di centinaia di molecole strutturalmente distinte in tempi molto brevi. Il punto cruciale di tale metodica consiste nella possibilità di ottenere un ampio spettro di analoghi utilizzando le stesse condizioni di reazione; in questo modo, un chimico può sintetizzare centinaia di migliaia di composti contemporaneamente, anziché sintetizzare un solo composto per volta. Ad esempio, secondo le tecniche della sintesi classica, il composto A reagirà con quello B per dare la specie AB che sarà isolata solo dopo purificazione; al contrario, la chimica combinatoriale, offre la possibilità di creare tutte le possibili combinazioni tra varie specie A ($A_1 \dots A_n$) e B ($B_1 \dots B_n$) in modo da ottenere contemporaneamente un numero molto elevato di analoghi (Figura 6).

Il termine chimica combinatoriale è stato coniato per la prima volta nel 1980, quando Mario Geysen, a Melbourne in Australia, inventò un metodo per la contemporanea sintesi di una serie diversificata di peptidi, dando origine al primo esempio di libreria combinatoriale.

La sintesi organica combinatoriale (COS) rappresenta quasi un'inversione

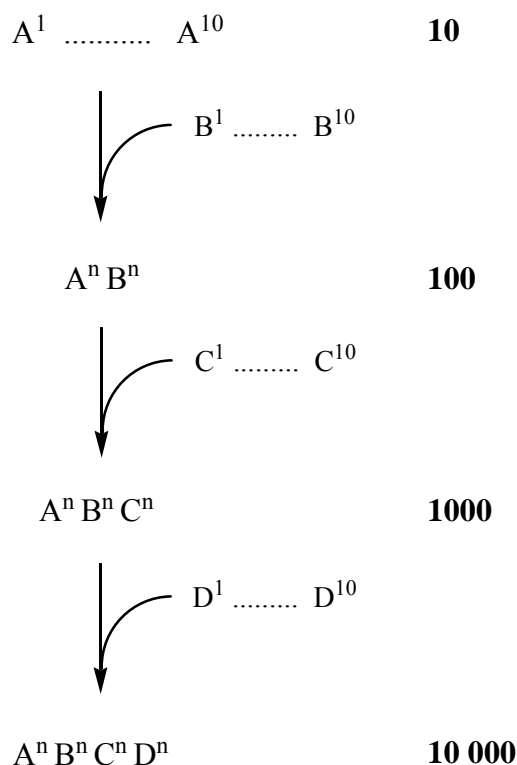


Figura 6. Sintesi combinatoriale multi-step

intellettuale rispetto alla sintesi organica applicata per 50 anni. In un approccio sintetico tradizionale il chimico è interessato alla messa a punto di sintesi molto complesse di molecole naturali o di analoghi di cui sia nota la struttura. Le reazioni chimiche sono spesso impiegate o sviluppate con il fine di risolvere specifici problemi sintetici, e non di mettere a punto metodologie di applicabilità generale. Un rigoroso controllo della regiochimica e stereochimica delle reazioni è necessario per il raggiungimento del target sintetico. Al contrario, lo scopo ultimo della sintesi

combinatoriale è la creazione di vere e proprie popolazioni di strutture molecolari diverse, e non l'ottenimento di una singola entità. Piuttosto che esercitare un rigoroso controllo di tutto il processo sintetico, la chimica combinatoriale, mantenendo elevata l'efficienza delle reazioni organiche, lascia un più ampio margine di variabilità stereo- e regiochimica.

1.3 Approccio combinatoriale: sintesi di librerie di piccole molecole organiche

Il concetto di libreria combinatoriale è strettamente connesso con quello di diversità molecolare, che rappresenta una delle caratteristiche più peculiari ed interessanti dell'approccio combinatoriale. In senso assoluto, la diversità in un insieme di composti è riferita alle funzioni presenti su ciascun elemento della libreria, che possano dare interazioni non covalenti con opportuni recettori, in relazione anche alle diverse conformazioni spaziali possibili. La creazione di una libreria di molecole si pone due obiettivi primari: la scoperta di nuovi farmaci e il potenziamento/ottimizzazione dell'attività di farmaci già esistenti. Il primo di tali obiettivi viene definito "random screening"⁸ e consiste nell'identificare un composto attivo non tenendo conto di informazioni strutturali ottenibili da molecole attive già esistenti; il secondo obiettivo è il "directed screening", o "chemical analoging", che mira a produrre analoghi strutturali di molecole attive al fine di potenziarne o ottimizzarne le proprietà. Questo secondo approccio è in linea di principio più logico e razionale. Infatti quando un insieme di molecole è stato trovato attivo nei confronti di un target, la ricerca di derivati più potenti attraverso la creazione di una libreria combinatoriale appare il proseguimento naturale dello studio. Tuttavia l'universo dei potenziali target farmacologici è in continua espansione, così il problema dell'identificazione di nuovi farmacofori diretti contro i suddetti target rende necessario anche il "random screening".

In via del tutto generale, librerie di composti si possono ottenere sia in soluzione che in fase solida. In soluzione esistono due approcci fondamentali: è possibile sintetizzare delle miscele di vari composti di complessità variabile oppure realizzare

una sintesi parallela che produce un numero molto minore di composti, ma presenta vantaggi nella caratterizzazione strutturale e nella determinazione delle proprietà biologiche della singola molecola.

La sintesi di composti in fase solida, invece, (solid phase organic synthesis – SPOS) presenta numerosi vantaggi rispetto a quella in soluzione. Ad esempio le procedure di reazione risultano notevolmente semplificate in quanto complessi processi di purificazione ed isolamento dei prodotti sono sostituiti da semplice filtrazione con solventi; si può usare un largo eccesso di reagente per condurre le reazioni a completezza ed il supporto può essere rigenerato dopo l'uso. Inoltre le metodiche sintetiche in fase solida, in linea di principio, sono suscettibili di automazione.

Solitamente, il supporto solido è costituito da una resina polistirenica funzionalizzata opportunamente in modo da consentire l'ancoraggio di un linker o direttamente del substrato.

Molti gruppi di ricerca e industriali hanno iniziato ad interessarsi attivamente di chimica combinatoriale intorno alla metà degli anni '80; all'inizio le "librerie combinatoriali" preparate erano costituite solo da oligomeri naturali, quali peptidi e oligonucleotidi⁹; questo perché lo schema di sintesi necessario per un oligomero è ripetitivo e ad alta resa, assicurando la preparazione di librerie numerose e di alta qualità. Tali librerie combinatoriali, una volta sintetizzate, venivano testate contro un recettore o un enzima in modo da individuare leganti ad elevata affinità oppure potenti inibitori. Nonostante questi studi abbiano ampiamente dimostrato le potenzialità delle tecniche di sintesi e di screening delle librerie combinatoriali, peptidi e oligonucleotidi sono dotati di una bassa attività e sono suscettibili di rapida degradazione in vivo; per tali ragioni, la loro utilità quali agenti terapeutici biodisponibili è spesso limitata.

Particolare interesse hanno suscitato, negli ultimi anni, le cosiddette "piccole molecole organiche"^{10a-b}, specie con peso molecolare non superiore a 600-700 u.m.a. che sono dotate di favorevoli proprietà farmacocinetiche.

Tali molecole, oltre ad essere interessanti per lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici, sono dotate di ulteriori proprietà, utili ai fini di un efficiente riconoscimento molecolare nonché per lo sviluppo di nuovi materiali e catalizzatori.

Inoltre, la messa a punto di una numerosa serie di reazioni chimiche e di nuove metodologie sintetiche in fase solida^{11a-c} ha, negli ultimi anni, esaltato le potenzialità dell'approccio combinatoriale, dirigendo l'attenzione alla sintesi di supporti ancoranti molecole dotate di peculiari caratteristiche, quali:

- la presenza di più gruppi funzionali;
- la presenza di più centri stereogenici;
- la versatilità chimica;
- le potenziali attività biologiche degli analoghi correlati;

La prima libreria di piccole molecole organiche, precisamente benzodiazepine, è stata riportata da Ellmann nel 1992¹²; da allora gruppi all'avanguardia soprattutto nel campo accademico (basti ricordare Nicolaou, Boger, Kurth, Ley, Ellmann ed Hanessian) ed alcune compagnie biotecnologiche specializzate in chimica combinatoriale (ad esempio Affymax, Selectide, Axys, Pharmacoepia, Combichem ed Oxford Diversity) hanno sviluppato un gran numero di efficienti schemi sintetici adatti alla produzione di numerose librerie.

1.4 Approccio combinatoriale: sintesi di librerie di analoghi nucleosidici

Nel vasto panorama della chimica combinatoriale e della sintesi in fase solida di librerie di piccole molecole organiche, nucleosidi e nucleotidi rappresentano una classe di composti interessanti. Essi possiedono infatti le caratteristiche strutturali e funzionali per la costruzione di librerie di potenziali farmacofori. E' infatti ben nota l'attività biologica di numerosi nucleosidi modificati, ed è sempre vivo l'interesse nei confronti di analoghi di oligonucleotidi con migliori proprietà di stabilità enzimatica e penetrazione delle membrane cellulari, nell'ambito delle strategie antisense¹³ e antigene¹⁴. Nucleosidi e nucleotidi sono dotati di numerosi gruppi funzionali manipolabili selettivamente e presentano più centri stereogenici che consentono una ben precisa definizione spaziale dei sostituenti.

Seguendo un approccio sintetico classico sono state realizzate, dall'inizio degli anni '80, molteplici famiglie di analoghi nucleosidici aventi come capostipiti

nucleosidi modificati dotati di spiccate attività biologiche. A tale scopo è stato necessario un massiccio impegno sintetico, a partire da molecole *lead* come ddC, ddI, AZT¹⁵, ossietanocina¹⁶, TSAO-T¹⁷ e tante altre, per la realizzazione di classi di analoghi nucleosidici dall'elevato grado di diversità e dalle spiccate attività antivirali.

E' stato presto riconosciuto che introdurre un punto di diversità nell'unità zuccherina o nella base del nucleoside rappresenta una strategia fondamentale per identificare leganti per specifici recettori, inibitori enzimatici o specie che modificano le funzioni dei nucleosidi. Ma solo negli ultimi anni un relativo interesse è stato rivolto all'ottenimento di librerie di tali molecole seguendo un approccio combinatoriale.^{18a-i}

Di particolare rilievo risulta un recente lavoro di R. Epple, R. Kurdirka, e W. A. Greenberg¹⁹, dell'università della California, che attraverso l'utilizzo di supporti solidi macroporosi ha consentito lo sviluppo di una via sintetica altamente affidabile e semplice per la derivatizzazione ad alte rese di 'scaffold' nucleosidici sia di tipo pirimidinico che purinico. Essi ancorando il nucleoside al supporto (Figura 7), grazie ad un legame acetalico degli ossidrili 2' e 3' con un opportuno linker, hanno focalizzato la loro attenzione sulla derivatizzazione della posizione 5' del D-ribosio, sulla posizione C6 della purina o sulla posizione C4 della pirimidina.

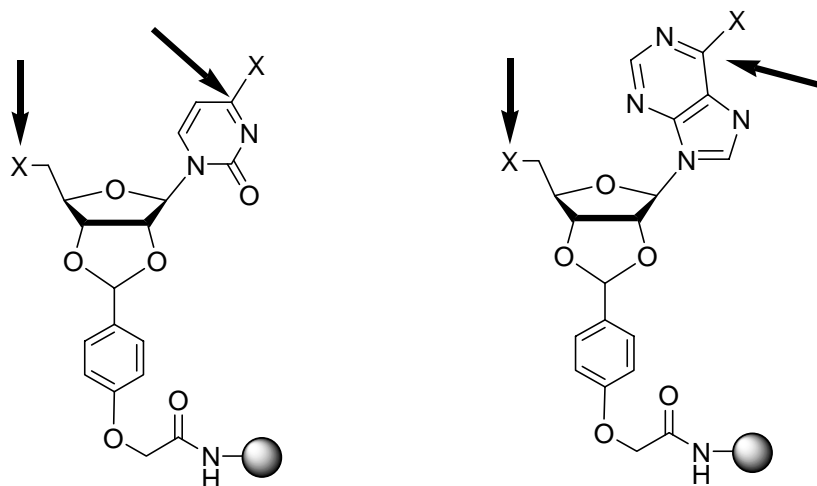


Figura 7. Supporti utili per la sintesi di librerie di nucleosidi modificati
Epple, R. et al. *J. Comb. Chem.* **2003**, 5, 292-310

Modificando tali posizioni chimicamente disponibili, è stata realizzata la sintesi di una consistente libreria (25000 membri) di nucleosidi dalle potenziali attività biologiche, ottenuti in modo efficiente e con buon grado di purezza. Questo lavoro rappresenta un esempio di combinazione di reazioni organiche su ‘scaffold’ avanzati con le più moderne tecnologie di chimica combinatoriale volta sia alla produzione di sostanze in alte rese e sia ad una veloce ricerca e sviluppo di nuovi target biologici.

Un’ulteriore dimostrazione di come lo sviluppo di efficaci metodiche di chimica combinatoriale e la sintesi nella ricerca farmaceutica viaggino parallelamente è rappresentato dalla sintesi della nikkomicyna e dei suoi analoghi (Figura 8), proposta da A. Suda e suoi collaboratori²⁰. La sintesi di tale antibiotico naturale e di librerie di analoghi è stata effettuata in fase solida grazie alla reazione di Ugi in cui la parte amminica è sul supporto solido che è ancorato al nucleoside mediante la posizione 5’ del D-ribosio.

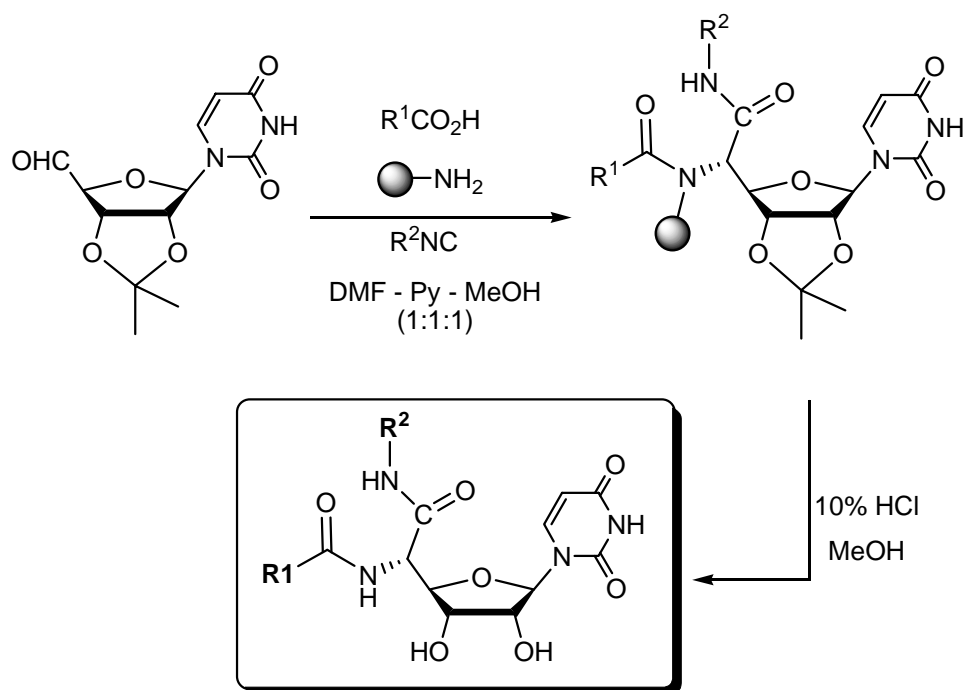


Figura 8. Sintesi di analoghi della nikkomicina
Suda, A. et al. *Heterocycles* **2001**, 55, 1023-1028

Non meno interessanti risultano le strategie riportate da W. Kazmiersk²¹ e R. P. Iyer²² che propongono, rispettivamente, la realizzazione di analoghi nucleosidici 5'-sostituiti e piccoli frammenti di acidi nucleici (nucleic acid based library- NAB) con giunzione internucleosidica modificata (Figura 9), utilizzando supporti, alcuni dei quali disponibili commercialmente, ancoranti l'unità nucleosidica attraverso le funzioni ossidriliche del D-ribosio.

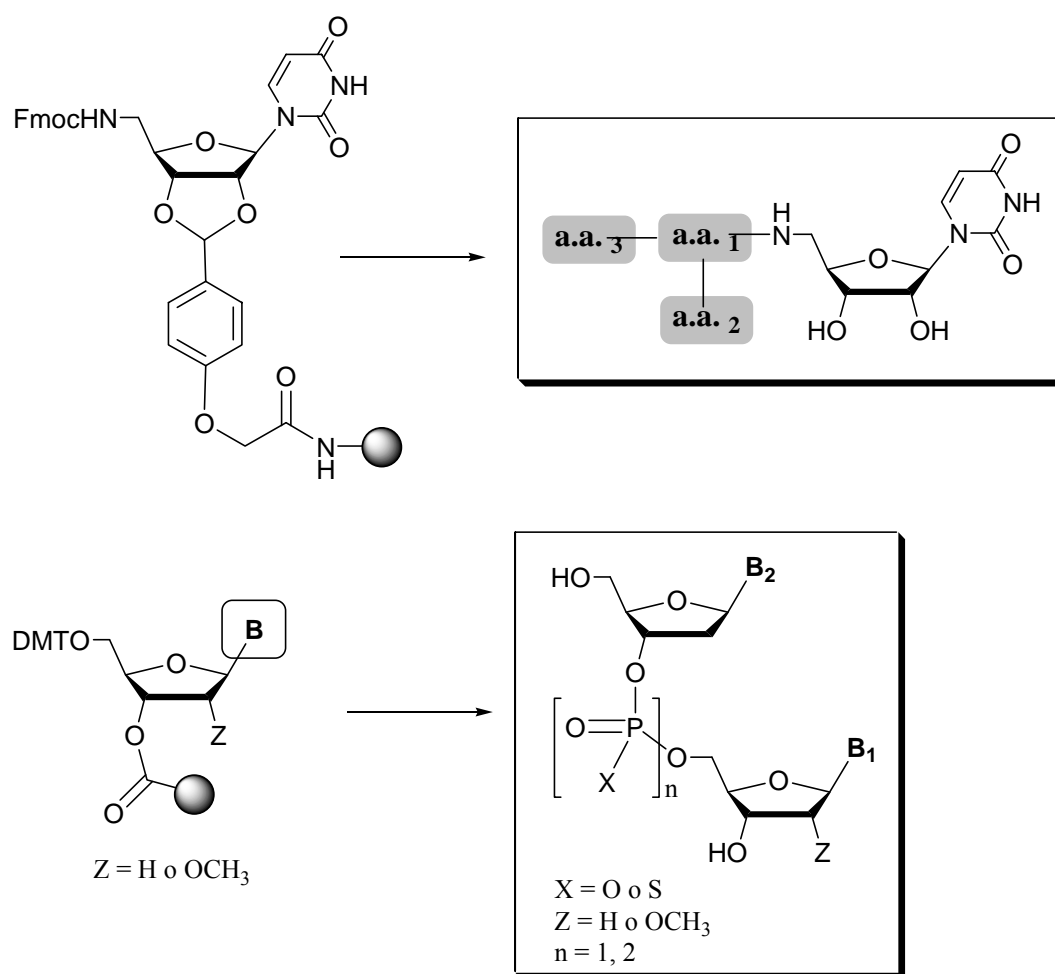


Figura 9. Librerie di nucleosidi e piccoli frammenti di acidi nucleici (NAB)
 Kazmiersky, W. et al. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 2759-2763
 Iyer, R. P. et al. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 1921-1925

E' importante tener presente che gli scaffold di acidi nucleici (NAB) sono un importante modello dal quale partire per la creazione di molecole dotate di un elevato

grado di diversità. Esistono almeno tre caratteristiche importanti connesse con la diversità dei NAB:

- Come per le altre piccole molecole organiche, i NAB possono essere utilizzati per creare diversità spaziale variando la disposizione di gruppi idrofobici, ionici, di legami idrogeno etc;
- Librerie di NAB possono essere create in modo da evidenziare “shapes in space” (ovvero incorporazione di sequenze con forte tendenza ad autostrutturarsi, come ad esempio quartetti di guanine, etc)
- Infine passando da deossiribosio a ribosio, a strutture a catena aperta, la conformazione dell’anello furanosico può variare da C2’-endo a C3’-endo, rendendo possibili variazioni locali o globali della conformazione dei membri della libreria.

1.5 Approccio combinatoriale: sintesi di librerie di nucleosidi 5’-modificati

Tipicamente una diminuzione dell’attività delle chinasi cellulari può provocare resistenza cellulare ai nucleosidi; connesso a ciò è l’osservazione che molti nucleosidi che non sono ottimi substrati per le chinasi cellulari possono risultare biologicamente attivi se rilasciati nella forma dei corrispondenti derivati monofosfato.

In secondo luogo, l’utilità dei nucleosidi è limitata dalla presenza di numerosi effetti collaterali quali anemia, neuropatia periferica e mielosoppressione.

Ancora, molti nucleosidi hanno una scarsa farmacocinetica in vivo, poiché vengono rapidamente eliminati secondo numerosi meccanismi. Questi effetti limitano la loro distribuzione nei tessuti e i tempi di permanenza in cellula.

La polarità e la scarsa stabilità biologica dei nucleotidi stessi ne limita il rilascio, sia in vivo che in vitro, nello spazio intracellulare.

Per tali motivi, la ricerca ha rivolto impegno sempre crescente alla scoperta di nuovi meccanismi per il rilascio dei nucleosidi, sviluppando una serie di derivati

pronucleotidici neutri che siano in grado di attraversare le membrane cellulari e rilasciare il nucleoside in cellula²³.

Tra tutte le strategie messe a punto, quella che ha fornito i migliori risultati è stata lo sviluppo di nuovi derivati 5'-modificati dei nucleosidi.

Numerosi gruppi di ricerca, negli ultimi anni, si sono interessati alla creazione di librerie di derivati di tale natura e allo studio del loro meccanismo di azione.

Tra questi spiccano i lavori di Iyer, Wagner e collaboratori²⁴. Tali studiosi, partendo dall'osservazione che farmaci convenzionalmente utilizzati per la cura di infezioni virali o di tumori risultano notevolmente tossici e non sufficientemente attivi, hanno realizzato una serie di derivati recanti in 5' un gruppo fosforamidato legato ad una serie di amminoacidi o altre porzioni a struttura variabile, soprattutto di natura aromatica. Sono stati, in tal modo, realizzati analoghi dell'AZT, della FLT (3'-fluoro-3'-deossitimidina), della d4T, dell'AraC, del 5 fluorouracile ed altri, caratterizzati dalla presenza di un gruppo arilico legato al fosforo in 5' mediante un legame estereo (Figura 10); nonché dalla presenza di un amminoacido (come ad esempio la L-alanina) legato al fosforo tramite un legame fosforamidato con il gruppo amminico primario²⁵. Tali specie risultano notevolmente stabili in mezzo cellulare e nel plasma umano, sono convertiti intracellularmente nei corrispondenti derivati trifosfato, risultano molto più attivi e meno tossici dei corrispondenti nucleosidi non modificati ed hanno un tempo di permanenza in cellula notevolmente più elevato. I componenti di tali librerie sono dei potenziali inibitori delle chinasi e polimerasi virali; il gruppo in posizione 5' ha il duplice compito di aiutare il rilascio intracellulare del nucleotide e di garantire delle interazioni idrofobiche che consentano un'elevata affinità di legame tra il nucleotide e il recettore target.

Di tali molecole sono stati studiati i meccanismi di azione, le loro potenziali attività antivirali ed anticancro in vivo ed in vitro così come l'influenza della porzione amminoacidica, della funzione ammidica ed esterea e della stereochimica dei gruppi introdotti sulla loro farmacocinetica in vivo.

Partendo dalla considerazione che esistono anche farmaci antivirali inibitori della trascrittasi inversa che non hanno natura nucleosidica (NNRTIs), come ad esempio la nevirapina o i TSAO, e convinti che per ottenere notevoli benefici da terapie antivirali sia necessario anche combinare differenti agenti anti-HIV, per prevenire la

resistenza del virus a determinate terapie, sono stati realizzati una serie di derivati che risultano dalla fusione di una porzione di tipo NRTI ed una di tipo NNRTI legate da un linker (Figura 10)²⁶, in modo da poter combinare le attività antivirali di entrambi i tipi di molecole.

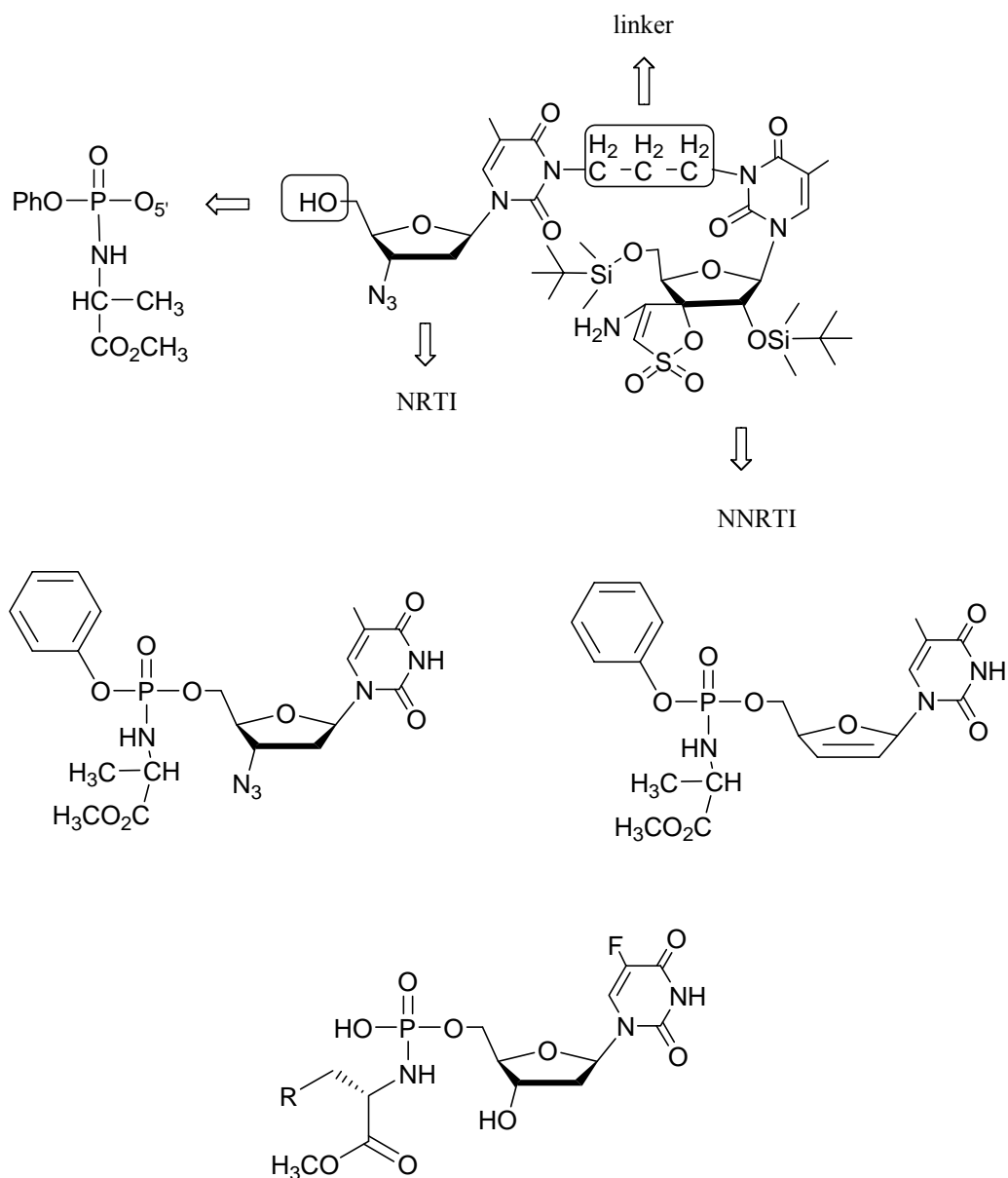


Figura 10. Esempi di nucleosidi 5'-modificati

Analoghi di tale natura, soprattutto di AZT e di TSAO, sono stati realizzati e testati e di questi sono stati anche sintetizzati numerosi analoghi che si differenziano

per la natura del linker che lega le due porzioni della molecola o che presentano ulteriori modificazioni sull'unità nucleosidica o non nucleosidica. Studi biochimici hanno dimostrato che tali specie posseggono una potente attività contro il virus HIV-1.

2. RISULTATI E DISCUSSIONE

2.1 Nuova strategia sintetica: supporti funzionalizzati con analoghi nucleosidici ancorati attraverso la base eterociclica

Durante il triennio di dottorato è stata realizzata la sintesi di nuove librerie di nucleosidi modificati seguendo due approcci differenti:

1. mediante l'utilizzo di supporti solidi ancoranti gli analoghi nucleosidici attraverso la base;
2. mediante supporti solidi ancoranti il nucleoside attraverso l'ossidrile in 5'.

Nel primo caso è stato possibile realizzare una piccola libreria di derivati aventi modifiche su una o più posizioni dello zucchero, nel secondo caso si ha accesso a librerie di derivati 5'-fosfodiesteri e 5'-fosforamidati del nucleoside prescelto.

In relazione a studi precedentemente effettuati su supporti funzionalizzati con unità nucleosidiche,²⁷ da parte del gruppo di ricerca presso il quale è stato svolto questo lavoro di dottorato, è stata di recente proposta una nuova strategia sintetica per la preparazione di nuovi supporti solidi.²⁸ Tale strategia prevede l'aggancio dell'unità nucleosidica opportunamente derivatizzata alla matrice polimerica attraverso la base eterociclica (Figura 11). In tal modo, a differenza delle strategie finora riportate in letteratura, è possibile

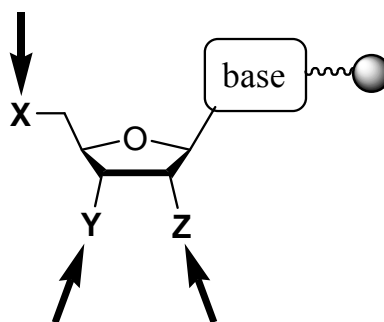
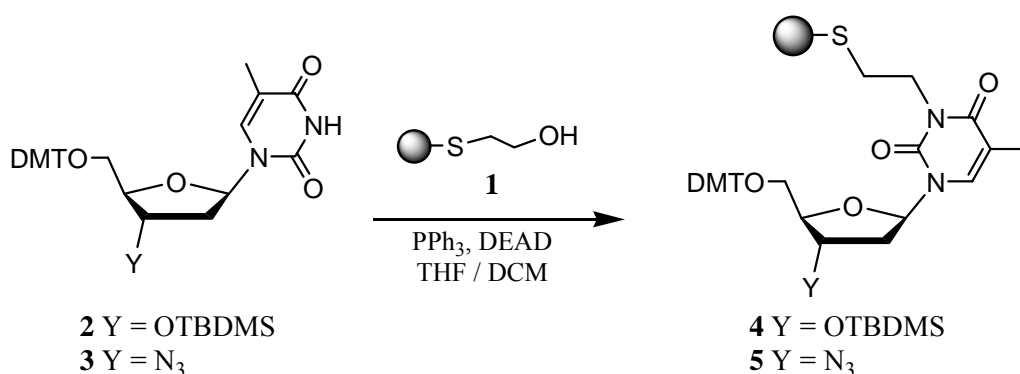


Figura 11. Nuova strategia sintetica

ottenere supporti solidi ancoranti nucleosidi in cui le funzioni ribosidiche sono disponibili ad una serie di manipolazioni chimiche e risultano quindi utili per la realizzazioni di librerie di nucleosidi modificati al ribosio. La reazione utilizzata per l'ancoraggio dell'unità nucleosidica attraverso la base eterociclica è la reazione di Mitsunobu.²⁹ Tale reazione, utile generalmente per la trasformazione $ROH \rightarrow RX$,

ampiamente utilizzata per alchilazioni di basi puriniche e pirimidiniche di nucleosidi, sfrutta l'acidità dei protoni delle funzioni immidiche o ammidiche delle basi azotate, promuovendo *in situ* la formazione dell'elettrofilo e del nucleofilo.

A tale scopo, studi precedenti hanno riguardato la possibilità di agganciare opportuni analoghi della timidina ad un supporto sintetizzato *ad hoc* (**1**, Schema 1) in grado di garantire il successivo rilascio dell'analogo nucleosidico per semplice trattamento basico.



Schema 1. Nuovi supporti ancoranti analoghi della Timidina

La matrice **1** è caratterizzata da un linker β -idrossietiltioetereo che consente, nel supporto ancorante il nucleoside (**4** o **5**), dopo ossidazione della funzione tioeterea a solfonica, il rilascio del nucleoside via β -eliminazione.³⁰ Il supporto **1** è stato sintetizzato mediante semplici procedure, a partire da prodotti disponibili commercialmente e utilizzando, come matrice polimerica, un copolimero polistirene (PS)-polietilenglicole (PEG), noto commercialmente come Tentagel, funzionalizzato con gruppi amminici primari, supporto molto versatile e compatibile con la sintesi di molte molecole organiche, nonché con la sintesi automatizzata di peptidi e oligonucleotidi. Sui supporti **4** e **5** (Schema 1) sono stati effettuati esperimenti per valutare la possibilità di manipolare le funzioni in 5' e 3' attraverso reazioni in fase solida, sintetizzando una serie di analoghi 3' e 5',3'-funzionalizzati della timidina.²⁸

2.2 Nuovi supporti solidi funzionalizzati con analoghi dell'uridina³¹

Una volta ottimizzata la strategia di incorporazione in fase solida -attraverso la base eterociclica- della timidina, ci si è posti l'obiettivo di rendere più generale l'approccio proposto ancorando al supporto anche altri nucleosidi, quali ribonucleosidi o specie meno usuali. Inoltre si è puntato alla realizzazione di nuovi supporti solidi che prevedessero delle condizioni più blande per il rilascio del nucleoside e quindi compatibili con la sintesi di analoghi contenenti funzioni non stabili alle condizioni di distacco previste dal supporto **1**. A questo scopo, durante il triennio di dottorato è stata verificata la possibilità di:

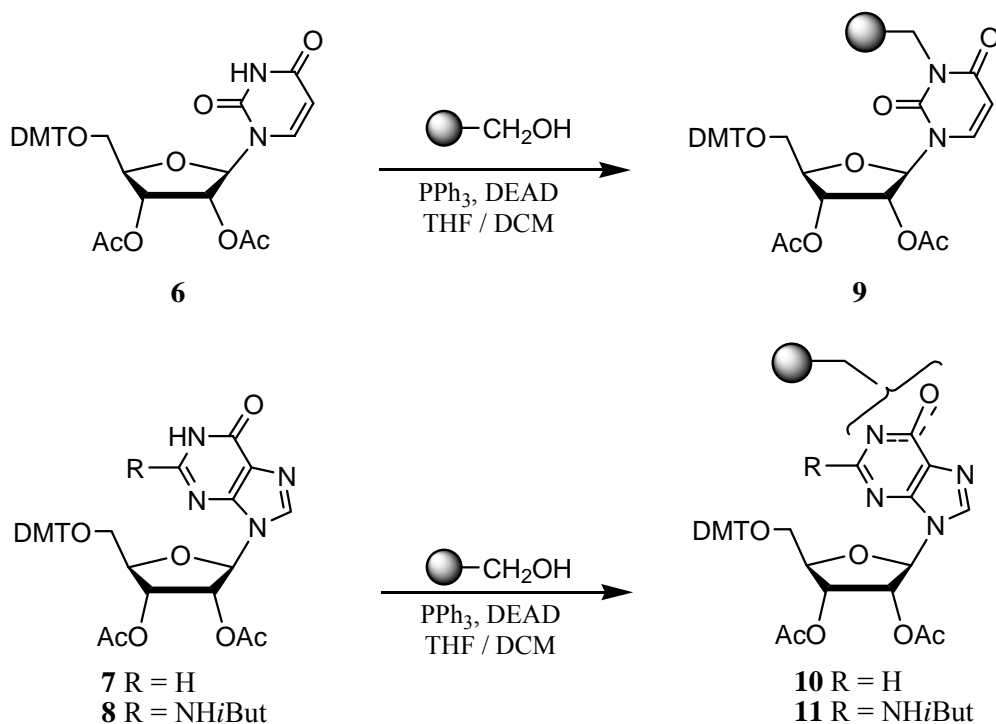
1. ottenere supporti solidi funzionalizzati con uridina, inosina e 2'-deossiguanosina, caratterizzati da una funzione immidica o ammidica sulla base eterociclica;
2. sintetizzare supporti non contenenti una funzione tioeterea;
3. utilizzare tali matrici in condizioni Mitsunobu per l'aggancio dell'unità nucleosidica;
4. manipolare opportunamente le funzioni ribosidiche per la sintesi di opportuni derivati.

In particolare, l'attività di ricerca è stata focalizzata sulle seguenti fasi:

- sintesi di nucleosidi opportunamente derivatizzati (core scaffold);
- ancoraggio degli analoghi sintetizzati alla matrice polimerica, via reazione di Mitsunobu;
- verifica della reattività delle diverse funzioni ribosidiche, attraverso la sintesi di opportuni analoghi.

Per valutare la possibilità di incorporare sul supporto solido gli analoghi nucleosidici progettati, sono stati effettuati, quali esperimenti preliminari, reazioni di aggancio dei nucleosidi **6**, **7**, **8** (Schema 2), al supporto Tentagel-OH (0.27 meq/g). Le rese di incorporazione, calcolate attraverso misure spettrofotometriche a $\lambda = 498$ nm del catione DMT rilasciato per trattamento acido su quantità pesate di resina, sono risultate soddisfacenti per gli analoghi dell'uridina e inosina (rese di

incorporazione medie del 90%), non incoraggianti nel caso della guanosina (<15%). Stimolati da tali risultati, si è proceduto alla sintesi di opportuni analoghi (*core scaffold*) da agganciare successivamente al supporto solido.

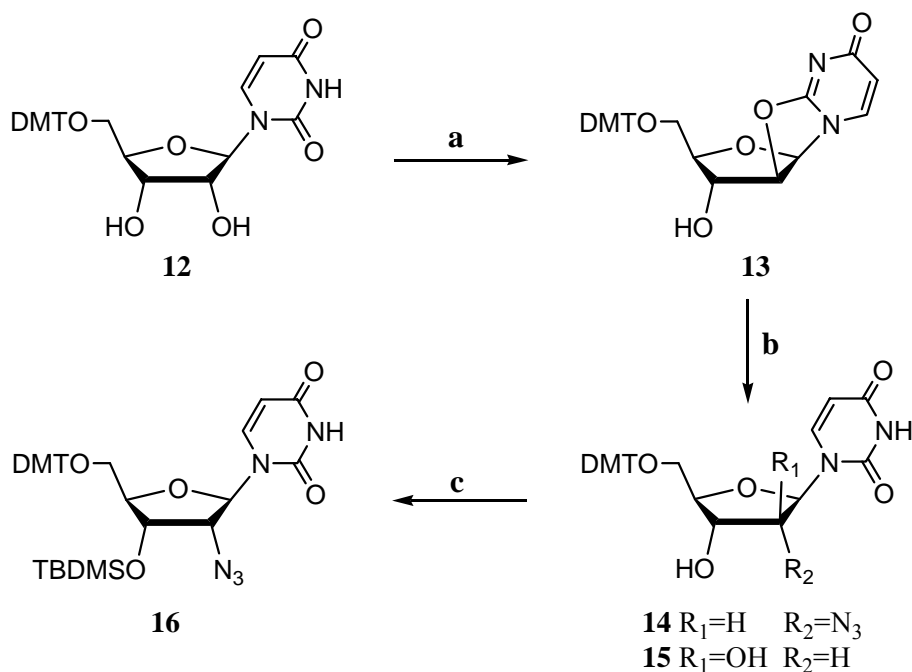


Schema 2. Ancoraggio in fase solida di analoghi nucleosidici mediante reazione di Mitsunobu

Prendendo spunto da dati riportati in letteratura,^{32a-e} è stata progettata la sintesi dell'analogo 2'- α -azido-5'-O-dimetossitriifenilmetil-3'-O-*tert*-butildimetilsililuridina quale utile *scaffold* da ancorare al supporto solido. I due gruppi protettori delle funzioni ossidriliche (DMT e TBDMS) sono stati scelti in quanto rimovibili ortogonalmente in fase solida, in modo da rendere le funzioni ossidriliche selettivamente manipolabili.

La 5'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-uridina (**12**, schema 3), prodotto di partenza, è stata ottenuta mediante classica reazione di protezione dell'ossidile in 5' con DMTCl (1.05 eq) e DMAP (0.1 eq) in piridina anidra con rese dell'87%.

A partire dalla 5'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-uridina (**12**), è stata effettuata la reazione con difenilcarbonato (1.3 eq) e NaHCO₃ (0.5 eq) in DMF a 120°C, ottenendo il prodotto desiderato 2,2'-anidro **13**.

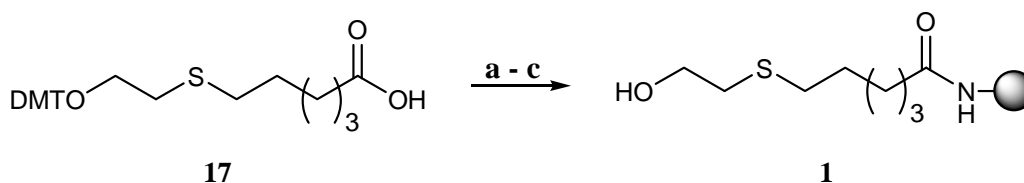


Schema 3. **a:** (PhO)₂CO, NaHCO₃, DMF, 120 °C 3 ore (83 %); **b:** LiN₃, DMF, riflusso, 5 ore (45 %); **c:** TBDMSCl, THF, AgNO₃, DIEA (85 %)

Tale prodotto risulta un substrato utile per una sostituzione nucleofila stereospecifica al C2'. Tale reazione condotta con NaN₃ (5.0 eq) in H₂O/DMF (1:10) a riflusso, ha portato al prodotto atteso **14**. In realtà, tale procedura ha fatto registrare rese di reazione medie del 40% e concomitante formazione di 5'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-D-arabinofuranosil-uridina (30%, **15**), ottenuto per attacco di OH⁻ al C2 della base eterociclica, con conseguente formazione dell'epimero al C2' dell'uridina. Utilizzando in alternativa LiN₃ (7.0 eq, soluzione acquosa al 20%) e conducendo la reazione in DMF a riflusso, non è stata osservata la formazione del derivato arabinosidico anche se ciò non si è tradotto, come sperato, in un sensibile incremento della resa di reazione (45%). Infine, l'ultimo passaggio della sequenza sintetica ha previsto la protezione dell'ossidrile in 3' come *tert*-butildimetilsililetere. La classica procedura di sililazione dell'ossidrile in 3', con imidazolo e TBDMSCl in

DMF a 25 °C, ha comportato delle rese di reazione molto basse (<25%). Conducendo tale reazione in THF, a riflusso, utilizzando AgNO₃ come catalizzatore e DIEA, è stato osservato un buon incremento della resa di reazione (85%), ottenendo il prodotto desiderato **16**.

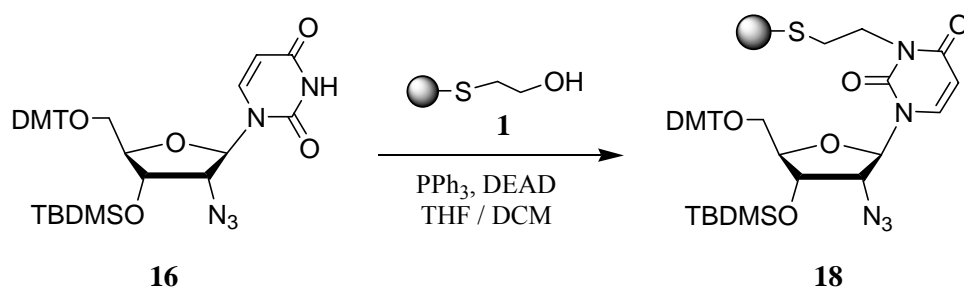
Avendo a disposizione l'analogo nucleosidico desiderato (**16**, Schema 3), una prima serie di esperimenti ha riguardato la possibilità di agganciarlo al supporto polimerico **1**. Tale supporto è stato ottenuto per semplice condensazione (Schema 4) dell'acido 6-[2-(4,4'-dimetossitriphenilmetossi)]-etilsulfanil-esanoico **17** con i gruppi amminici della matrice polimerica TG-NH₂, (0.29 meq/g) attraverso classica reazione con DIC (10.0 eq), HOBT (10.0 eq) e DIEA (10.0 eq) in Py per 48 ore a 25°C. La resa di incorporazione del tioetere, valutata per via spettrofotometrica attraverso il test del catione DMT, è risultata mediamente del 76%, corrispondente ad una funzionalizzazione di 0.22 meq/g.



Schema 4. **a:** TG-NH₂, DIC, HOBT, DIEA, Py, 25 °C, 48 ore; **b:** Ac₂O/Py (1:1), 25 °C, 30 min.; **c:** 1% DCA in DCM, 25 °C, 10 min.

Il supporto così ottenuto è stato sottoposto a trattamento con piridina e Ac₂O per bloccare i gruppi amminici che eventualmente non hanno reagito (*capping*) e successivamente con DCA (1% in DCM) per deproteggere la funzione ossidrilica.

Successivamente sul supporto derivatizzato **1** è stato condotto l'ancoraggio dell'analogo **16** attraverso reazione di Mitsunobu (Schema 5) in presenza di DEAD-TPP in THF/DCM per 5 ore a 25°C, che ha fornito il supporto **18** con rese medie di incorporazione del 95% (0.21 meq/g). Il supporto così ottenuto contiene tre gruppi funzionali sull'unità ribosidica che sono suscettibili di ulteriori manipolazioni; infatti, il DMT e il TBDMS possono essere selettivamente rimossi e gli OH così liberati, sfruttati per la formazione selettiva di legami fosfodiesteri o glicosidici.



Schema 5. Ancoraggio al supporto solido di analoghi dell'uridina mediante reazione di Mitsunobu

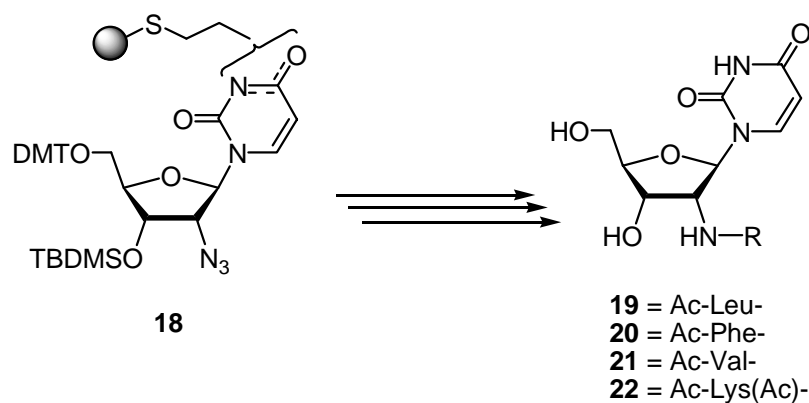
Inoltre, la presenza di una funzione N_3 , come forma mascherata di un gruppo amminico, può rappresentare un utile strumento per la funzionalizzazione dell'unità ribosidica con una varietà di molecole contenenti un gruppo carbossilico. È possibile, infatti, formare legami ammidici stabili sfruttando classiche ed efficienti procedure di sintesi in fase solida di peptidi.

Risulta, dunque, ben evidente che il supporto **18** può essere utilizzato per la realizzazione di librerie di 2'-amminoacil- o peptidil-derivati dell'uridina, quale nuova classe di molecole le cui potenzialità biologiche non sono state esplorate³³.

Allo scopo di verificare la versatilità della procedura sintetica proposta per la realizzazione di 2'ammino acil analoghi dell'uridina e piccoli oligomeri contenenti questo scaffold, dapprima si è proceduto alla sintesi dei derivati **19-22**.

A tale scopo la funzione azide è stata ridotta ad amminica per trattamento con una soluzione 0.35 M di PBU_3 in $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (4.5:1.4:6) per 5 ore a 25°C e successivamente condensata con amminoacidi differenti, opportunamente protetti (Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, 10.0 eq) in presenza di HATU-HOBt (10.0 eq) in DMF per 2 ore a 25°C . Le rese medie di incorporazione dei diversi amminoacidi, valutate mediante misure spettrofotometriche a $\lambda=301$ nm del gruppo fluorenilico, rilasciato per trattamento con una soluzione di piperidina al 20% in DMF, sono risultate sempre comprese tra l'85% e il 95%. Successivamente, dopo totale rimozione del gruppo Fmoc, il supporto è stato trattato con $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}$ (3/7, v:v) per acetilare i gruppi amminici liberati e poi con una soluzione 0.5 M di *m*-CPBA in DCM per ossidare la funzione tioetere a solfonica. I gruppi DMT e TBDMS sono stati rispettivamente rimossi per

trattamento con 1% DCA in DCM e con $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ per 18 ore a 25°C . Infine il trattamento con NH_4OH a 60°C per 18 ore ha consentito il rilascio degli analoghi 2'-N-amminoacilici dell'uridina **19-22** (Schema 6) in forma molto pura.



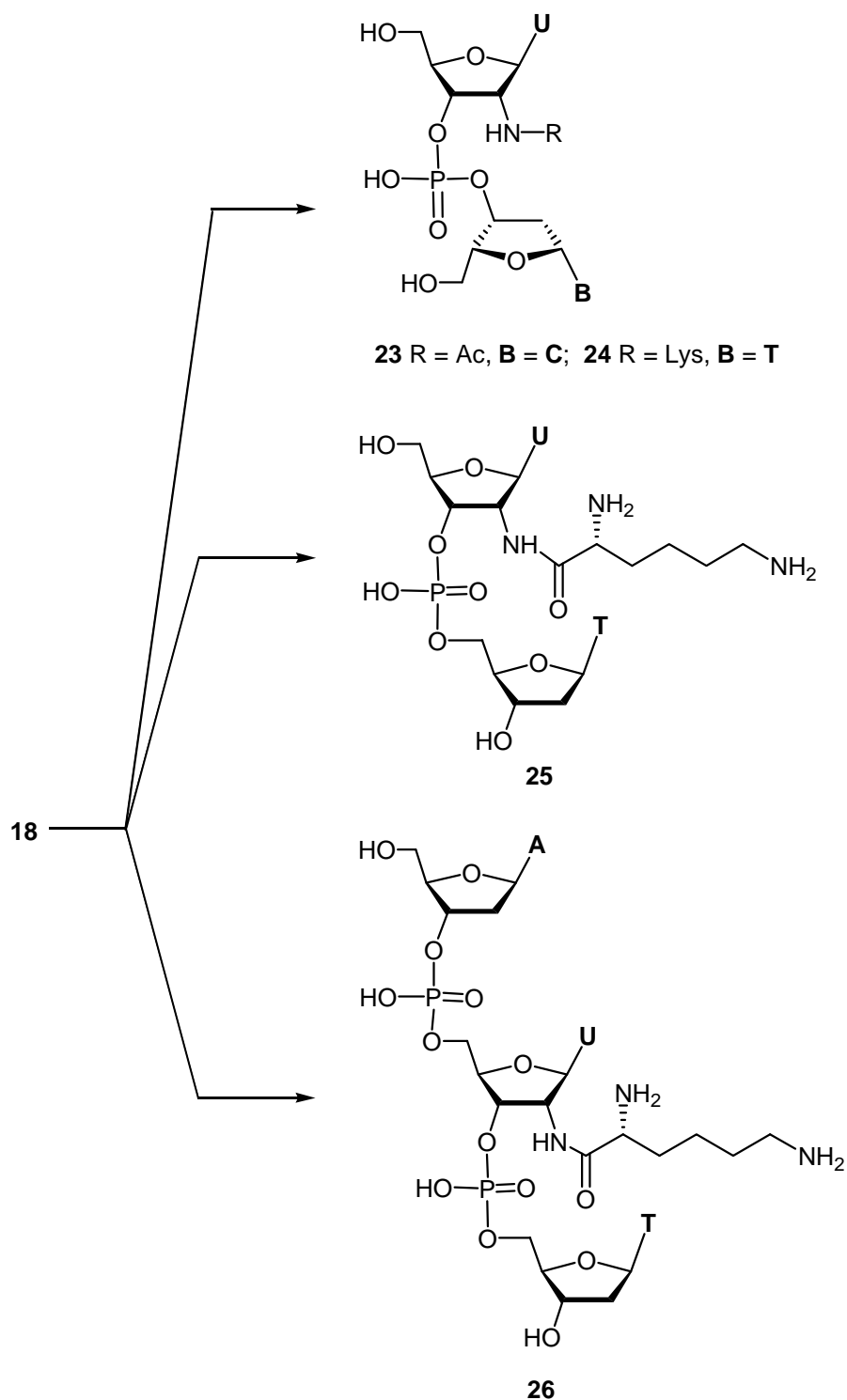
Schema 6. Sintesi dei derivati **19-22**

Per generare il dinucleotide **23** (schema 7), il supporto **18** è stato trattato con una soluzione 0.35 M di PBU_3 in $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (4.5:1.4:6) per 5 ore a 25°C per ottenere la riduzione della funzione 2'-azido. Dopo ripetuti lavaggi con H_2O , MeOH e DCM , il supporto è stato trattato dapprima con piridina e Ac_2O 3:7 (v/v) per 30 minuti a 25°C , poi con una soluzione 0.5 M di *m*-CPBA in DCM ed infine con $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ per 18 ore a 25°C per la deprotezione dell'ossidrile in 3'. Il controllo mediante TLC degli eluati, dopo il trattamento ossidativo e dopo la deprotezione dal TBDMS, non hanno evidenziato alcun distacco di materiale nucleosidico.

A questo punto il supporto è stato sottoposto ad un ciclo di accoppiamento con 5'-O-DMT-citidina-3'-O-(2-O-cianoetil)-fosforammidito su sintetizzatore automatico di oligonucleotidi. Dopo deprotezione degli ossidrili primari con 1% DCA in DCM è stato effettuato il distacco per trattamento con NH_4OH a 60°C per 18 ore.

Per la sintesi del derivato **24** (schema 7), la funzione 2'-azido del supporto **18** è stata dapprima ridotta ad ammina; questa è stata poi fatta condensare con Fmoc-Lys(Fmoc)-OH in presenza di HATU-HOBt in DMF e i gruppi amminici che non hanno reagito acetilati per trattamento con Ac_2O in piridina. Il supporto così ottenuto

è stato trattato con una soluzione 0.5 M di *m*-CPBA in DCM e poi con Et₃N•3HF per 18 ore a 25°C per la deprotezione dell'ossidrile in 3'.



Schema 7. Sintesi dei derivati **23-26**

A questo punto il supporto è stato sottoposto ad un ciclo di accoppiamento con 5'-O-DMT-citidina-3'-O-(2-O-cianoetil)-fosforamidato su sintetizzatore automatico di oligonucleotidi. Dopo deprotezione degli ossidrili primari con 1% DCA in DCM è stato effettuato il distacco per trattamento con NH₄OH a 60°C per 18 ore.

Il dinucleotide **25** è stato ottenuto dal supporto **18** attraverso le seguenti reazioni: a) riduzione della funzione 2'-azido; b) accoppiamento con Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH; c) rimozione del DMT; d) capping; d) ossidazione della funzione tioeterea del supporto; e) rimozione del TBDMS; f) accoppiamento su sintetizzatore automatico di DNA con 3'-DMT-timidina-5'-O-(2-O-cianoetil)-fosforamidato con rimozione finale del DMT; g) rimozione dell'Fmoc; h) distacco con NH₄OH.

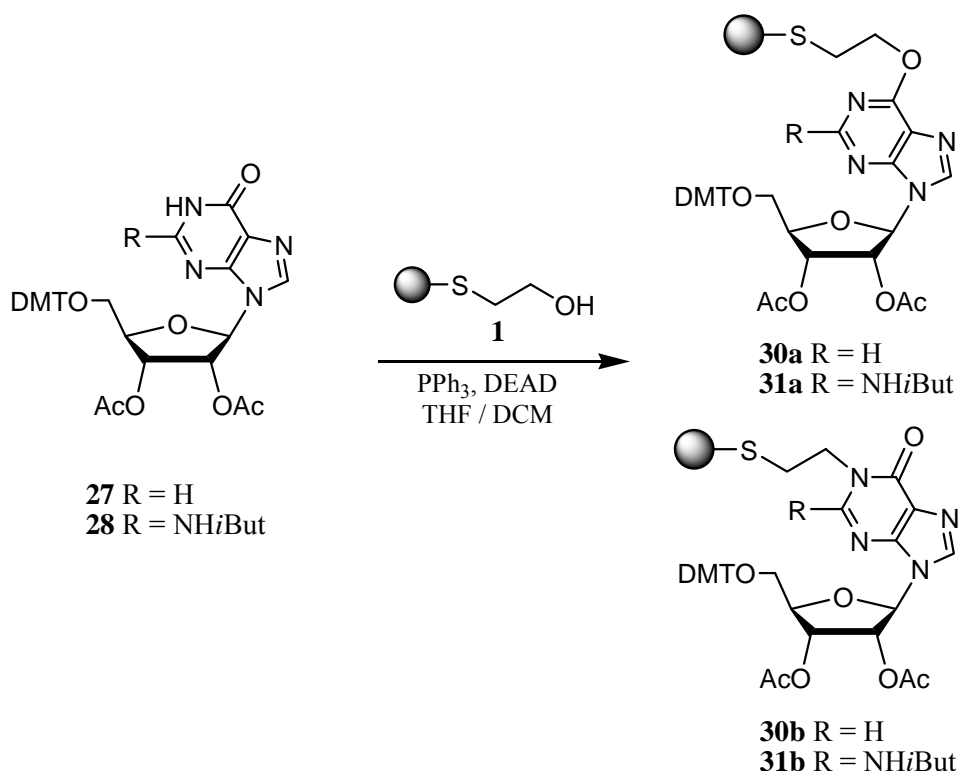
Infine il supporto **18** è stato utilizzato anche per la sintesi del trinucleotide **26** preparato in maniera del tutto analoga a **25** secondo la seguente sequenza di reazioni: a) riduzione della funzione 2'-azido; b) accoppiamento con Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH; c) capping; d) ossidazione della funzione tioeterea del supporto; e) rimozione del DMT; f) accoppiamento su sintetizzatore automatico di DNA con 5'-DMT-2'-deossiadenosina-3'-O-(2-O-cianoetil)-fosforamidato con rimozione finale del DMT; g) capping; h) rimozione del TBDMS; i) accoppiamento su sintetizzatore automatico di DNA con 3'-DMT-timidina-5'-O-(2-O-cianoetil)-fosforamidato con rimozione finale del DMT; l) rimozione dell'Fmoc; m) distacco con NH₄OH.

Derivato	t _R (min)	ESI-MS (m/z) trovato
19	14.51	399.27 [M+H] ⁺
		421.21 [M+Na] ⁺
		437.20 [M+K] ⁺
20	13.02	455.25 [M+Na] ⁺
		471.23 [M+K] ⁺
21	13.07	385.38 [M+H] ⁺
22	11.50	456.44 [M+H] ⁺
		478.42 [M+Na] ⁺
23	10.76	573.10 [M-H] ⁻
24	10.01	674.54 [M-H] ⁻
25	10.80	674.47 [M-H] ⁻
26	15.20	987.52 [M-H] ⁻
		493.45 [M-2H] ²⁻

Per tutti gli analoghi sintetizzati, l'analisi HPLC del grezzo di distacco, condotta usando una colonna in fase inversa (NUCLEOSIL 100-5 C8), ha evidenziato una discreta purezza della miscela distaccata. L'analisi ^1H e ^{31}P -NMR (per i derivati **23-26**) e ESI-MS dei prodotti isolati ha confermato l'identità dei composti sintetizzati (Tabella 1).

2.3 Nuovi supporti solidi funzionalizzati con analoghi di inosina e 2'-deossiguanosina

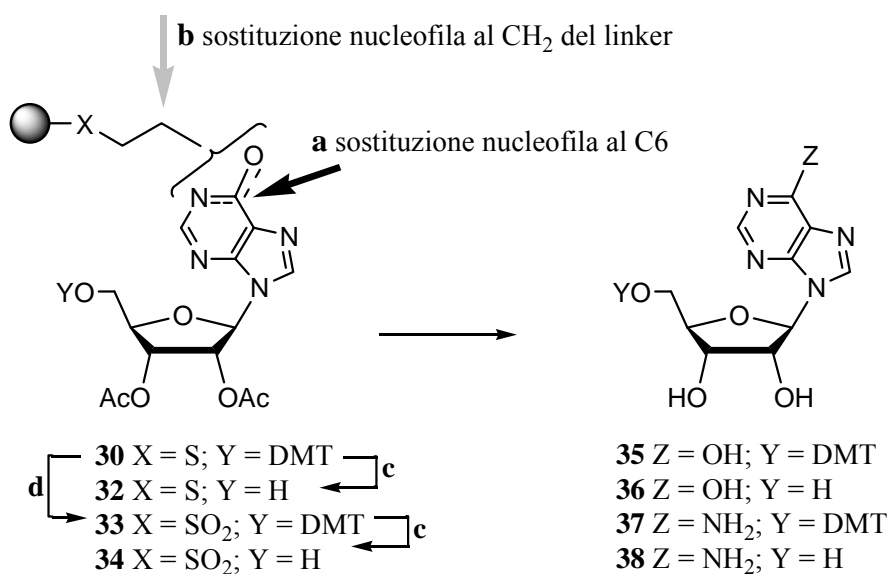
La nuova strategia di incorporazione su supporto solido è stata estesa anche a nucleosidi purinici quali 2'-deossiguanosina e inosina. Prove di ancoraggio degli analoghi **27** e **28** (Schema 8) al supporto **1** mediante reazione di Mitsunobu hanno mostrato rese soddisfacenti (85%) solo nel caso dell'analogo dell'inosina.



Schema 8. Ancoraggio in fase solida di analoghi purinici mediante reazione di Mitsunobu

Due sono le tipologie di legame che si possono formare tra l'inosina e il supporto, durante la reazione di Mitsunobu, portando alla formazione dei supporti **30a** e **30b** (O-alchil e N-alchil, Schema 9). Nota la reattività al C6 dei 6-O-alchil derivati dell'inosina ai nucleofili,³⁴ il supporto **30** è stato sottoposto a trattamento con NH₄OH (17M) a 60° per 18 ore, allo scopo di sganciare solo il nucleoside legato mediante un ponte O-alchilico dal supporto solido.

Le rese di distacco, calcolate attraverso misure spettrofotometriche a $\lambda = 498$ nm del catione DMT rilasciato per trattamento acido su quantità pesate di resina, sono risultate del 40%. Dall'analisi HPLC del grezzo di distacco sono stati ottenuti due prodotti poi isolati e caratterizzati per ¹H NMR e ESI-MS: la 5'-O-(4,4'-dimetossitritenilmetil)-inosina (**35**, Schema 13) e la 5'-O-(4,4'-dimetossitritenilmetil)-adenosina (**37**) in rapporto 1:2 (5'-DMT-I/5'-DMT-A) a dimostrazione dell'avvenuta sostituzione nucleofila al C6 da parte sia dell'OH⁻, sia di NH₃, durante la fase di distacco.



Schema 9. Prove di distacco
c: 1%DCA/DCM, 25 °C, 10 min.; **d:** 0.5 M mCPBA in DCM, 25 °C, 1h

Alla luce di tali esperimenti è stata valutata la possibilità, sfruttando il meccanismo di sostituzione nucleofila al C6, di poter sganciare alternativamente analoghi dell'inosina o dell'adenosina a seconda che la reazione di distacco venisse

effettuata utilizzando una soluzione acquosa di NaOH oppure una soluzione di NH₃ in metanolo.

A tale scopo, dopo aggancio del nucleoside **27** alla matrice polimerica, sono state effettuate prove di distacco (Schema 9) nelle seguenti condizioni:

- 17 M NH₄OH, 60 °C, 18 ore, sui supporti **30** e **32**;
- 2 M NH₃ in MeOH, 60 °C, 18 ore, sui supporti **30** e **32**;
- 0.5 M NaOH, 60 °C, 18 ore, sui supporti **33** e **34**.

Il supporto **30** è stato diviso in due aliquote, una delle quali, dopo deprotezione dal DMT per trattamento con 1% DCA in DCM (**32**, Schema 9) è stata trattata con NH₄OH per 18h a 60°C. Il materiale distaccato, analizzato mediante HPLC, utilizzando una colonna in fase inversa (NUCLEOSIL 100-5 C18), ha evidenziato la presenza di due prodotti: inosina (**36**) ed adenosina (**38**) in rapporto di 1:1.8 rispettivamente (Figura 12), la cui struttura è stata confermata paragonando i dati ¹H NMR dei prodotti isolati con campioni autentici. La percentuale di distacco è stata valutata mediante test del catione DMT sull'altra aliquota (**30**) ed è risultata essere del 45%. Il supporto risultante è stato successivamente sottoposto ad ulteriore trattamento con NH₄OH, a 60°C, per 18 ore e la percentuale di distacco è risultata essere inferiore al 5%. Tale risultato è stato spiegato ammettendo che il restante 55% di nucleoside sulla matrice polimerica risulta ancorato attraverso un legame N-alchilico, stabile al trattamento con NH₄OH a 60 °C.

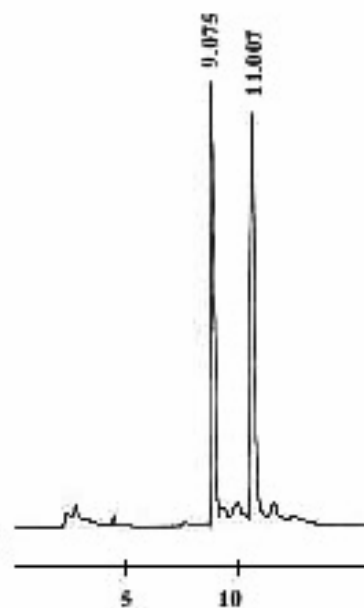


Figura 12. profilo HPLC del distacco con NH₄OH dal supporto **33**

Relativamente alla seconda prova, il supporto **30** è stato diviso in due aliquote, una delle quali, dopo detritilazione (**32**) è stata trattata con NH₃/MeOH 2 M a 60°C per 18 ore. Il materiale distaccato, analizzato mediante HPLC, ha evidenziato la

presenza unicamente di inosina (**36**) la cui struttura è stata confermata paragonando i dati ^1H NMR del prodotto isolato con un campione autentico. Tale risultato può essere spiegato ammettendo che la reazione principale non sia, come atteso, una sostituzione nucleofila aromatica al C6 (via **a**, Schema 9), bensì una sostituzione nucleofila al CH_2 del linker (via **b**, Schema 9), che porta al distacco dell'inosina (**36**). Solo quando si è in presenza di concentrazioni elevate di ammoniaca, com'è il caso del trattamento con NH_4OH 17 M, compete la sostituzione al C6 della base che porta anche al distacco di adenosina. Tale interpretazione è stata confermata dal test di Kaiser, un test colorimetrico specifico per i gruppi amminici primari, risultato positivo, effettuato sul supporto solido dopo trattamento con NH_3/MeOH 2M. Sull'altra aliquota è stata valutata la resa di distacco, mediante test del DMT, che è risultata essere del 45%.

Infine l'ultimo esperimento è stato effettuato sul supporto precedentemente ossidato con una soluzione 0.5 M di *m*-CPBA; tale supporto (**33**) è stato diviso in due aliquote, una delle quali, dopo detritilazione, è stata trattata con NaOH 0.5 M, 18 ore a 60°C . Come atteso, l'analisi HPLC del distaccato ha evidenziato la presenza della sola inosina (**36**), la cui struttura è stata confermata paragonando i dati ^1H NMR del prodotto isolato con un campione autentico. La percentuale di distacco, valutata mediante test del DMT sull'altra aliquota di **33**, è risultata essere del 95%.

2.4 Sintesi di matrici polimeriche derivatizzate con alcol 4-idrossibenzenico

Nella strategia sintetica appena descritta, il supporto solido realizzato è funzionalizzato con un linker β -idrossietiltioetereo; per tale supporto la procedura di distacco del nucleoside prevede :

- a.** ossidazione della funzione tioeterea a solfone (*m*-CPBA in DCM, 25°C)
- b.** trattamento basico (17M NH_4OH , 60°C)

Il trattamento ossidativo, necessario per il rilascio del nucleoside attraverso un meccanismo di β -eliminazione (Figura 13), limita l'utilizzo di tali supporti alla

sintesi dei soli analoghi nucleosidici contenenti funzioni compatibili con tali condizioni.

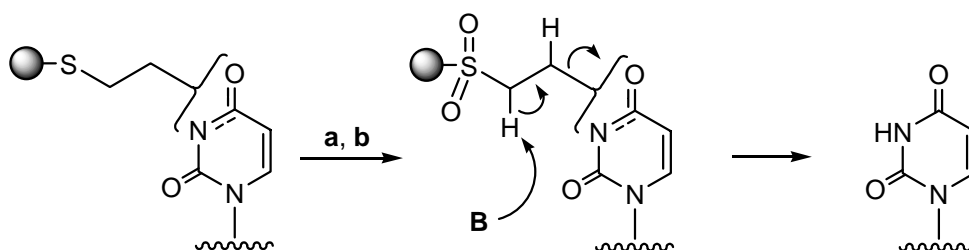


Figura 13. Meccanismo di distacco del nucleoside mediante β -eliminazione
a) 0.5 M *m*-CPBA in DCM, 25 °C, 1 ora; b) 17 M NH₄OH, 60 °C, 18 ore

Per ovviare a tale limitazione, una seconda seconda fase di studi è stata rivolta alla sintesi di nuovi supporti più versatili che consentano l'ancoraggio del nucleoside attraverso la base eterociclica, risultando così utili per la realizzazione di librerie di nucleosidi modificati al ribosio. A tale scopo, si è focalizzata l'attenzione sulle seguenti tematiche:

1. progettazione di matrici polimeriche derivatizzate con un linker che consente il rilascio del nucleoside per blando trattamento basico, evitando il trattamento ossidativo;
2. studi relativi all'ancoraggio ai supporti sintetizzati di analoghi nucleosidici (*lead compound*) mediante reazione di Mitsunobu;
3. verifica della possibilità di realizzare attraverso semplici ed efficienti reazioni, una serie di analoghi nucleosidici dalle potenziali attività biologiche.

La scelta del linker da ancorare alla matrice polimerica è stata condotta sulla base di un attento esame delle nuove metodologie sintetiche riportate in letteratura per l'ottenimento di oligonucleoditi 3'-fosfato.³⁵ E' stata focalizzata l'attenzione su supporti derivatizzati con alcol 4-idrossibenilico, che consentono il rilascio dell'oligonucleotide attraverso il meccanismo riportato in figura (Figura 14a).

Alla luce di tale meccanismo i supporti derivatizzati con alcol 4-idrossibenilico si prestano bene all'ancoraggio di analoghi nucleosidici mediante reazione di

Mitsunobu, offrendo la possibilità di distaccare l'analogo modificato per semplice trattamento basico (Figura 14b).

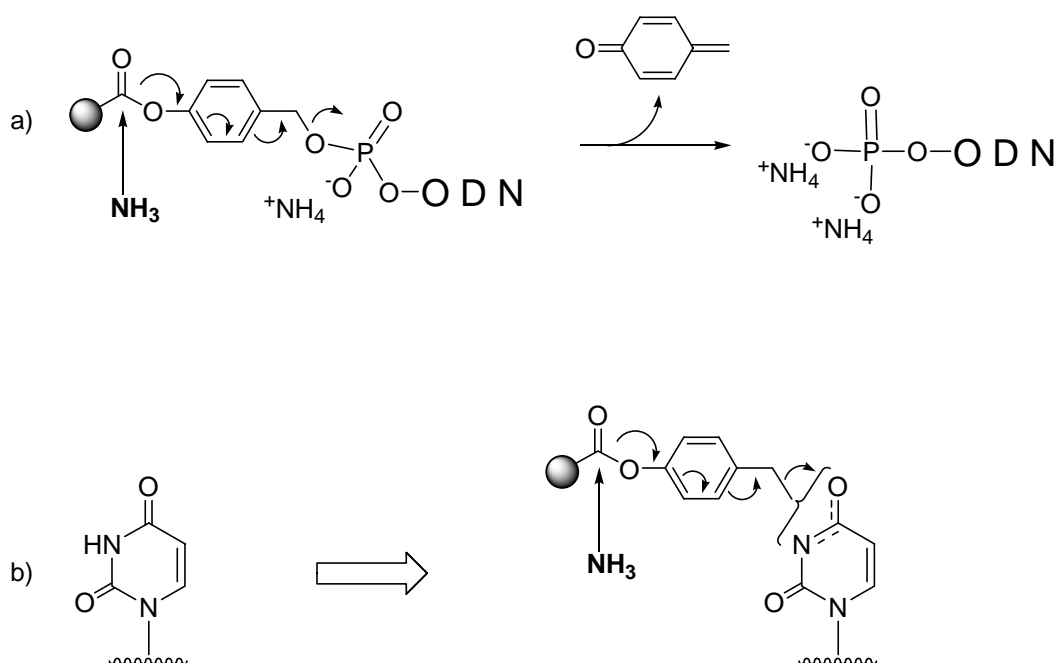
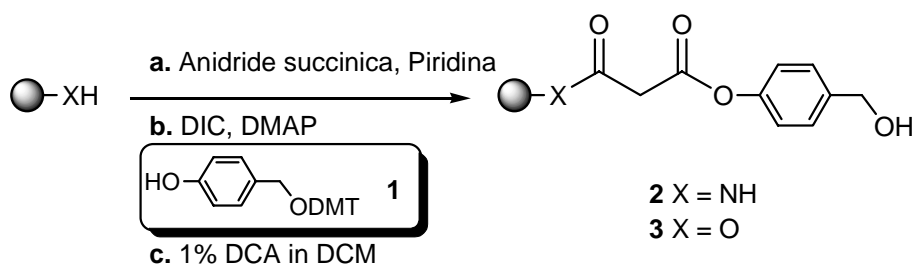
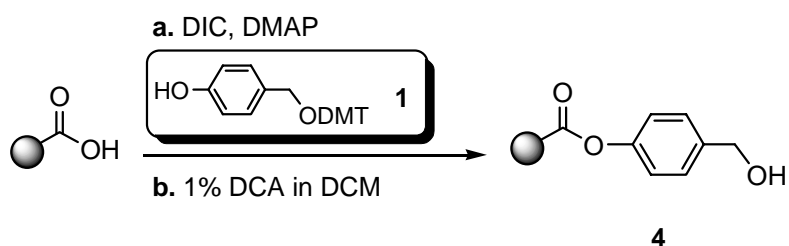


Figura 14. linker 4-idrossibenzilico; a) meccanismo di rilascio ODN fosfato; b) meccanismo ipotizzato per il rilascio del nucleoside pirimidinico

Allo scopo di verificare la compatibilità dei supporti derivatizzati con tale linker con le procedure di ancoraggio e di distacco, sono state preparate inizialmente le matrici derivatizzate **2-4** (Schema 10) attraverso semplici ed efficienti reazioni. Sono state utilizzate matrici quali Tentagel e polistirene, grazie alla buona compatibilità con una numerosa serie di reazioni utili per l'ottenimento di numerose molecole organiche. In particolare trattando inizialmente la Tentagel[®] ammino (X = NH) o idrossi (X = O) con anidride succinica (10.0 eq.) e piridina per 12 ore a 25 °C e successivamente conducendo una classica reazione di condensazione del supporto risultante con **1** in presenza di DIC (10.0 eq.), HOBt (10.0 eq.) e DIPEA (5.0 eq.) in piridina per 48 ore a 25 °C, sono stati ottenuti i supporti **2** e **3**.



● = Tentagel; X = NH, O



● = Polistirene

Schema 10. Sintesi dei supporti 2-4

Tabella 2

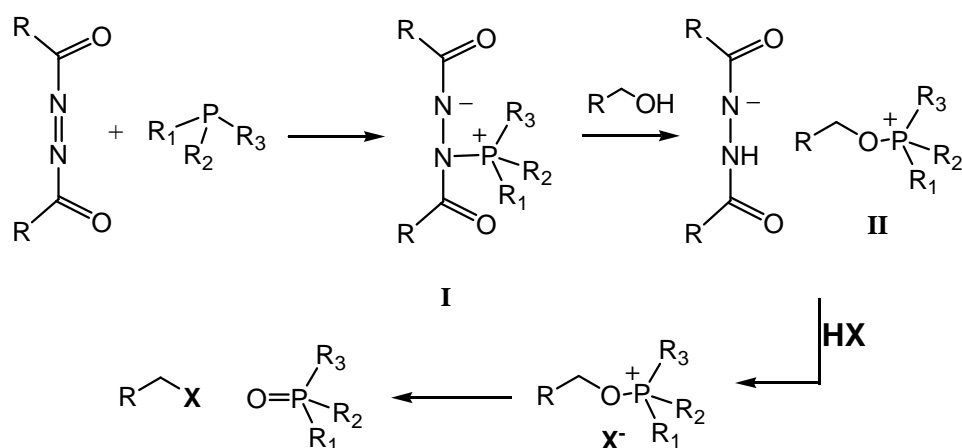
		Funzionalizzazione (meq/g)	Resa (%)*
		0.13	46
		0.25	89
		0.93	25

* determinata spettrofotometricamente mediante misure di assorbanza a $\lambda = 498$ nm del catione DMT ($\epsilon = 71700$ $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), su una quantità pesata di resina, sospesa in una soluzione di $\text{HClO}_4/\text{EtOH}$ (3:2, v:v)

A partire dal supporto polistirene-COOH ed effettuando la reazione di condensazione col linker **1** in presenza di DIC (10.0 eq.), HOBt (10.0 eq.) e DIPEA (5.0 eq.) in piridina per 48 ore a 25 °C è stato ottenuto il supporto **4**. Le rese di incorporazione del linker, valutate per via spettrofotometrica attraverso il test del catione DMT su una quantità pesata di supporto secco (Tabella 2), risultano soddisfacenti nel caso di Tentagel-OH, non superiori al 50% negli altri casi. I supporti con funzionalizzazione utile per studi relativi all'ancoraggio di analoghi nucleosidici, via reazione di Mitsunobu, sono risultati **3** e **4** con funzionalizzazione rispettivamente di 0.25 e 0.93 meq/g.

2.5 Studi relativi all'ancoraggio di analoghi nucleosidici (*lead compound*) mediante reazione di Mitsunobu

Nel corso degli ultimi anni, sono stati condotti interessanti studi per meglio comprendere l'influenza del tipo di fosfina e di aza composto prescelti come coppia redox sul decorso della reazione di Mitsunobu in termini di rese, di regio e stereospecificità.^{36a-g} È stato visto che la coppia redox gioca un ruolo fondamentale nella formazione degli intermedi **I** e **II** (Schema 11).



Schema 11. Meccanismo della reazione di Mitsunobu

In particolare la struttura della fosfina influenza, oltre alla velocità di formazione dell'intermedio **I**, l'elettrofilicità del carbonio che subisce poi l'attacco nucleofilo dalla specie X^- . Sono state osservate migliori rese di reazione, a parità di R-OH e HX, utilizzando tri-*n*-butilfosfina (TBP) rispetto alla trifenilfosfina (TPP) e ciò è attribuibile ad una maggiore o minore delocalizzazione della carica positiva. Infatti per la trifenilfosfina (TPP) nell'intermedio **II** la carica positiva è delocalizzata; nel caso della tri-*n*-butilfosfina (TBP) questa risulta strettamente localizzata sull'atomo di fosforo aumentando di conseguenza il carattere elettrofilo del carbonio adiacente che subisce la sostituzione nucleofila. In relazione all'aza composto è stato osservato invece che la sua struttura influenza la basicità dell'azoto nel complesso **I**; una maggiore basicità di tale sistema, utilizzando ADDP o TMAD al posto della classica DEAD consente di estendere tale reazione a sistemi HX con pK compreso tra 10 e 15.

In una prima fase l'attenzione è stata focalizzata all'ottimizzazione delle rese di ancoraggio di opportuni analoghi nucleosidici, variando una serie di parametri quali la matrice polimerica, il solvente, la temperatura e la coppia red-ox.

Sono stati scelti, per tali studi, analoghi nucleosidici protetti opportunamente alle funzioni ribosidiche, quali la 5'-O-dimetossitriifenilmetil-3'-O-acetiltimidina (**5**), 5'-O-dimetossitriifenilmetil-2',3'-di-O-acetil-uridina (**6**) e la 5'-O-dimetossitriifenilmetil-2'- α -azido-3'-O-*tert*-butildimetilsililuridina (**7**), il cui scheletro può rappresentare un utile scaffold per la sintesi di analoghi nucleosidici (Figura 15).

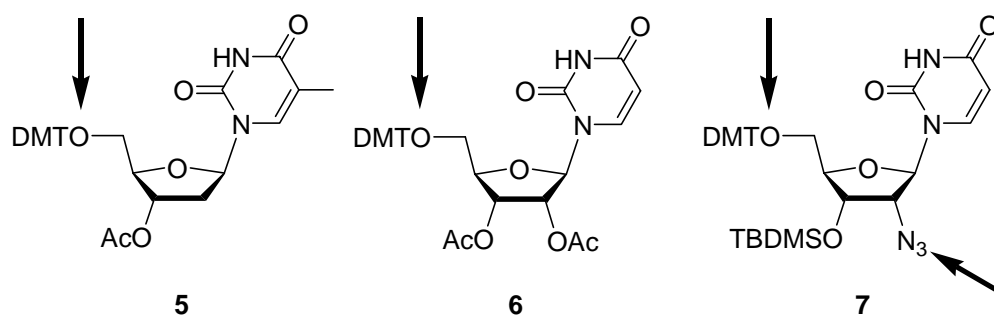


Figura 15. Analoghi nucleosidici scelti come "scaffold"

In analogia con quanto riportato in letteratura, relativamente alla reazione di Mitsunobu in fase solida, sono state condotte reazioni di ancoraggio degli analoghi scelti ai supporti **3** e **4**, in solventi quali THF, DCM, benzene, NMM e in alcuni esperimenti sono state utilizzate piccole percentuali di ammina. È infatti riportato in alcuni casi che la presenza di un'ammina può influenzare in modo significativo le rese di reazione^{36a,c}.

Da un'analisi dei dati raccolti (Figura 16, 17, 18) si evince una non semplice razionalizzazione e comprensione dell'influenza di alcuni parametri sulle rese di ancoraggio. In particolare l'andamento di tali rese è funzione della natura del nucleoside. I solventi migliori sono risultati il THF e il DCM e l'aggiunta di ammina (DIPEA) non ha, in nessun caso, fatto osservare dei miglioramenti significativi nelle rese di reazione. Rese molto basse sono state osservate utilizzando la coppia red-ox PBu_3 -ADDP, in contrasto con quanto è riportato per reazioni in soluzione, in cui l'utilizzo di tale coppia consente di ottenere rese accettabili anche con sistemi con pKa maggiore di 10. Questo risultato negativo è stato spiegato dal fatto che il complesso PBu_3 -ADDP precipita, sottraendosi in tal modo alla reazione in fase eterogenea. In ogni caso sono state trovate le migliori condizioni di ancoraggio per i diversi nucleosidi, consentendo l'ottenimento dei corrispondenti supporti con funzionalizzazione media di 0.14 meq/g.

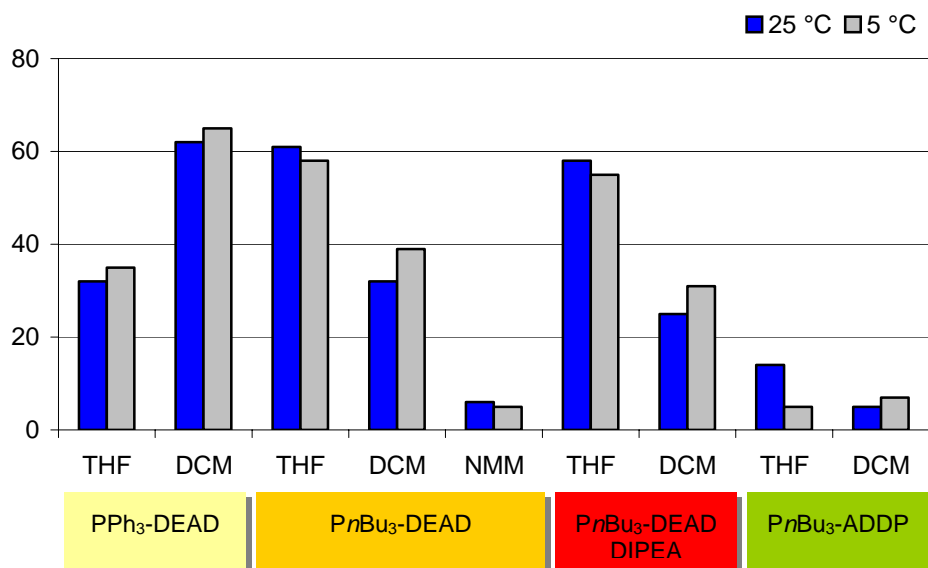
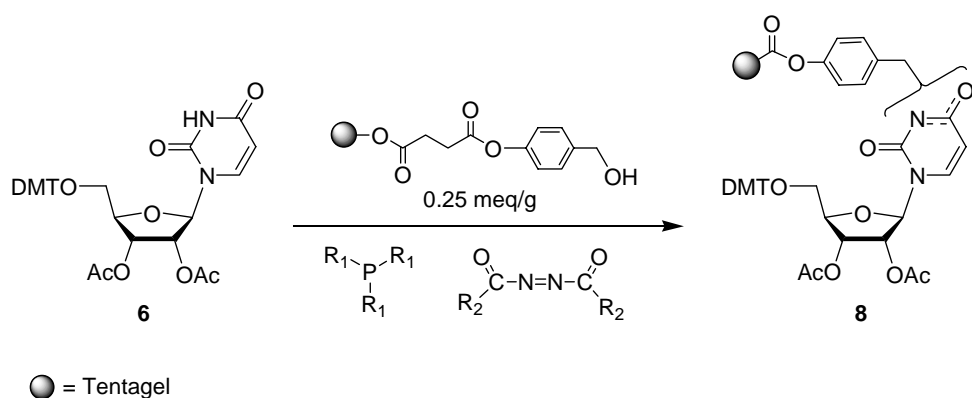


Figura 16. Andamento delle rese di reazione per l'incorporazione in fase solida del nucleoside **6** in funzione dei parametri riportati

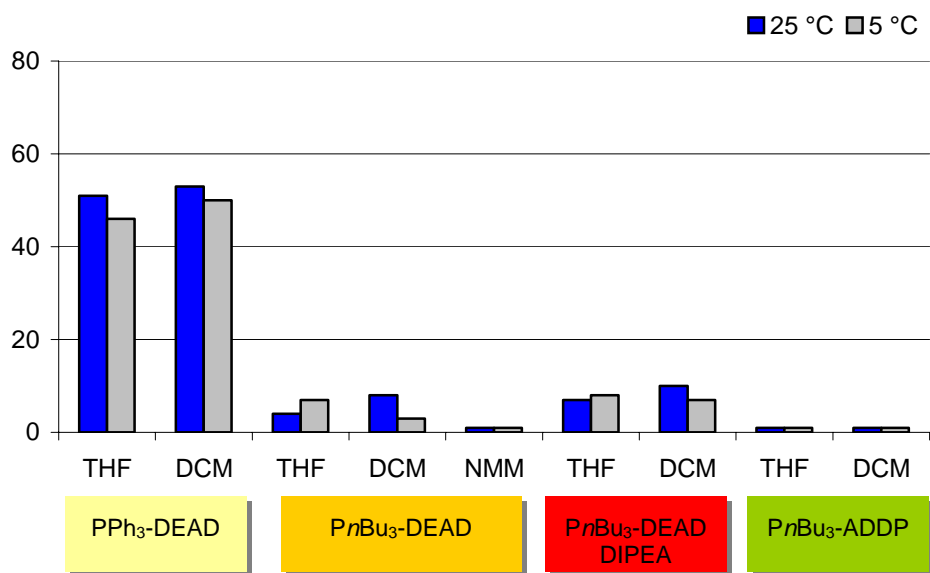
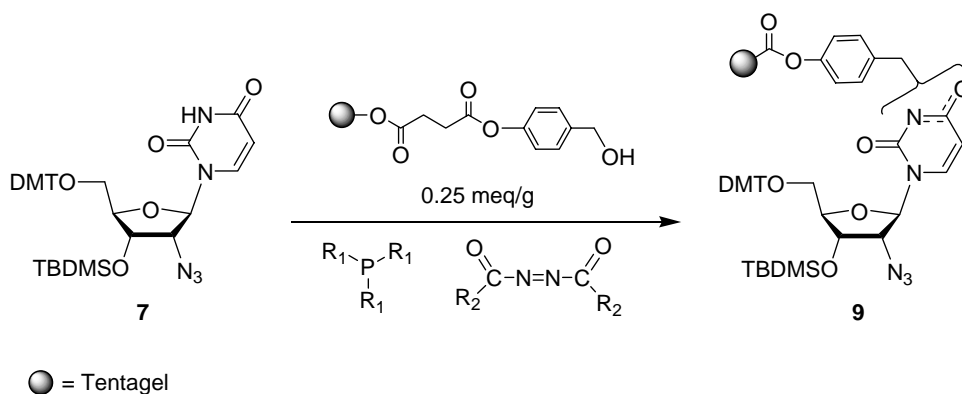


Figura 17. Andamento delle rese di reazione per l'incorporazione in fase solida del nucleoside **7** in funzione dei parametri riportati

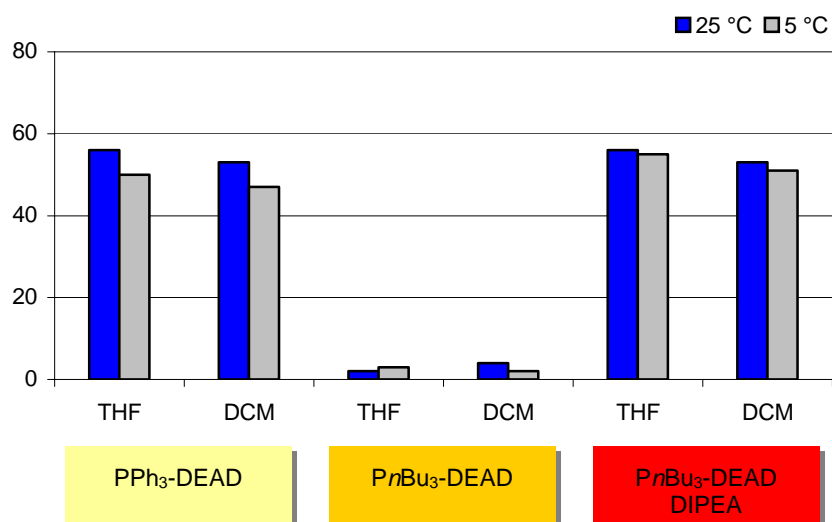
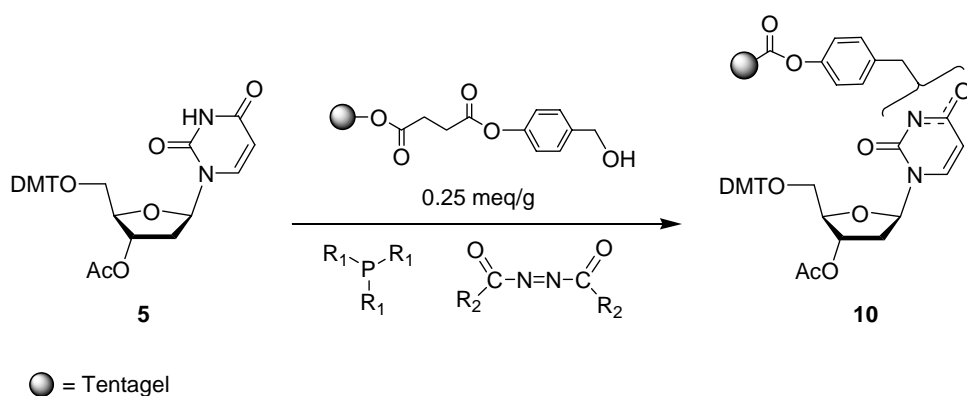


Figura 18. Andamento delle rese di reazione per l'incorporazione in fase solida del nucleoside **5** in funzione dei parametri riportati

2.6 Nuovi supporti solidi ancoranti analoghi dell'AZT

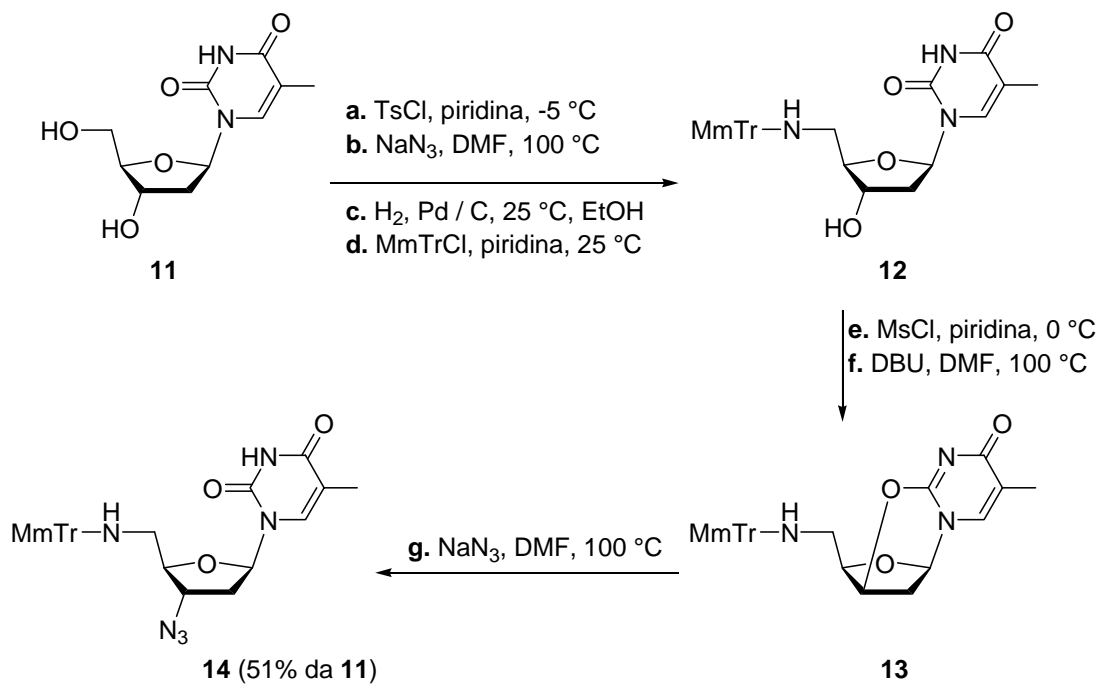
Partendo da tali dati, si è poi proceduto alla realizzazione di un nuovo supporto ancorante un analogo dell'AZT, per la realizzazione di analoghi 5'-modificati dell'AZT. Particolare interesse destano analoghi dell'AZT che recano la posizione 5' già derivatizzata con un gruppo fosfato, opportunamente mascherato come fosforammidato o fosfodiesteri, così da penetrare efficacemente le membrane cellulari e, una volta deprotetto il fosfato ad opera di esterasi, poter sottostare alle successive fosforilazioni a dare il derivato 5'-trifosfato. Tali analoghi, sotto forma di pro-drug, mostrano generalmente maggiore attività e ridotti effetti collaterali, non dovendo subire la conversione da AZT ad AZT-5'-monofosfato, che coinvolge una chinasi ad elevata specificità di substrato. Mediante la nuova strategia di ancoraggio esposta in precedenza, si può avere facile accesso ad un'ampia varietà di nucleosidi modificati; in particolare, è possibile realizzare librerie di derivati 5'-modificati di nucleosidi non aventi funzioni disponibili, sul D-ribosio, per l'ancoraggio alla matrice polimerica come ad esempio, oltre all'AZT, il d4T, la ddC ed altri nucleosidi con attività farmacologia nota.

In tale quadro, facendo riferimento a procedure riportate in letteratura³⁷ è stata sintetizzata la 5'-N-(4-metossitriifenilmetil)-ammino-3'-azidotimidina, da ancorare successivamente al supporto solido.

La sintesi ha previsto, inizialmente, la reazione di tosilazione della posizione 5' della timidina (**11**) e successiva sostituzione nucleofila condotta con NaN_3 (1.5 eq) in DMF (Schema 12).

Successivamente è stata effettuata la riduzione della funzione azidica ad amminica mediante idrogenazione condotta a pressione atmosferica, utilizzando come catalizzatore, (Pd)C in EtOH. La protezione della funzione 5'-amminica, ottenuta per reazione con il MmTrCl (1.3 eq) in presenza di DIPEA (2.0 eq), a 25 °C per 3 ore, ha condotto all'intermedio **12**. Le reazioni successive hanno previsto la reazione della funzione ossidrilica in 3' con cloruro di mesile (1.3 eq) e DIPEA (2.0 eq) in piridina anidra a 25° C per 1 ora e conseguente formazione del derivato 2,3'-anidro mediante reazione con DBU (2.0 eq) in DMF anidra. L'intermedio **13** risulta

un substrato chiave per una sostituzione nucleofila stereospecifica al C-3'. Tale reazione, condotta con NaN₃ (5.0 eq) in DMF a riflusso, ha portato al prodotto atteso **14** in resa complessiva del 51% per sette passaggi.



Schema 12. Sintesi del 5'-MmTr-3'- α -azidotimidina

L'analogo nucleosidico **14** così ottenuto è stato impiegato per una serie di esperimenti di ancoraggio ai supporti polimerici **3** e **4** in diverse condizioni di reazione. Poiché esperimenti condotti a 0 e 25 °C hanno portato a rese di incorporazione del nucleoside medio-basse, è stato ritenuto opportuno condurre la reazione di Mitsunobu a temperature superiori a quella ambiente. Sono state allora effettuate prove in presenza di DIAD e PPh₃ o PBU₃, a ricadere in benzene. Le rese osservate (Figura 19) sono risultate nettamente superiori e paragonabili a quelle ottenute per gli altri analoghi nucleosidici.

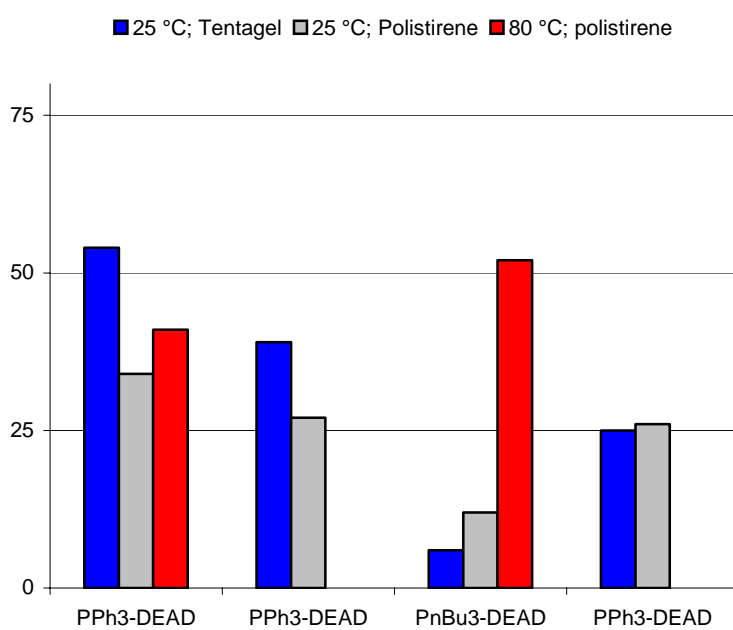
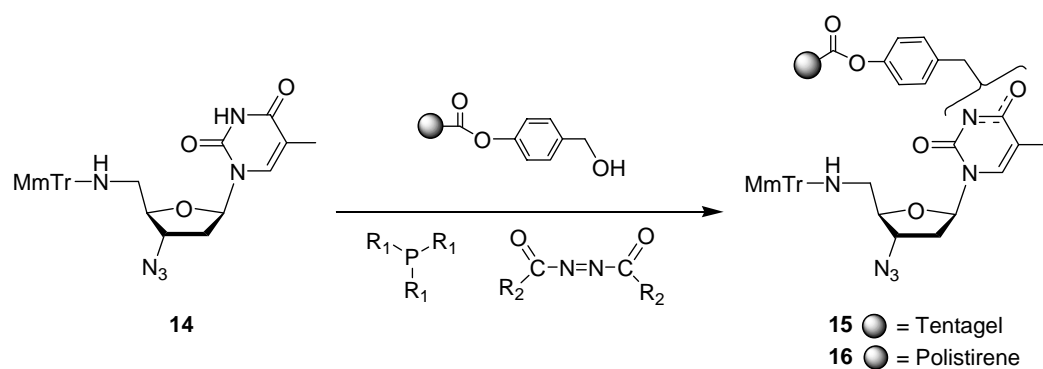
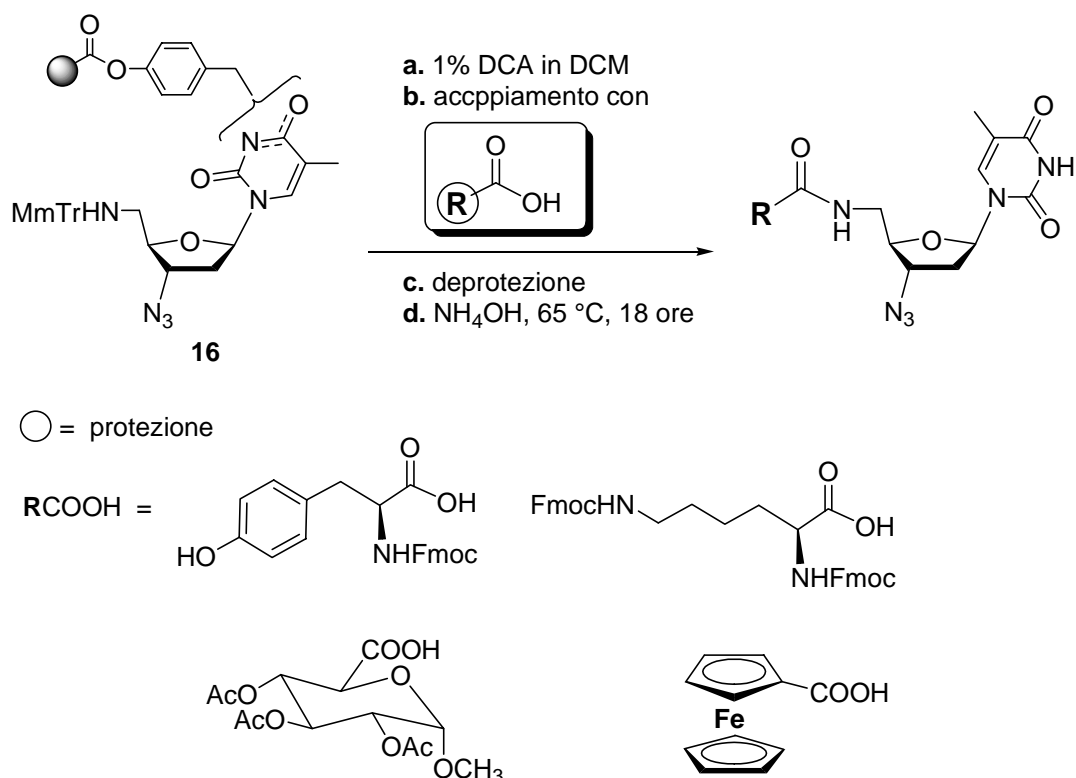


Figura 19. Andamento delle rese di incorporazione del nucleoside **14** sui supporti Tentagel o polistirene in funzione dei parametri riportati

In relazione ad un progetto di più ampio respiro riguardante la sintesi in fase solida di nuovi 5'-modificati dell'AZT, è stata valutata l'efficienza del supporto **16** (Schema 13), attraverso note ed efficienti reazioni in fase solida per la sintesi di nuovi 5'-amminoacilderivati dell'AZT.

A tale scopo il supporto è stato deprotezionato in 5' dal gruppo Mmtr per trattamento con 1% DCA in DCM, e la funzione amminica è stata fatta reagire con vari tipi di acidi carbossilici modello opportunamente protetti.

La reazione di accoppiamento è stata condotta aggiungendo al supporto una miscela di HOBt (10 eq), HATU (10 eq), RCOOH (10 eq) e DIPEA (15 eq) in DMF. Per gli analoghi con la tirosina e la lisina (Schema 13) le rese medie di condensazione, valutate mediante misure spettrofotometriche a $\lambda=301$ nm del gruppo fluorenilo rilasciato per trattamento con una soluzione di piperidina al 20% in DMF, sono risultate in media del 93%.



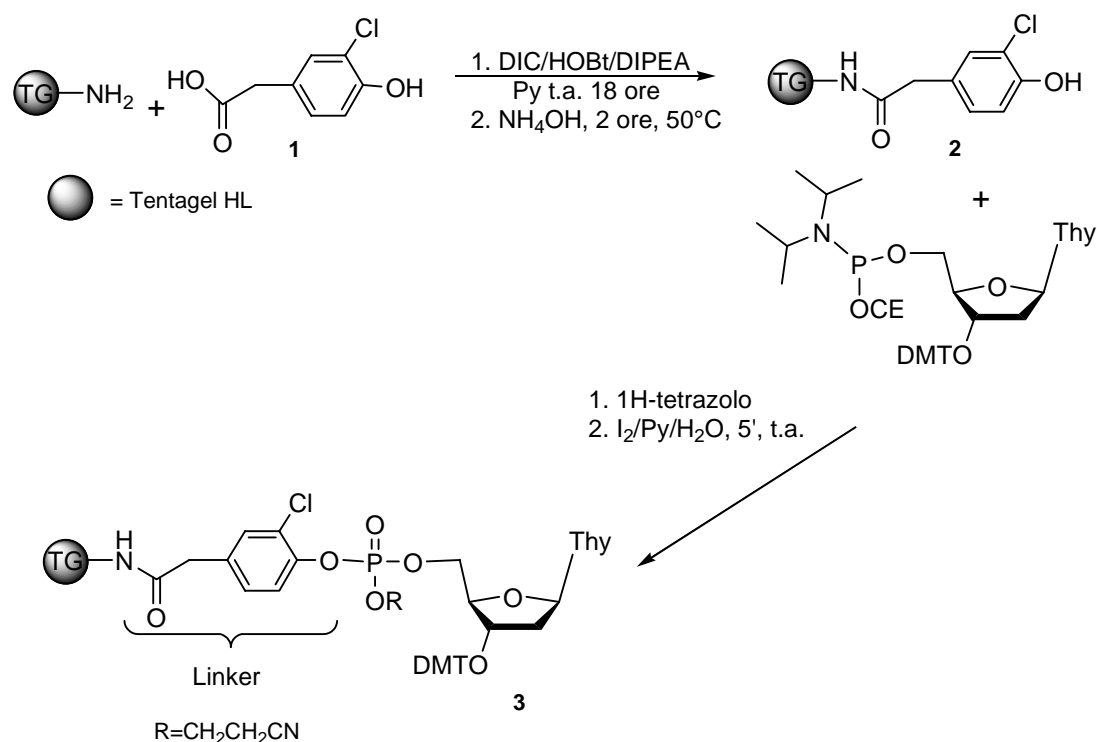
Schema 13. Sintesi di 5'-derivati dell'AZT

Dopo opportuna deprotezione, i supporti sono stati trattati con una soluzione di NH_4OH a 65°C per 18 ore ed i prodotti, dopo purificazione, sono stati caratterizzati per via spettroscopica utilizzando spettri $^1\text{H NMR}$ e ESI-MS.

2.7 Sintesi di nuovi nucleosidi 5'-fosfodiester e 5'-fosforamidato³⁸

Durante il triennio di dottorato è stata messa a punto una semplice ed efficiente strategia sintetica per l'ottenimento di librerie di derivati 5'-fosfodiester e 5'-fosforamidato dei nucleosidi in forma molto pura a partire da un supporto solido opportunamente funzionalizzato con un'unità nucleosidica.

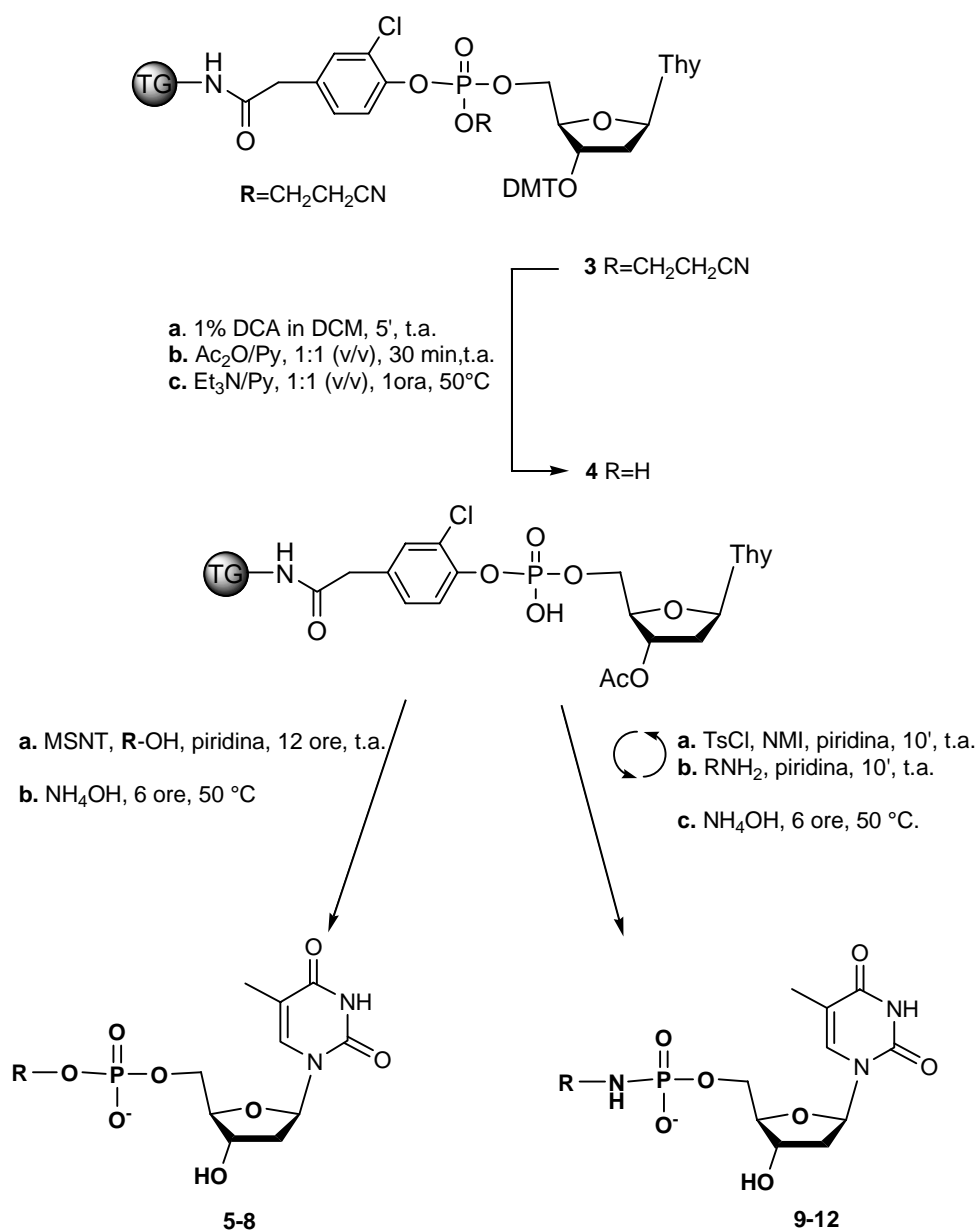
In una fase preliminare di studio, è stato scelto, come nucleoside, un derivato 5'-fosforamidato della timidina da ancorare al supporto mediante classiche metodiche della chimica del fosforamidato.



Schema 14. Sintesi del supporto 3

A tale scopo è stata utilizzata una procedura sintetica simile a quella messa a punto da Pedroso e collaboratori per la sintesi in fase solida di oligonucleotidi ciclici³⁹. Tale strategia prevede l'utilizzo di un supporto solido funzionalizzato con un linker 3-cloro-4-idrossifenilacetico **1** (Schema 14). Il supporto **3** è stato sintetizzato sfruttando prodotti commercialmente disponibili mediante condensazione della resina tentagel ammino (TG-NH₂ HL, 0.41 meq/g) con l'acido 3-cloro-4-idrossifenilacetico (10 eq) in presenza di DIC (10 eq), DIEA (10 eq), HOBt (10 eq) in piridina anidra per 18 ore a t.a. L'efficienza della condensazione, monitorata mediante il test di Kaiser su quantità seccate e pesate del supporto, è risultata pressochè totale. Il supporto così ottenuto ha consentito l'incorporazione dell'unità nucleosidica, agganciata mediante un legame fosfito triestere. La completa ossidazione del fosfito triestere al più stabile legame fosfato è stata ottenuta mediante l'utilizzo della soluzione ossidante convenzionalmente utilizzata per la sintesi degli ODN, ovvero una soluzione di iodio in piridina/THF/acqua, ed è stata monitorata tramite analisi ³¹P-NMR del supporto sospeso in CDCl₃. A seguito dell'ossidazione, il segnale a 135 ppm scompare e parallelamente compaiono due segnali centrati a circa -4 ppm diagnostici di un atomo di P(V) chirale impegnato in un legame fosfodiesterico. La funzionalizzazione del supporto con il nucleoside è stata valutata mediante test spettrofotometrico del catione DMT su una quantità pesata di supporto secco ed è risultata essere sempre superiore a 0.28 meq/g, corrispondente ad una resa di incorporazione pari a circa il 68% (riferita alla funzionalizzazione iniziale della TG-NH₂, prima dell'incorporazione del linker).

Successivamente, il gruppo DMT è stato rimosso per trattamento con una soluzione all'1% di DCA in DCM e le funzioni 3'ossidriliche liberate sono state acetilate utilizzando Ac₂O in piridina (3:7 v/v) per 30 min a t.a. Sulla matrice così ottenuta, un trattamento con trietilammina in piridina (1:1, v/v, 1 ora, 50°C) ha consentito la deprotezione del fosfato e l'ottenimento del supporto **4**. Anche in questo caso l'avvenuta trasformazione da fosfato triestere a fosfato diestere è stata monitorata tramite ³¹P-NMR che ha mostrato la presenza di un unico segnale a -3 ppm circa.

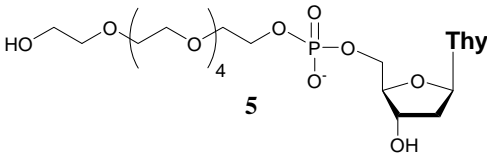
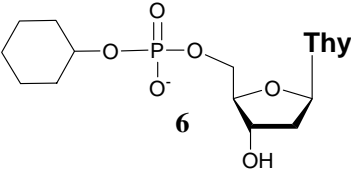
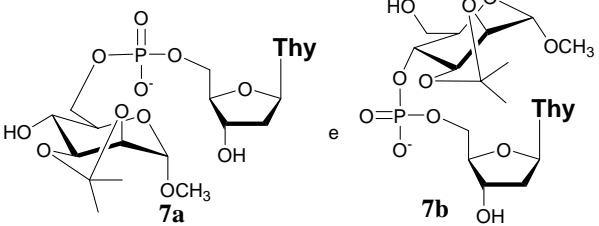
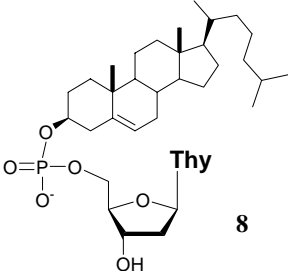


Per valutare l'efficienza del supporto **4** nella sintesi di analoghi 5'-fosforamidato e 5'-fosfodiesteri della timidina, sono stati sfruttati due approcci differenti che utilizzano entrambi le metodiche della chimica del fosfortriestere.

Per ottenere gli analoghi 5'-fosfodiesteri **5-8** (Schema 15 e tabella 2), il supporto **4** è stato trattato con mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazolo (MSNT) e l'alcol scelto in piridina per 12 ore a temperatura ambiente. Il distacco dal supporto dell'analogo

sintetizzato, è stato ottenuto mediante semplice trattamento basico con ammoniaca acquosa per 5 ore a 50°C. Il grezzo distaccato è stato analizzato mediante HPLC usando una colonna in fase inversa (NUCLEOSIL 100-5 C18), che ha in tutti i casi evidenziato la presenza di un solo picco, che integra per circa il 90% dell'area totale (Figura 20). Analisi ^1H e ^{31}P -NMR dei grezzi distaccati hanno confermato la presenza di un unico prodotto in ogni grezzo di reazione.

Tabella 2-Strutture dei derivati 5'-fosfodiesteri sintetizzati con i corrispondenti valori di ^{31}P -NMR e ESI-MS

Prodotto	$\delta^{31}\text{P}$	ESI-MS (m/z)
 <p>5</p>	3.3 ppm	585.50 [M-H] ⁻
 <p>6</p>	2.7 ppm	403.42 [M-H] ⁻
 <p>7a</p> <p>7b</p>	3.5 e 2.7 ppm	537.39 [M-H] ⁻
 <p>8</p>	2.6 ppm	689.78 [M-H] ⁻

La strategia sintetica da noi messa a punto consente l'ottenimento dei prodotti desiderati con purezza molto elevata, in quanto soltanto le specie che sono legate al supporto mediante un legame fosfotriestereo cioè le unità nucleosidiche i cui gruppi fosfato in 5' hanno reagito con l'alcol vengono distaccate per trattamento basico; invece, le specie che sono legate tramite un legame fosfodiesterio che, quindi, non

hanno reagito con il coniugante, non vengono rilasciate dal supporto solido per trattamento basico.

Per confermare ciò, dopo trattamento di distacco, il supporto **4** è stato nuovamente trattato con ammoniaca acquosa a 50 °C per 5 ore; in tal caso, l'analisi $^1\text{H-NMR}$ e UV degli eluati non ha in nessun caso evidenziato la presenza di materiale nucleosidico.

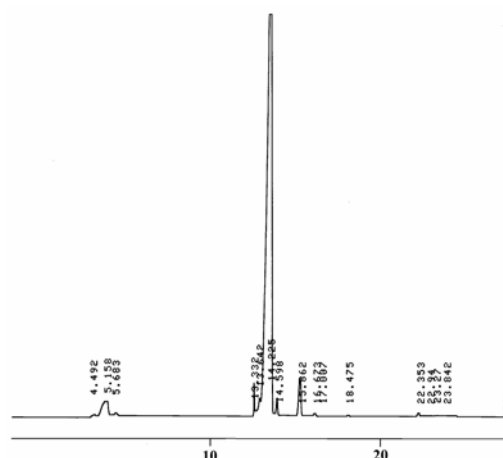


Figura 20 Profilo HPLC del grezzo distaccato **6**

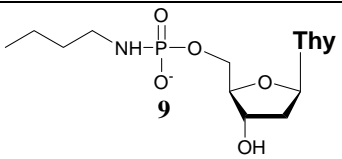
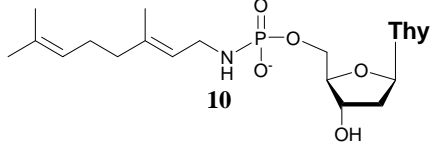
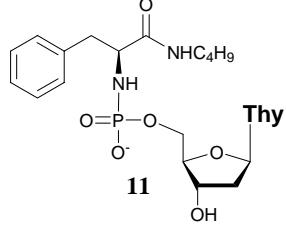
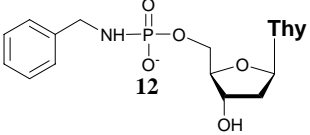
Per preparare i derivati 5'-fosforammidato della timidina **9-12**

(Schema 15 e Tabella 3) è stata seguita una procedura già utilizzata per l'introduzione negli ODN di un legame ammidato⁴⁰. Seguendo tale procedura, il supporto **4** è stato trattato con *p*-tosil cloruro in piridina per 15 minuti e, dopo opportuni lavaggi con piridina anidra, trattato con la ammina scelta disciolta in piridina per ulteriori 15 minuti. Tale procedimento è stato ripetuto tre volte ed ha consentito la conversione dell'80% del diestere iniziale nell'ammidato desiderato. Anche in questo caso, l'avvenuta conversione è stata monitorata mediante analisi $^{31}\text{P-NMR}$ condotta sul supporto sospeso in CDCl_3 . Il distacco dalla matrice è stato condotto con ammoniaca acquosa a 50°C per 5 ore e l'analisi HPLC dei grezzi distaccati ha evidenziato in tutti i casi la presenza di un solo picco che integra per il 90 % dell'area totale.

Le strutture dei prodotti **5-12** sono state determinate mediante analisi ^1H , $^{31}\text{P-NMR}$ ed ESI-MS, condotte direttamente sul materiale distaccato grezzo. Le rese di ottenimento delle specie **5-12** sono state valutate mediante analisi UV quantitativa a 260 nm e sono risultate essere sempre tra il 70 e l'80 % rispetto alla funzionalizzazione iniziale del supporto **4**. In tutti i casi studiati, i nucleosidi 5'-fosfodiesteri e 5'-fosforammidati sono stati isolati dal grezzo distaccato mediante una semplice cromatografia ad esclusione molecolare su colonna Sephadex G25 eluita con $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ 4:1 (v/v), non essendo richiesta una ulteriore purificazione per

HPLC. In un esperimento tipico, a partire da 30 mg di resina funzionalizzata **4** sono stati recuperati in media 2-4 mg del nucleotide desiderato in forma pura.

Tabella 3-Strutture dei derivati 5'-fosforamidato della timidina sintetizzati, con i corrispondenti valori di ^{31}P -NMR e ESI-MS

Prodotto	$\delta^{31}\text{P}$	ESI-MS (m/z)
 <p>9</p>	11.5 ppm	376.34 [M-H] ⁻
 <p>10</p>	11.2 ppm	456.35 [M-H] ⁻
 <p>11</p>	6.6 ppm	523.47 [M-H] ⁻
 <p>12</p>	10.8 ppm	410.26 [M-H] ⁻

Le strutture degli analoghi realizzati, confermate mediante analisi ^1H e ^{31}P -NMR ed ESI-MS sui grezzi distaccati, sono riportate nelle tabelle 2 e 3.

È importante notare che nel caso del derivato **7** si ottengono, come atteso, due prodotti differenti che sono stati identificati come due regioisomeri in cui la posizione 5' della timidina è legata una volta all'OH in 4 ed una volta all'OH in 6 del mannosio.

3. CONCLUSIONI

Durante il triennio di dottorato, la sintesi di nucleosidi e nucleotidi modificati è stata affrontata sfruttando due approcci differenti. In una prima fase del lavoro di ricerca, è stata descritta la sintesi di nuovi supporti solidi funzionalizzati con unità nucleosidiche ancorate attraverso la base eterociclica (**18**, paragrafo 2.2, **30** e **31** paragrafo 2.3). In particolare a partire dal supporto **18** è stato possibile realizzare una serie di piccoli frammenti di acidi nucleici (NAB) dotati di un elevato grado di diversità. Tale supporto è infatti caratterizzato dalla presenza di una funzione amminica mascherata e di due gruppi ossidrilici ortogonalmente protetti che, consentendo un accrescimento tridirezionale dell'oligomero, dà facile accesso sintetico alla realizzazione di interessanti biomolecole.

In una seconda fase di studi, è stata messa a punto la sintesi di supporti solidi funzionalizzati con unità nucleosidiche ancorate attraverso la base eterociclica in cui il distacco dell'analogo non richiede il pretrattamento ossidativo previsto dai supporti **18**, **30**, e **31** (paragrafi 2.2 e 2.3); in particolare partendo dal supporto **16** (paragrafo 2.6) è stato descritto un protocollo che consente una facile ed efficace sintesi in fase solida di nuovi 5'-amminoacilderivati dell'AZT, prodotti non facilmente ottenibili con metodi tradizionali, attraverso note ed efficienti reazioni in fase solida.

Infine sfruttando un supporto solido tipo **4** (paragrafo 2.7) è stata realizzata una piccola libreria di derivati 5'-fosforammidato e 5'-fosfodiesteri della timidina. A questo scopo è stata messa a punto una procedura sintetica semplice ed efficiente che consente l'ottenimento degli analoghi sintetizzati in forma molto pura, in quantità dell'ordine dei milligrammi.

Tutti i metodi descritti si prestano bene, in linea di principio, a realizzare librerie di nucleosidi, nucleotidi ed oligonucleotidi derivatizzati con molecole dalle proprietà chimico-fisiche più svariate, per soddisfare le diverse richieste di modifiche chimiche sulle strutture "naturali" da utilizzarsi in campo analitico, diagnostico, farmacologico.

Bibliografia

- ¹ a) Knapp, S. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1859-1876; b) Huryñ, D.M., Okabe, M. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1745-1768;
- ² Périgaud, C., Gosselin, G., Imbach, J.L. *Nucleosides and Nucleotides*, **1992**, *11*, 903-945;
- ³ a) W.A. Haseltine *Le Scienze* **2002**, *402*, 58-65; b) Ichikawa, E., Kato, K. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *4*, 385-423;
- ⁴ a) Hederwijn, P. *Drug Discov. Today* **1997**, *2*, 235-242; b) Pastor-Anglada, M., Felipe, A., Casado, F.J. *Trends in Pharm. Sc.* **1998**, *19*, 424-430;
- ⁵ Plagemann, P.G.W., Behrens, M., Abraham, D. *Cancer Res.* **1978**, *38*, 2458-2466;
- ⁶ Piskala, P.; Sorn, F. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **1964**, *29*, 2060;
- ⁷ a) Dunn, D.A., Feygin, I. *Drug Discov. Today*, **2000**, *5*, 84-91; b) Umezawa, Y. *Mol. Biotechnol.*, **2002**, *82*, 357-370.
- ⁸ Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 2091-2157.
- ⁹ Gordon, E.M., Barrett, R.W., Dower, W.J., Fodor, S.P.A., Gallop, M.A. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1385-1401;
- ¹⁰ a) Thompson, L.A., Ellman, J.A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555-600; b) Balkenhohl, F., von dem Bussche-Hünnefeld, C., Lansky, A., Zechel, C. *Angew. Chem. Int. Engl.* **1996**, *35*, 2288-2337;
- ¹¹ a) Hermkens, P.H.H.; Ottenheijm, H.C.J., Rees, D. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 4527-4554 b) Kobayashi, S. *Chem. Soc. Rev.* **1999**, *28*, 1-15; c) Guillier, F., Orain, D., Bradley, M. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157;
- ¹² Ellman, J.A., Bunin, B.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10997-10998;
- ¹³ Uhlmann, E.; Peyman, A. *Chem. Rev.*, **1990**, *90*, 543-584.
- ¹⁴ Thuong, N. T.; Hélène, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1993**, *32*, 666-690.
- ¹⁵ Pathak, T. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1623-1667;
- ¹⁶ Ichikawa, I., Kato, K. *Synthesis*, **2002**, *1*, 1-28;
- ¹⁷ Chamorro, C., Pérez-Pérez, M.-J., Rodriguez-Barrios, F., Gabo, F., De Clercq E., Balzarini, J., San-Félix, A., Camarosa, M.-J. *Antiviral Research* **2001**, *50*, 207-222;
- ¹⁸ si veda per esempio: a) Singh, S., Parmar, V., Wengel, J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *42*, 7619-7622; b) Zhou, W., Roland, A., Jin, Y., Iyer, R. P. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 441-445; c) Adlington, R., Baldwin, J., Pritchard, G., Spencer, K. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 575-578; d) Zhou, W., Upendran, S., Roland, A., Jin, Y., Iyer, R.P. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 1249-1252; e) Bozzoli, A., Kazmiersky, W., Kennedy, G., Pasquarello, A., Pecunioso, A. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 2759-2763; f) Bressi, J.C., Choe, J., Hough, M.T., Bukner, F.S., Van Voorhis, W.C., Verlinde, C.L. M., Hol, W.G.J., Gelb, M.H. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4135-4150; g) Jin, Y., Roland, A., Zhou, W., Fauchon, M., Lyaku, J., Iyer, R.P. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 1921-1925; h) Jin, Y., Chen, X., Côte, M.-E., Roland, A., Korba, B., Mounir, S., Iyer, R.P. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2057-2060; i) Dondoni, A., Massi, A., Sabbatini, S. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4495-4497; e riferimenti ivi citati;
- ¹⁹ Epple, R., Kurdirka, R., Greenberg, W.A. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 292-310;
- ²⁰ Suda, A., Ohta, A., Sudoh, M., Tsukuda, T., Shimma, N. *Heterocycles* **2001**, *55*, 1023-1028;

-
- ²¹ Bozzoli, A., Kazmiersky, W., Kennedy, G., Pasquarello, A., Pecunioso, A. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 2759-2763;
- ²² Jin, Y., Roland, A., Zhou, W., Fauchon, M., Lyaku, J., Iyer, R.P. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 1921-1925;
- ²³ Wagner, C.R., et al *Med. Res. Rew.*, **2000**, *20*, 417-451;
- ²⁴ a) Iyer, V.V. et al, *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 2266-2274; b) Wagner, R. et al., *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4569-4575; McGuigan, C., et al., *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 4122-4128;
- ²⁵ McGuigan, C. et al., *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2000**, *44*, 173-177;
- ²⁶ Velázquez, S. et al. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 5188-5196;
- ²⁷ De Napoli, L., Messere, A., Montesarchio, D, Pepe, A., Piccialli, G, Varra, M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 9024-9030; e riferimenti ivi citati;
- ²⁸ de Champdore', M., De Napoli, L., Di Fabio, G., Messere, A., Montesarchio, D., Piccialli, G. *Chem. Commun.* **2001**, *24*, 2598-2599;
- ²⁹ Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1-28;
- ³⁰ Un supporto CPG (palline di vetro poroso), funzionalizzato con un linker β -idrossietiltioetereo, analogo al supporto **1**, è disponibile anche commercialmente ma con funzionalizzazione troppo bassa (0.05 meq di gruppi OH disponibili per grammo di resina) per i nostri scopi e con la funzione tioeterea già ossidata a solfonica. Tale supporto si è rivelato non adeguato all'ancoraggio dei nucleosidi **4** e **5** mediante reazione di Mitsunobu (rese <5%);
- ³¹ De Napoli, L., Di Fabio, G., D'Onofrio, J., Montesarchio, D. *Synlett*, **2004**, *11*, 1975-1979;
- ³² si veda per esempio: a) Young, N.C., Fox, J.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 3060-3066; b) Verheyden, J.P.H., Wagner, D., Moffat, G.J. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 250-254; c) Hakimelahi, G.H., Proba, Z.A., Ogilvie, K.K. *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1106-1113; d) Pankiewicz, K.W., Watanabe, K.A. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 4498-4502; e) Lim, J., Choo, D.J., Kim, Y.H. *Chem. Commun.*, **2000**, 553-554;
- ³³ Sharma, R. A. et al. *J. Med. Chem.*, **1975**, *18*, 955-957;
- ³⁴ Townsend, L. B., in *Nucleoside analogues: Chemistry, Biology and Medical Applications*, ed. R. T. Walker, E. De Clercq and F. Eckstein, Plenum Press, New York, **1979**, 193-223.
- ³⁵ Roland, A., Xiao, Y., Jin, Y., Iyer, R. P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3669-3672;
- ³⁶ a) Zaragoza, F., Stephensen, H. *Tetrahedron. Lett.* **2000**, *41*, 2015-2017; b) Zaragoza, F., Stephensen, H. *Tetrahedron.Lett.* **2000**, *41*, 1841-1844; c) Greenlee, M.L., Laub, J.B., Balkovec, J.M., Hammond, M.L., Hammond, G.G., Pompliano, D.L., Epstein-Toney, J.H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2549-2554; d) Cabrele, C., Langer, M., Beck-Sickinger, A.G. *J. Org.. Chem.* **1999**, *64*, 4353-4361; e) Rano, T., Chapman, K.T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *36*, 3792-3792; f) Richter, L.S., Gadek, T. R. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4705-4706; g) Tsunoda, T., Yamamiya, Y., Itô, S. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1639-1642;
- ³⁷ Hu, X., Tierney, M., T., Grinstaff, M., W. *Bioconjugate Chem.*, **2002**, *13*, 83-89;
- ³⁸ De Napoli, L., Di Fabio, G., D'Onofrio, J., Montesarchio, D. *Chem. Commun.*, **2005**, 2586-2588;
- ³⁹ Alazzouzi, E. M., Escaja, N., Grandas, A., Pedroso, E. *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1997**, *36*, 1506-1508;

⁴⁰ Davis, P.W., Osgood, S.A. *Bioorg. Med. Chem Lett.*, **1999**, 9, 2691;

CAPITOLO 2

SINTESI IN FASE SOLIDA DI OLIGONUCLEOTIDI CONIUGATI

1. INTRODUZIONE

1.1. Oligonucleotidi Modificati

Le interazioni di tipo Watson-Crick delle basi eterocicliche svolgono un ruolo assolutamente cruciale nei processi molecolari degli organismi viventi. Questo meccanismo di riconoscimento altamente specifico è fondamentale per l'evento che definisce la vita stessa: la conservazione, trasmissione e traduzione dell'informazione genetica. La semplicità di questi legami idrogeno e il numero molto limitato di basi coinvolte consentono di prevedere facilmente le interazioni tra gli acidi nucleici, a differenza di quanto si riscontra generalmente con le altre molecole biologiche. Il riconoscimento fra basi puriniche o pirimidiniche complementari mediante formazione di legami idrogeno è operativo anche per oligonucleotidi più corti, che sono comunque considerate come molecole informative, in quanto contengono frammenti del codice genetico.

Piccoli frammenti di acidi nucleici possono risultare utili modelli per studiare le proprietà fisiche e biologiche di DNA ed RNA; infatti, a causa del numero limitato di basi coinvolte, gli oligonucleotidi possono contenere un ampio spettro di gruppi funzionali ed esibire un comportamento del tutto analogo a quello degli acidi nucleici.

Gli oligonucleotidi sono utilizzati ampiamente in biologia molecolare come linker o probe in esperimenti di sequenziamento, mutazioni genetiche, ecc.

Oltre che per analisi genetiche, gli oligonucleotidi sono anche interessanti agenti terapeutici in strategie antisense e antigene. Durante il fenomeno della trascrizione, ogni gene funge da stampo per molteplici copie di RNA messaggero (mRNA), che

viene poi trasformato in un discreto numero di proteine. Esistono alcuni farmaci attualmente sul mercato la cui attività è basata sull'interazione diretta con il DNA. Molte di queste molecole, utilizzate essenzialmente in chemioterapia, si legano specificamente soltanto al DNA.

La scoperta, ad opera di Zamenick e Stephenson¹, più di venti anni fa, dell'inibizione dell'espressione genica ad opera di oligonucleotidi sintetici, ha posto le basi della strategia antisenso² come potenziale approccio terapeutico selettivo, altamente efficace ed, in linea di principio, utilizzabile universalmente.

Tale approccio è basato sull'utilizzo di un oligonucleotide sintetico, o di un suo analogo, complementare ad una particolare sequenza di mRNA. La formazione di una duplex di tipo Watson-Crick stabile con il target blocca il trasferimento di informazione genetica tra il DNA e le proteine inibendo, quindi, la sintesi proteica (Figura 1).

E' stato dimostrato che l'inibizione può avvenire secondo due meccanismi a seconda di quale porzione dell'mRNA è scelta come target. I due meccanismi più comuni sono basati sul diretto blocco della traduzione condotto dall'oligonucleotide antisenso, oppure sull'attivazione di un enzima cellulare, quale ad esempio l'RNasiH o l'RNasiL che, riconoscendo le duplex ibride DNA-RNA, degradano rapidamente l'mRNA in corrispondenza del sito di formazione della duplex.

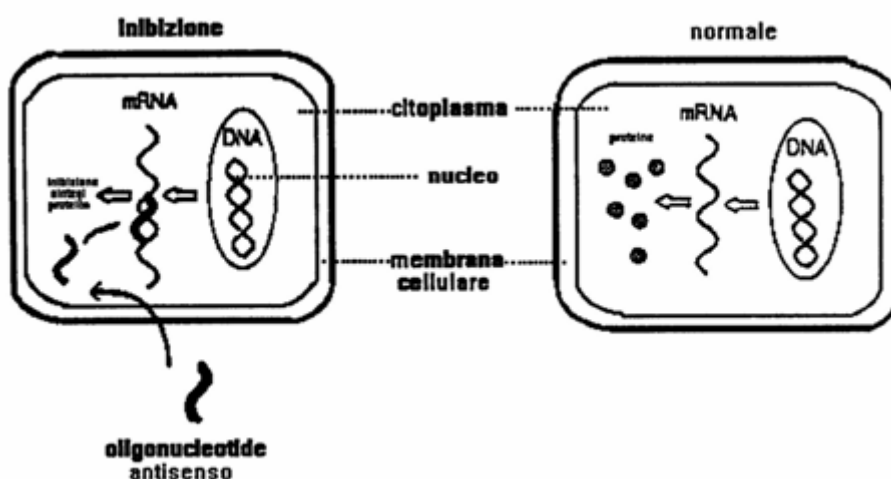


Figura 1 Strategia antisenso

La strategia antisenso, oltre a rivelarsi uno strumento importante in tecniche di manipolazione dell'espressione genica e per studi sulle funzioni delle proteine, è stata proposta con successo come utile approccio farmacologico, diretto in linea di principio contro qualsiasi virus o oncogene del cui DNA sia nota la sequenza in basi. Per essere efficaci in vivo, gli oligonucleotidi antisenso devono possedere le seguenti caratteristiche:

- Elevata affinità e specificità di un oligonucleotide all'mRNA scelto come target;
- Biodisponibilità: ovvero rapida ed efficiente capacità di attraversamento delle membrane cellulari e nucleari;
- Biostabilità: ovvero incrementata stabilità di un oligonucleotide analogo alle nucleasi cellulari;
- Minimizzazione della tossicità, immunogenicità, e attività non antisenso che deriva da un legame aspecifico con gli elementi della matrice cellulare;
- Possibilità di produzione su scala industriale di molecole ad un prezzo concorrenziale;

I notevoli sforzi condotti negli ultimi dieci anni nella ricerca di analoghi oligonucleotidici³ che abbiano le caratteristiche sopra riportate hanno evidenziato i limiti delle metodologie sintetiche così come le difficoltà di comprensione del comportamento in vivo degli oligonucleotidi stessi.

Il primo grosso successo della strategia antisenso si è avuto solo nel 1998, quando la FDA ha approvato il VitraveneTM, un oligonucleotide di 22 basi con legami fosforotioato, come farmaco per il trattamento di retinite indotta da citomegalovirus (CMV). Attualmente circa una decina di nuovi oligonucleotidi antisenso sono in fase avanzata (fase II/ fase III) di sperimentazione clinica. Fra questi ritroviamo oligonucleotidi modificati “di prima generazione” caratterizzati da legami internucleosidici di tipo fosforotioato, che attivano le RNAsiH; oppure oligonucleotidi antisenso di seconda generazione⁴, costituiti da ribooligonucleotidi 2'O-modificati; oppure i cosiddetti “gap-meri” costituiti da nucleotidi RNA 2'O-modificati all'estremità della catena e da un core di DNA non modificato o fosforotioato, che è responsabile dell'attivazione dell'RNasiH.

Con lo scopo di migliorare l'affinità degli oligonucleotidi nei confronti dell'mRNA target, sono state proposte numerose modificazioni allo scheletro a livello dei legami fosfodiesterici, all'unità zuccherina e alle basi etocicliche. Si conta che le modificazioni descritte in letteratura fino ad oggi sono più di un migliaio (di cui 200 studiate dalla ISIS/Novartis⁵ dal 1997 in poi) e di queste molecole solo alcune mostrano un'aumentata affinità di legame nei confronti del DNA o RNA target che sia indipendente dalla sequenza.

Questo aspetto, associato alla rapida degradazione cui sono sottoposti gli ODN ad opera di enzimi eso- ed endonucleasici, alla citotossicità e all'effetto antiproliferativo esercitato dai prodotti di degradazione, ha prodotto negli ultimi anni un notevole scoraggiamento in questo ambito di ricerca, anche considerato il fatto che non è possibile prevedere l'effetto della modifica di un'unica unità nucleotidica sul comportamento globale dell'intero oligomero.

Tale problematica è del tutto analoga a quella della determinazione della struttura terziaria delle proteine, per cui non è possibile prevedere l'effetto di una modifica puntuale, a livello di uno o pochi amminoacidi, sulla struttura complessiva del polimero.

Un possibile modo per ricavare informazioni circa la struttura intrinseca e le proprietà funzionali di DNA ed RNA, e quindi di conoscere le relazioni esistenti tra struttura monomerica e proprietà di un oligonucleotide, consiste nel preparare, analizzare e confrontare tra loro differenti strutture alternative.

Questa procedura ha preso inizio dagli studi di Eshenmoser su esopiranosil-, pentapiranosil-, e tetrafuranosil-DNA⁶ per definire l'eziologia chimica della struttura degli acidi nucleici.

Benché questi studi siano volti a comprendere perché la natura abbia scelto proprio il DNA e l'RNA come molecole depositarie dell'informazione genetica, i risultati così acquisiti hanno notevolmente influenzato il design di nuovi analoghi del DNA coniugati con carboidrati. In particolare il concetto di restrizione conformazionale dei nucleosidi, quale strumento per un'efficace pre-organizzazione del singolo filamento di DNA per la formazione della duplex, è una diretta conseguenza degli studi sugli homo-DNA e ha portato alla progettazione di nuovi

analoghi del DNA come i tricyclo-DNA⁷, gli HNA⁸, o gli LNA⁹ dotati di elevate efficienze di binding nei confronti degli RNA.

1.2. Strategie per il design di nuovi farmaci antisenso

Recentemente, sono state messe a punto due strategie per il design di nuovi farmaci antisenso: il “RNase-H mapping”¹⁰ e lo scanning di librerie di oligonucleotidi¹¹.

Il “RNase-H mapping” si basa sul principio che l’RNasi-H è in grado di riconoscere e degradare selettivamente il filamento di RNA di una eteroduplex DNA/RNA. Ulteriori informazioni sono, poi, ottenute combinando l’mRNA target con una libreria casuale di oligonucleotidi ed analizzando i frammenti di degradazione. Il sequenziamento di tali frammenti evidenzia quali sono i siti per il target degli ODN. Questa strategia è stata utilizzata per individuare molecole antisenso attive contro l’RNA del virus dell’epatite C e contro alcuni geni umani resistenti ad altre malattie.

La seconda strategia consiste nello studiare librerie combinatoriali di oligonucleotidi per la determinazione di molecole attive contro RNA modificati. Utilizzando le usuali tecniche della sintesi in fase solida e la chimica del fosforamidito è stato possibile sintetizzare una vasta libreria di ODN modificati. Mediante un RNA target radiomarcato, in grado di ibridizzare le sequenze della libreria, è possibile identificare le sequenze attive. Questo approccio è efficiente ma anche lungo e laborioso, e tipicamente solo una piccola regione dell’RNA è analizzabile. E’ possibile combinare le due metodologie appena descritte e utilizzare “l’RNasiH mapping” per individuare quale regione dell’RNA studiare e poi sintetizzare una libreria combinatoriale di analoghi per identificare precisamente la sequenza antisenso attiva.¹²

Gli oligonucleotidi analoghi sono stati progettati per modulare specificamente il trasferimento dell’informazione genetica alle proteine, ma il meccanismo con cui un oligonucleotide può provocare un effetto biologico è alquanto complesso.

In relazione al loro meccanismo di azione si possono individuare due classi di oligonucleotidi:

- Oligonucleotidi che attivano l'RNasi-H, che inducono la degradazione irreversibile dell'mRNA;
- Oligonucleotidi che mostrano attività antisense per effetto di semplice inibizione fisica dei processi di traduzione ("steric blocker").

La maggior parte degli oligonucleotidi studiati quali farmaci antisense sono del primo tipo: l'RNasi H è un enzima ubiquitario che idrolizza il tratto di RNA di una duplex DNA/RNA. Al contrario degli oligonucleotidi "steric blocker", quelli RNasi-H dipendenti possono inibire l'espressione delle proteine quando sono legati ad una qualsiasi regione dell'mRNA.

Perché un oligonucleotide inibisca l'espressione genica, è necessario che penetri all'interno delle cellule; l'"uptake" degli oligonucleotidi può avvenire mediante trasporto attivo, in dipendenza della temperatura, della struttura e concentrazione dell'oligonucleotide e della linea cellulare contro cui è diretto. Attualmente, si ritiene che i principali meccanismi di internalizzazione di oligonucleotidi siano l'endocitosi, per assorbimento, e la pinocitosi, in fase fluida e che la percentuale di internalizzazione dipenda dalla concentrazione dell'oligonucleotide. A concentrazioni relativamente basse l'internalizzazione avviene per mezzo di una interazione con un recettore di membrana; a concentrazioni relativamente elevate, questi recettori sono saturati e il processo pinocitotico assume maggiore importanza^{2a}.

1.3. Sintesi di oligonucleotidi coniugati

Il crescente interesse rivolto agli oligonucleotidi è stato stimolato dai notevoli sviluppi ottenuti nell'ambito della sintesi chimica, che ha reso possibile anche l'ottenimento di un numero molto ampio di oligonucleotidi coniugati¹³.

Non tutte le modifiche sono classificabili come "coniugazioni"; un coniugato è il risultato dell'unione mediante legami covalenti stabili di due o più molecole e mantiene le caratteristiche di entrambe. Un esempio è la coniugazione di un

oligonucleotide con un probe fluorescente a dare un oligonucleotide fluorescente. I coniugati possono essere progettati in modo da migliorare alcune caratteristiche proprie degli oligonucleotidi, come ad esempio la capacità di ibridizzazione e l'uptake" cellulare; più spesso gli oligonucleotidi, pur mantenendo le loro capacità di riconoscimento delle basi, sono dotati di nuove proprietà sia chimiche che fisiche.

Le molecole più frequentemente coniugate agli oligonucleotidi si possono dividere in tre principale categorie:

- Gruppi chimicamente reattivi sono introdotti per studiarne le interazioni con gli acidi nucleici perchè possono scindere o modificare l'oligonucleotide ad un particolare sito e creare in questo modo nuovi agenti terapeutici;
- Gruppi fluorescenti; questi sono usati come probe non radiattivi;
- Gruppi che promuovano le interazioni intermolecolari: alcuni esempi sono rappresentati dagli agenti intercalanti, utilizzati per migliorare le proprietà di ibridizzazione dell'oligonucleotide con il filamento complementare.

Le prime sintesi di oligomeri bioconiugati¹⁴ venivano condotte in soluzione; oggi, invece, la maggior parte di questi oligomeri è preparato o interamente in fase solida, oppure il gruppo coniugante è introdotto, mediante coniugazione in soluzione, dopo il distacco dell'oligomero assemblato sul supporto solido. Poiché, però, la sintesi dell'oligomero viene comunque condotta in fase solida, è più semplice progettare un metodo che consenta anche l'aggancio del coniugante in fase solida. Il principale vantaggio della sintesi in fase solida, come già accennato in precedenza, risiede soprattutto in procedure di purificazione molto meno complesse; infatti molti sottoprodotti sono eliminati con semplici lavaggi del supporto, e, dopo rilascio in soluzione dell'oligomero, è richiesta un'unica purificazione cromatografica. Viceversa per coniugazioni condotte in soluzione, il polimero deve essere purificato sia prima che dopo la coniugazione.

Un'agevole purificazione diventa fondamentale quando si preparano coniugati che consistono di due frammenti di biopolimeri.

Un altro significativo vantaggio consiste nel fatto che le procedure sintetiche sono, in linea di principio, completamente automatizzabili, consentendo la sintesi parallela di librerie di oligomeri coniugati.

In via del tutto generale, la sintesi in fase solida di oligonucleotidi può essere effettuata utilizzando due diverse strategie: chimica del fosforammidito (via a, Figura 2) e dell'H-fosfonato (via b, Figura 2). In entrambe le strategie, l'allungamento della catena è condotto mediante reazione di un appropriato building block, in forma di derivato nucleosidico 3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforammidito) o 3'-(H-fosfonato) opportunamente protetto all'ossidrile in 5' dell'oligonucleotide in crescita, che è ancorato al supporto mediante la posizione 3'.

Uno degli obiettivi principali perseguiti con la coniugazione di oligonucleotidi è di aumentare l'"uptake" cellulare. A questo scopo, si può coniugare l'oligonucleotide con un'altra molecola nota per le sue capacità di penetrare o di interagire con le membrane cellulari. Tali molecole includono composti lipofili, colesterolo¹⁵, lipidi¹⁶, idrocarburi a catena lunga, acido colico e folico; oppure coniugati con la spermina, omopolimeri come il polietilen glicole¹⁷ e una varietà di peptidi¹⁸. Altri tipi di molecole sono stati coniugati agli acidi nucleici per ottenere specie utili per il sequenziamento degli ODN¹⁹ o per aumentare le capacità di legame agli acidi nucleici.

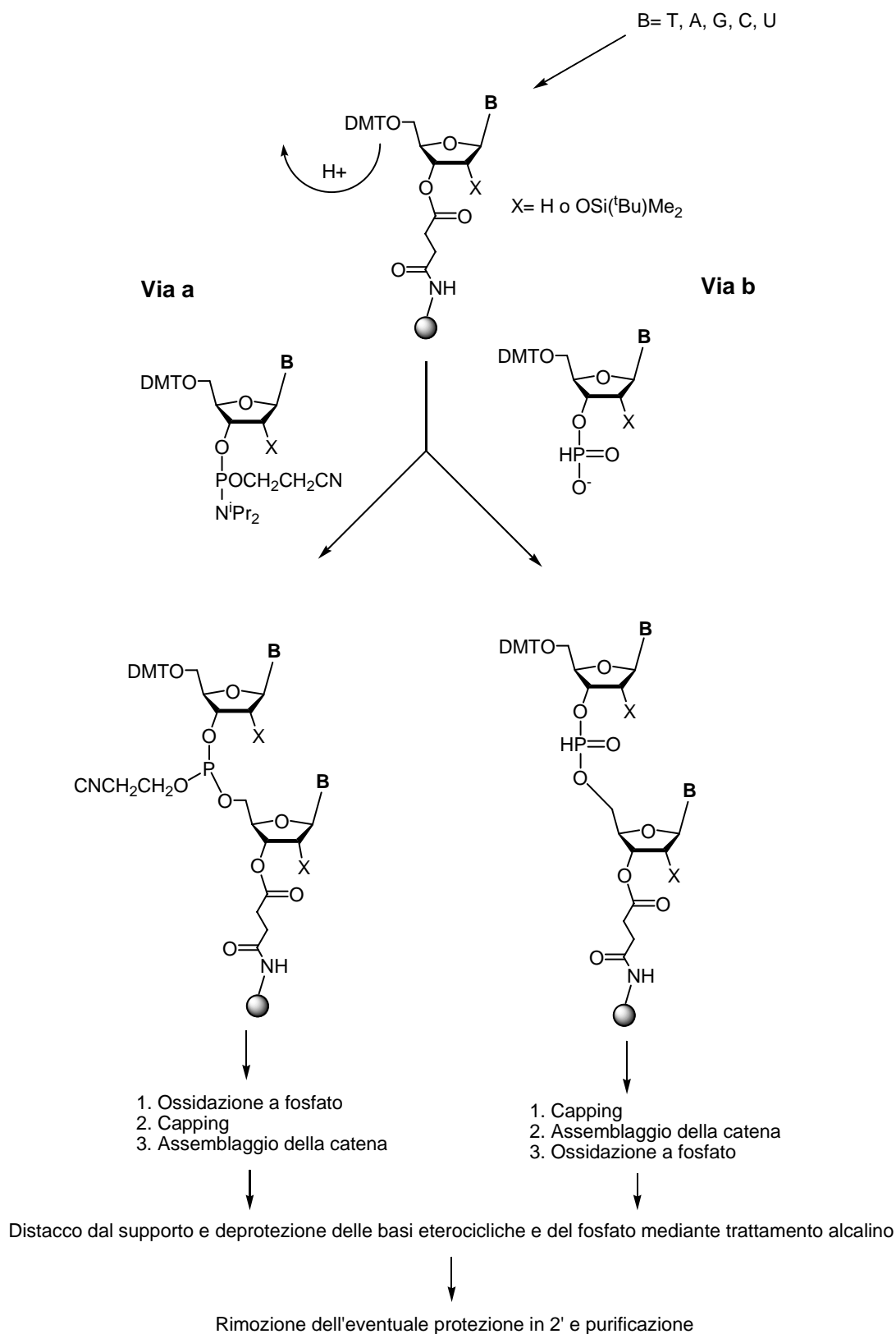


Figura 2 Sintesi in fase solida di ODN mediante metodi del fosforamidito (via a) e dell'H-fosfonato (via b)

1.4 Oligonucleotidi coniugati all'estremità 5'

Generalmente le coniugazioni sono condotte in posizione terminale (sia 3' che 5') per impedire interferenze con la capacità di ibridizzazione delle sequenze oligonucleotidiche.

Poiché l'assemblaggio della catena oligonucleotidica è condotto in direzione 3'→5', la coniugazione di un gruppo in posizione 5' risulta generalmente abbastanza semplice.

Infatti è possibile funzionalizzare gli ODN all'estremità 5' sia attraverso un appropriato linker amminico¹⁵ oppure introducendo il coniugante, precedentemente derivatizzato sotto forma di composto fosforamidito o H-fosfonato durante o alla fine dell'assemblaggio dell'intero oligomero²⁰ (Figura 3).

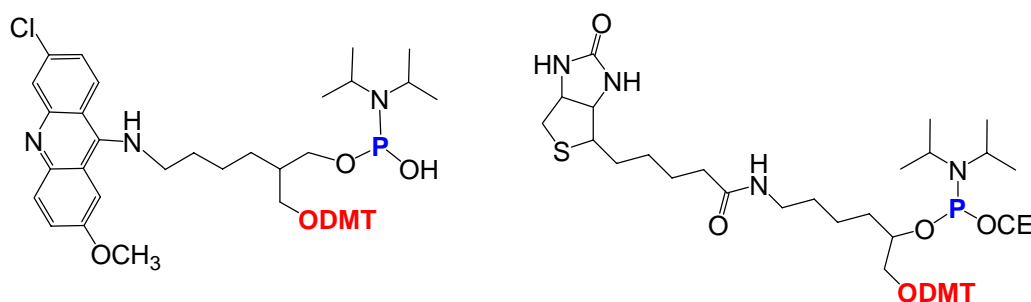


Figura 3 Alcuni esempi di molecole opportunamente derivatizzate per la coniugazione in 5'

Utilizzando il metodo del fosforamidito, sono stati introdotti probe fluorescenti, ligandi per metalli, probe redox, molecole intercalanti, dieni e biotina²¹; invece seguendo il metodo dell'H-fosfonato, sono stati introdotti lipidi e porfirine²². Nonostante questa metodologia risulti molto semplice, soffre dell'importante limite di dover trasformare ogni coniugante nel derivato fosforamidito o H-fosfonato prima di poterlo utilizzare inoltre, la coniugazione in 5' in generale, impedisce la marcatura con ³²P dell'ODN mediante fosforilazione diretta in 5'.

Una strategia più versatile per la coniugazione in 5' consiste nell'introdurre, mediante fosforamidito o H-fosfonato, un gruppo nucleofilo o elettrofilo mascherato che, una volta deprotetto, consenta la coniugazione. Tra i nucleofili, i più comuni risultano essere le ammine, facilmente introdotte mediante linkers

fosforammidito e il gruppo SH; infatti numerosi reagenti fosforammidito²³ o H-fosfonato sono stati descritti per l'introduzione di un gruppo 5'-mercaptoalchilico.

Altri nucleofili utilizzati sono gli alcoli che vengono introdotti mediante fosfitilazione dell'OH 5' dell'oligonucleotide e successiva alcolisi del derivato fosforammidito a fosfito triestere. A questo punto, l'ossidazione e la rimozione del gruppo 2-cianoetile, consentono la formazione di un coniugato legato mediante un ponte fosfodiesterico²⁴.

1.5 Oligonucleotidi coniugati all'estremità 3'

La coniugazione all'estremità 3' risulta molto più importante di quella in 5'; essa consente la marcatura degli ODN con ³²P ma soprattutto protegge significativamente l'ODN dall'attacco degli enzimi 3'-esonucleasici che sono le nucleasi più abbondanti nelle cellule e nei sieri biologici. Dal punto di vista strettamente sintetico, la preparazione di 3' coniugati è molto più complessa. Sono stati proposti numerosi metodi per la coniugazione in 3'²⁵ e molti di questi prevedono un protocollo di coniugazione post-sintesi dell'ODN. Poiché l'assemblaggio degli oligonucleotidi procede in direzione 3'→5', molti dei metodi proposti hanno previsto lo sviluppo di speciali linker bi o trifunzionali a ponte fra il supporto solido e la posizione 3' del primo residuo oligonucleotidico. Dopo assemblaggio della catena oligonucleotidica, il distacco dell'ODN dal supporto comporta la liberazione di un gruppo funzionale a cui il coniugante scelto viene, poi, legato. La funzione a tale scopo più comunemente utilizzata è un'ammina o un tiolo.

Utilizzando questo approccio sono stati sintetizzati numerosi oligonucleotidi coniugati in 3' con biotina, fluoresceina e frammenti peptidici: il gruppo Fmoc è rimosso per trattamento con piperidina in DMF e la funzione amminica risultante è disponibile per reazioni di condensazione con un acido carbossilico. Una volta realizzato l'aggancio del coniugante, si procede con la normale sintesi dell'oligonucleotide²¹.

Linker lineari sono utili in un approccio di coniugazione post-sintesi dell'ODN una volta che questo sia stato distaccato dal supporto.

In altri casi, un linker per l'estremità 3' più generale è costituito da un gruppo ramificato in cui una funzione opportunamente protetta è presente sulla catena laterale; un linker di tale natura dovrebbe consentire:

- L'introduzione della molecola coniugante prima dell'assemblaggio dell'ODN (approccio *pre-sintesi*);
- L'assemblaggio dapprima dell'ODN e poi la coniugazione *post-sintesi* dopo il rilascio della specie in soluzione;
- La sintesi totalmente in fase solida del coniugato in un approccio *post-sintesi*; infatti, la funzione introdotta in catena laterale può servire come legame con il supporto per la sintesi in fase solida dell'oligomero e successivamente per l'introduzione del coniugante, sia esso un peptide o un'altra molecola, prima del rilascio dell'ODN dal supporto.

Esempi di linker ramificati sono mostrati in Figura 4.

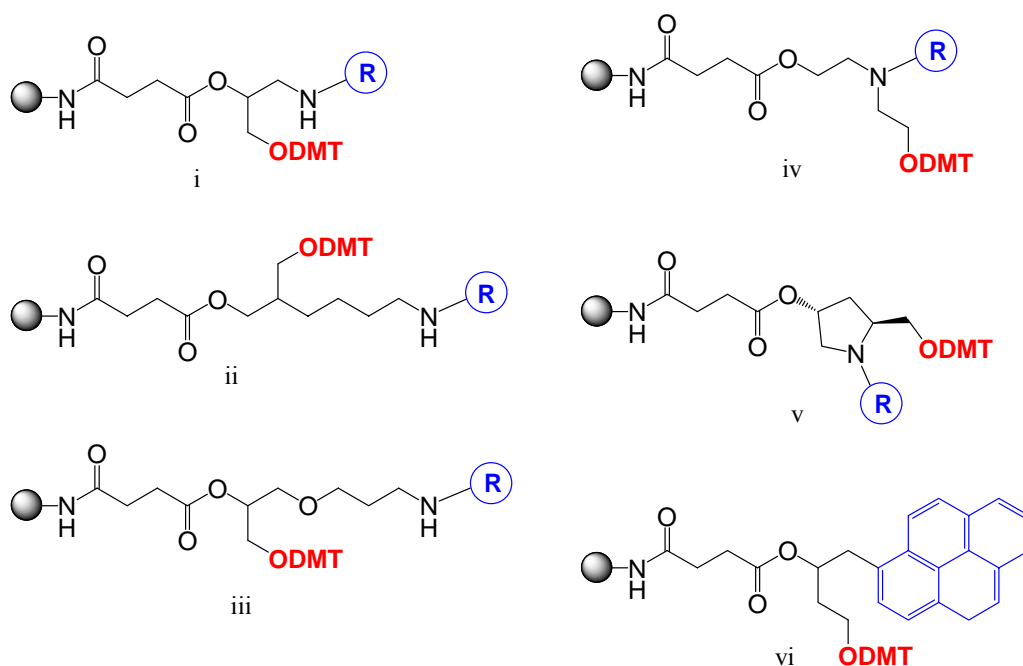


Figura 4 Esempi di supporti funzionalizzati con linkers ramificati per la coniugazione in 3' degli ODN

I linker ramificati più comunemente utilizzati sono basati su 3-ammino-1,2-propan diolo²⁶ (i figura 4) o 3-amminobutil-1,3-propan diolo²⁷ (ii, Figura 4); come

varianti sono stati utilizzati il 3-ammino-glicerolo per la preparazione di ODN coniugati con la fluoresceina²⁸ (iii, Figura 4); ancora un coniugato con il pirene è stato sintetizzato sfruttando un linker 1,3-propandioloico. Tutte queste specie, però, introducono chiralità al punto di aggancio del linker; specie alternative che siano achirali sono note in letteratura. Ad esempio, la dietanolamina è stata proposta per la sintesi del coniugato con l'antrachinone (iv, Figura 4); in questo caso il coniugante è legato all'ammina secondaria²⁹. Tutte queste specie proposte, per quanto utili e funzionali alla preparazione di ODN coniugati, richiedono in ogni caso particolari derivatizzazioni per la sintesi del linker e la sua introduzione nel supporto solido e non sempre sono utilizzabili in approccio di coniugazione *post*-sintesi dell'ODN.

Un'altra interessante alternativa, per la sintesi di oligonucleotidi 3' coniugati, consiste nell'ancoraggio di 5'-O-DMT-2'-deossicitidina 3'-(2-clorofenil)fosfato ad un supporto succinilato, attraverso la funzione amminica esociclica della base azotata in 4. In questo modo è possibile introdurre un coniugante in posizione 3' e, dopo deprotezione della funzione 5', procedere con l'assemblaggio dell'oligonucleotide³⁰ secondo metodi standard.

1.6 Glicconiugati

Una categoria molto particolare di oligonucleotidi coniugati è rappresentata dai coniugati in cui un nucleotide o una catena oligonucleotidica sono derivatizzati con unità zuccherine, per i quali è stato coniato il termine di nucleoglicconiugati³¹.

Secondo gli approcci descritti in precedenza, oligonucleotidi 3'-glicosilati, sono stati ottenuti ancorando un metil glicoside, opportunamente protetto, attraverso una delle sue funzioni alcoliche secondarie, ad un supporto succinilato e assemblando l'ODN a partire dalla sua funzione alcolica primaria.³²

Oligonucleotidi glicosilati ad entrambe le estremità 3' e 5' sono stati ottenuti inserendo un building block glucosio fosforamidato nell'ultimo stadio di accoppiamento della sintesi.³³

Utilizzando anche in questo caso un approccio in fase solida, sono stati sintetizzati, poi, oligonucleotidi 5'-glicosilati, mediante reazione dell'oligonucleotide

completamente protetto con un opportuno derivato tricloroacetimidato di un'unità di glucosio perbenzoilata, utilizzando il trimetilsililtriflato come attivante.³⁴

L'interesse verso tali tipi di coniugati è dettato dal fatto che è noto che gli oligosaccaridi svolgono più di una funzione nei glicoconiugati: essi possono intervenire direttamente nei processi cellulari o modificare le proprietà intrinseche dell'oligonucleotide o la sua capacità di strutturazione. Il riconoscimento dei carboidrati, processo fondamentale in cellula affinché l'informazione presente nella struttura dello zucchero sia decodificata, è deputato ad una vasta famiglia di recettori proteici carboidrato-specifici, le lectine.³⁵

Dal punto di vista biomedico i glicoconiugati rappresentano una classe di composti di notevole interesse, non solo per i ruoli fondamentali svolti nei processi cellulari ma anche perché la caratteristica presenza di unità zuccherine impartisce ai composti cui sono legati proprietà di maggiore resistenza nei confronti di enzimi idrolitici e nucleasici e maggiore capacità di penetrazione attraverso la membrana cellulare, qualità desiderabili in un farmaco.

I primi esempi di glicoconiugati che sono stati presi in esame³⁶ sono glicopeptidi e glicoproteine, probabilmente la classe più abbondante di glicoconiugati. La glicosilazione chimica delle proteine permette il controllo della struttura del glicoconiugato risultante, oltre che lo studio della natura del legame zucchero-proteina. Numerosi studi sintetici, strutturali e funzionali di glicoproteine sono riportati in letteratura^{31,37a-b}.

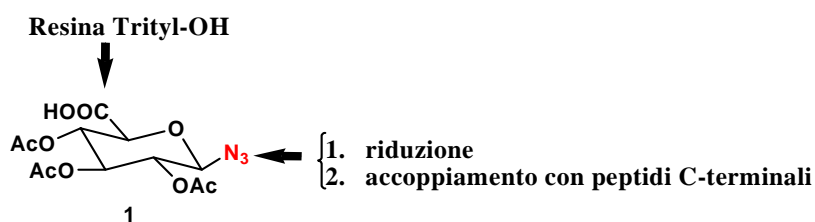


Figura 5

Un recente esempio di sintesi in fase solida di glicoconiugati è costituito dalla messa a punto del derivato **1** mostrato in Figura 5 e del suo utilizzo per la sintesi in

fase solida di analoghi dell'encefalina, un peptide endogeno riconosciuto dai recettori di sostanze oppiacee e quindi utilizzabile quale analgesico in alternativa ai derivati dell'oppio.

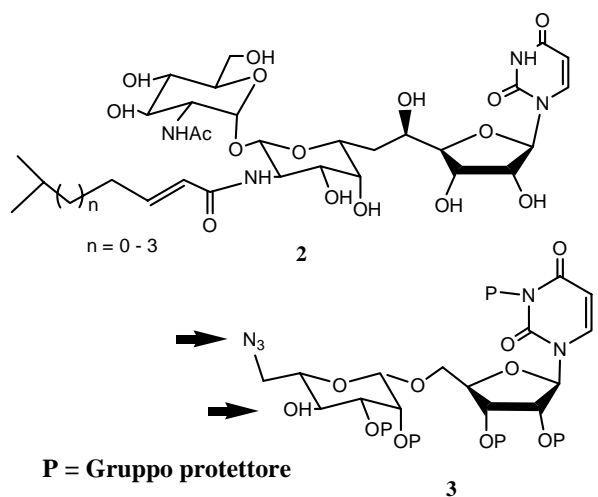


Figura 6

Il composto **1** presenta un'unità zuccherina ancorata al supporto solido polimerico Tentagel-OH attraverso la funzione carbossilica in posizione 6, ed è stato coniugato con l'estremità C-terminale di derivati peptidici, previa riduzione ad ammina del gruppo azido in posizione anomeric. Tale "scaffold" consente, in linea di principio, anche l'ottenimento di librerie combinatoriali di glicoconiugati di varia natura. La strategia di sintesi di peptidi coniugati all'estremità C-terminale con unità saccaridiche è stata recentemente migliorata grazie alla procedura "one-pot" di riduzione dell'azide e accoppiamento con il residuo amminoacidico³⁸. Ancora un esempio di sintesi in fase solida di glicoconiugati è stato riportato di recente da Silva e Sofia³⁹. Il derivato **2** mostrato in Figura 6 presenta la struttura-base delle tunicamicine, una classe di analoghi nucleosidici antibiotici, il cui utilizzo *in vivo* è però limitato dall'elevata citotossicità. Lo "scaffold" **3** messo a punto possiede due siti che possono essere derivatizzati ortogonalmente per l'ottenimento di librerie di glicoconiugati.

Esempi interessanti di "scaffold" di natura saccaridica progettati^{40a-b} per la sintesi combinatoriale di glicoconiugati sono i composti **4**, **5** e **6**, mostrati in Figura 7. Ognuno di questi derivati possiede potenzialmente tre siti suscettibili di

derivatizzazione, (questo per garantire il requisito minimo per il riconoscimento molecolare), che diventano due se si considera che un gruppo funzionale è utilizzato per l'aggancio al supporto solido polimerico. In particolare **4** e **5**, derivatizzati con una resina Tentagel mediante la formazione di un legame ammidico tra il gruppo carbossilico in posizione 6 dello zucchero e il gruppo amminico primario presente sulla resina, sono stati utilizzati in un approccio combinatoriale per la costruzione di una libreria di 48 membri, per reazione con diversi isocianati e acidi carbossilici.

La coniugazione di sequenze oligonucleotidiche di interesse biologico con zuccheri o oligosaccaridi è particolarmente rilevante sia per l'azione protettiva svolta nei confronti della degradazione enzimatica, sia per le proprietà di riconoscimento dei carboidrati da parte delle lectine e degli altri recettori carboidrato-specifici che faciliterebbero l'ingresso in cellula del frammento oligonucleotidico. Per queste ragioni, se il coniugato DNA-carboidrato mantiene intatta la capacità di formare strutture duplex stabili e conserva le funzioni di riconoscimento dei carboidrati, la molecola non solo risulta un mimico di una struttura naturale glicosilata del DNA, ma può rivelarsi anche un potente strumento biomedico che combina in un'unica molecola le caratteristiche proprie del DNA e dei carboidrati. L'altro fattore che ha stimolato la ricerca nel campo dei nucleoglicoconiugati è il ritrovamento di frammenti di DNA glicosilati^{41a-c} e di nucleobasi glicosilate in alcuni sistemi biologici. Il ruolo di tali glicoconiugati resta ancora da chiarire, ma è generalmente accettato che siano coinvolti

nella regolazione dell'espressione genica, nell'accrescimento cellulare e nella stabilizzazione di doppie eliche di DNA^{42a-f}. La sintesi chimica di coniugati DNA-carboidrati rappresenta un mezzo per delucidare proprietà e meccanismi d'azione di tali complessi,

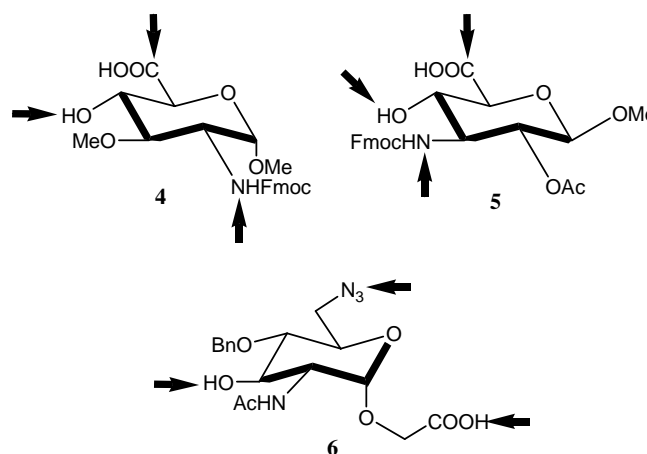


Figura 7

oltre che per ottenere nuovi potenziali regolatori dell'espressione genica, sfruttando l'abilità di ibridizzazione del DNA con filamenti complementari. Numerose sono le strategie messe a punto per l'ottenimento dei nucleoglicoconiugati sfruttando la sintesi in fase solida automatizzata, basata sulla chimica del fosforo (III)^{43a-b}. La metodica seguita in molti casi consiste nella sintesi del derivato fosforamidito dell'unità zuccherina prescelta, che è poi introdotta nella catena oligonucleotidica in crescita secondo il protocollo standard di sintesi automatizzata del DNA. Un esempio è costituito dalla sintesi da parte di Sheppard et al.²⁷ dei tre derivati fosforamidito **7**, **8**, **9** mostrati in Figura 8, seguita dalla sintesi di sequenze oligonucleotidiche contenenti nucleosidi glicosilati in posizione intermedia ed alle estremità 3' e 5' della catena di oligonucleotidi modello. I nucleoglicoconiugati ottenuti hanno mostrato capacità inalterate, rispetto alle corrispondenti sequenze non glicosilate, di formare strutture duplex stabili con filamenti complementari di DNA.

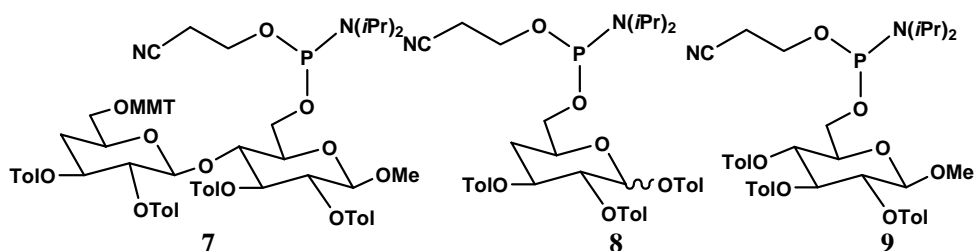


Figura 8

Più recente è la sintesi, e successiva introduzione in catena oligonucleotidica, da parte di J.H. van Boom e collaboratori⁴⁴, del derivato glucosilato della 2'-deossicitidina **10** mostrato in Figura 9. Lo studio sintetico ha preso spunto dal ritrovamento del derivato **10**, in alcune cellule batteriche, mediante biosintesi enzimatica per trasferimento di un'unità di glucosio dall'uridina-5'-difosfoglicosio alla 5-idrossimetil-2'-deossicitidina, base modificata presente nel genoma virale.^{45a-d}

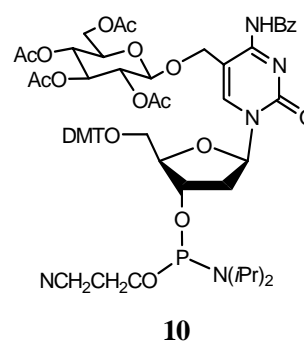


Figura 9

Durante il triennio di dottorato, è stata rivolta notevole attenzione alla vasta tematica della sintesi di oligonucleotidi coniugati. In tale ambito sono state studiate due metodologie sintetiche differenti:

1. La prima ha previsto la messa a punto di nuovi supporti solidi per la sintesi di oligonucleotidi coniugati con mimici di oligosaccaridi;
2. La seconda consente la coniugazione, sia all'estremità 3' sia a quella 5', in un approccio di coniugazione sia *pre* che *post* sintesi dell'ODN, di un'ampia varietà di molecole organiche.

2. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nell'ambito della ricerca di nuove strategie per l'ottenimento di glicocongiugati e in particolare allo scopo di preparare nuovi supporti per la sintesi in fase solida

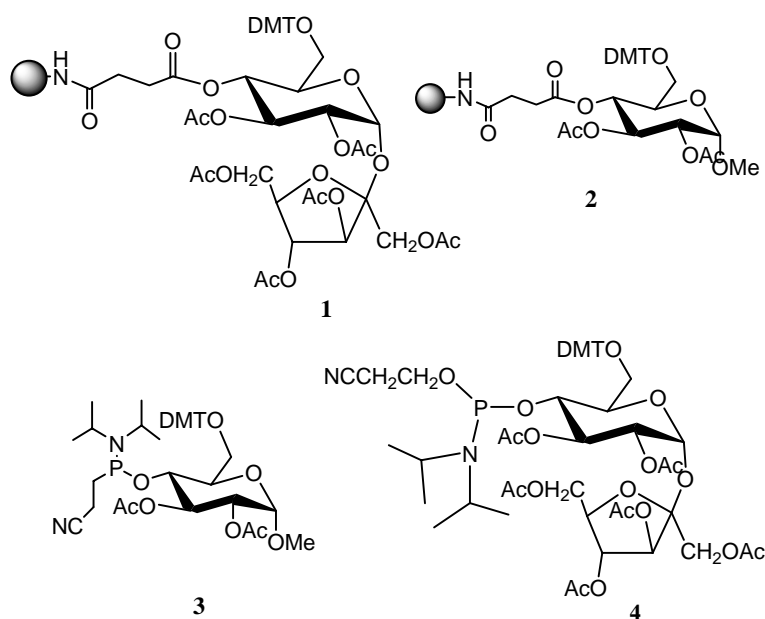


Figura 10

di molecole dal potenziale interesse biologico, nel laboratorio dove è stato svolto questo dottorato di ricerca, recentemente è stata messa a punto una strategia sintetica per l'ottenimento di oligonucleotidi coniugati con mimici di oligosaccaridi che presentano una giunzione internucleosidica di tipo fosfodiesterico.

A tale scopo, partendo da supporti solidi funzionalizzati con opportuni derivati di glucosio (**2**, Figura 10) e saccarosio (**1**, Figura 10) e sfruttando monomeri di tipo fosforamidato di saccarosio (**4**, Figura 10) e glucosio (**3**, Figura 10), è stato possibile realizzare una sintesi "on-line" di oligonucleotidi coniugati con una o più unità zucchero-fosfato ad una o entrambe le estremità dello scheletro oligonucleotidico⁴⁶.

Motivo strutturale caratteristico dei nuovi coniugati sintetizzati è la presenza di ponti fosfodiesterici quali legami covalenti stabili fra tutte le unità monomeriche, sia nella porzione oligonucleotidica, sia in quella saccaridica. Ciò ha consentito

l'assemblaggio dell'intero coniugato utilizzando una stessa chimica (metodo del fosforammidito), mediante sintesi automatizzata su sintetizzatore di oligonucleotidi.

2.1 Nuova metodologia sintetica per l'ottenimento di oligonucleotidi coniugati con oligosaccaridi⁴⁷

Data l'intrinseca instabilità chimica degli oligosaccaridi (condizioni acide anche blande li degradano velocemente a monosaccaridi) ed enzimatica (molte sono le glicosidasi nei mezzi biologici, e presenti in elevata concentrazione), notevole interesse è concentrato sui glicomimetici.

I composti glicomimetici presentano un notevole interesse biologico, in quanto offrono maggiore resistenza nei confronti di enzimi degradativi, conservando inalterate le proprietà di riconoscimento da parte dei recettori specifici.

Glucosio e lattosio sono stati prescelti come zuccheri modello in questo studio. Tutti i mono, disaccaridi ed oligosaccaridi in genere possiedono numerose caratteristiche che li rendono interessanti strutture di partenza per la costruzione di librerie di molecole diverse. Essi sono enantiomericamente puri e conformazionalmente rigidi, presentano un elevato grado di funzionalizzazione e di conseguenza un'intrinseca densità di gruppi potenzialmente modificabili in un approccio combinatoriale. Gli esosi in particolare sono inoltre in grado di legare con elevata affinità numerosi recettori di membrana, e per questo motivo di svolgere un importante ruolo per la veicolazione in cellula di farmaci.^{48a-c}

Durante il triennio di dottorato, usando strategie in fase solida, sono stati sintetizzati oligonucleotidi coniugati all'estremità 3' con unità mono- e disaccaridiche legate fra loro mediante legami ammidici, realizzati sfruttando metodi di classica sintesi in fase solida di peptidi. A tale scopo sono stati preparati i supporti funzionalizzati con residui di 1-azido glucosio (**6**, Schema 1) e con 1-azido lattosio (**14**, schema 2), successivamente utilizzati per la sintesi di vari tipi di molecole ibride.

Nei supporti **6** e **14**, le cui sintesi sono illustrate negli Schemi 1 e 2, l'unità zuccherina chimicamente legata alla matrice polimerica è un'unità opportunamente

funzionalizzata di glucosio o di lattosio. I supporti **6** e **14** sono caratterizzati dalla presenza di gruppi funzionali diversi, facilmente manipolabili e trasformabili selettivamente, per l'ottenimento di diverse classi di glicoconiugati.

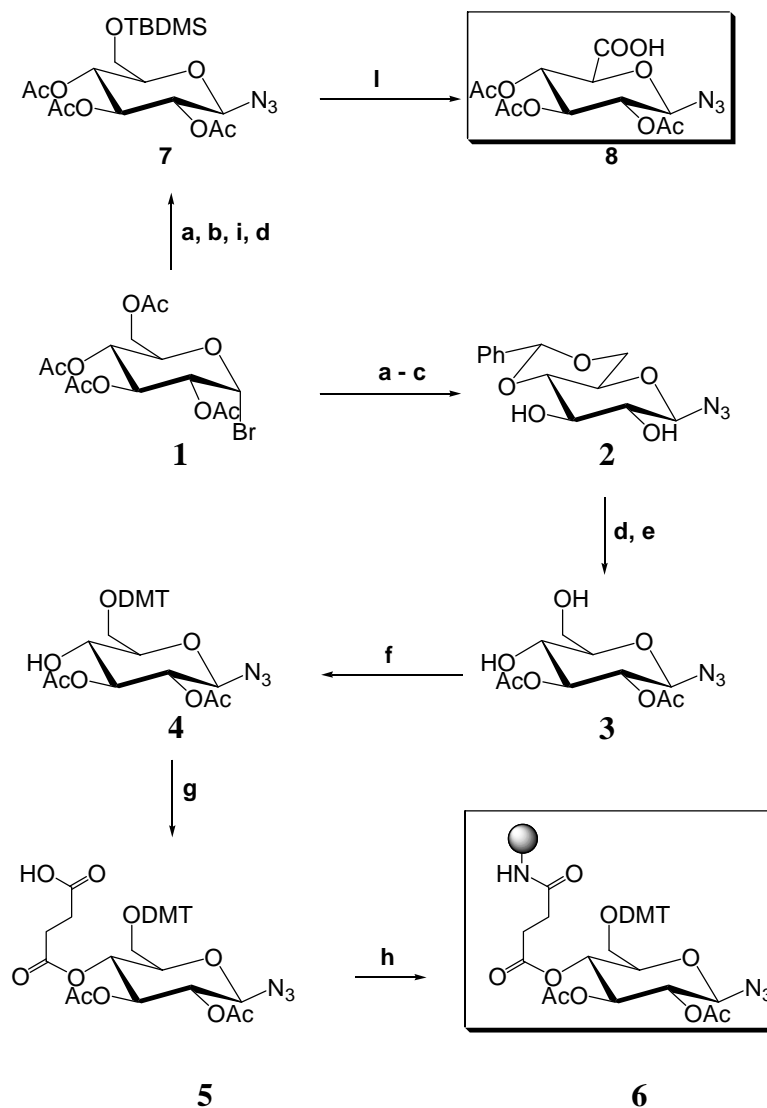
In particolare, nel corso del triennio di ricerca, l'interesse è stato rivolto alla sintesi, a partire dai supporti **6** e **14**, di composti nucleoglicoconiugati. La formazione di legami ammidici fra le unità saccaridiche è stata realizzata facendo condensare il gruppo amminico in posizione anomeric, che si ottiene per riduzione della funzione azido, con il carbossile di un acido uronico opportunamente protetto. In tal modo si possono ottenere diversi glicomimetici, in cui il legame glicosidico è sostituito con un legame ammidico di tipo 1,6. Recentemente sono state riportate diverse sintesi di carboidrati mimetici contenenti legami peptidici in luogo del legame interglicosidico naturale^{49a-f}. Da un punto di vista strutturale il legame ammidico conferisce allo scheletro oligosaccaridico proprietà di maggiore rigidità, mentre da un punto di vista sintetico è particolarmente conveniente per la facilità di introduzione e per la maggiore stabilità rispetto ad un legame O-glicosidico nelle condizioni richieste per la sintesi di molti glicoconiugati (ad esempio le deprotezioni in ambiente acido effettuate durante la sintesi di glicopeptidi)^{50a-b}.

Per la sintesi dei supporti **6** e **14** è stata scelta, come matrice polimerica, una resina Tentagel-NH₂. La scelta è stata fatta sulla base delle caratteristiche di compatibilità con solventi anche molto polari, compatibilità con la sintesi automatizzata di oligonucleotidi, pronta disponibilità commerciale e sufficientemente alta funzionalizzazione iniziale (0.29 meq/g).

2.2 Sintesi del supporto funzionalizzato con un derivato del glucosio (6)

La resina Tentagel-NH₂ è stata derivatizzata con la prima unità glicosidica tramite un linker succinico, precedentemente introdotto sul derivato glicosidico. Il linker succinico è labile alle basi, il che consente il distacco del materiale desiderato, a sintesi ultimata, per blando trattamento alcalino (tipicamente si impiega NH₄OH conc. a 55 °C per 16 ore, condizioni utilizzate, tra l'altro, anche per la rimozione

degli acetili presenti sugli ossidrili dello zucchero, oltre che per la deprotezione totale di nucleoglicoconiugati una volta completata la sintesi della sequenza oligonucleotidica).



Schema 1. a) NaN_3 , DMF, 50 °C, 2 ore, 95 %; b) 7M $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 50 °C, 18 ore, quant.; c) PTSA, α,α -dimetossitoluene 50 °C, 6 ore, 80 %; d) Ac_2O /piridina (2:3, v/v), t. a., 30 min., quant.; e) TFA/ H_2O /DCM (1:0.5:10, v/v), 0 °C, 3 ore, 90 %; f) DMTCl, DMAP, piridina, t. a., 18 ore, 85 %; g) anidride succinica, DMAP, piridina, t. a., 18 ore, 90 %; h) Tentagel®- NH_2 , DIPEA, DIC, HOBT, piridina, r. t., 48 ore, 74 %; i) TBDMSCl, imidazolo, DMF t. a., 18 ore, 85 %; l) reattivo di Jones, acetone, -15 °C, t. a., 3 ore, 90 %.

Nel caso del supporto **6**, derivatizzato con un'unità di glucosio, il gruppo β -1-azido, è stato introdotto per reazione con NaN_3 in DMF a 50°C per 2 ore sull' α -bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucosio, commercialmente disponibile. Dopo trattamento con ammoniaca metanolica, il prodotto β -1-azido glucosio ottenuto, è stato fatto reagire direttamente con α,α -dimetossitoluene in presenza di acido p-toluensolfonico a dare il composto **2** con rese dell'80%.

Successivamente, un trattamento di acetilazione con anidride acetica e piridina, seguito dalla rimozione del gruppo benzilidene, ha portato alla formazione dell'intermedio **3** con resa del 90%.

Infine, tale intermedio è stato protetto alla funzione 6 OH con il gruppo 4,4-dimetossitritile ed infine la reazione con anidride succinica in piridina ha portato alla formazione dell'intermedio **5** con resa del 90%.

Tale building block è stato incorporato nel supporto Tentagel NH_2 in presenza di DIC, HOBt e DIPEA, portando alla sintesi del supporto **6**. La resa di incorporazione della prima unità glicosidica, valutata per via spettrofotometrica attraverso il test del catione DMT, è risultata circa del 74%, corrispondente ad una funzionalizzazione compresa tra 0.20 e 0.23 meq/g.

La sintesi del building block **8** è stata ottenuta a partire dall' α -bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucosio, su cui è stata dapprima inserita la funzione azide, per reazione con NaN_3 in DMF a 50°C per due ore. Successivamente, dopo deacetilazione e introduzione del gruppo TBDMS sull'OH in **6**, l'intermedio è stato acetilato a dare la specie **7** con rese quantitative. Tale specie è stata, poi, trattata con il reattivo di Jones a dare il building block desiderato **8**. Il trattamento con il reattivo di Jones, che consiste in una soluzione di acido solforico in acetone, consente la deprotezione dell'OH in **6** dal gruppo TBDMS e la sua successiva ossidazione a gruppo carbossilico. La resa di recupero globale per tale prodotto è risultata essere del 73%. In realtà, la sintesi del building block **8** era già stata riportata da Toth a partire dall'acido glucuronico in una procedura che ha previsto due passaggi sintetici ed una resa del 73%. Tale sintone è stato poi utilizzato nella sintesi in fase solida, sfruttando le metodiche della chimica dell'Fmoc, di nuovi analoghi glicosilati dell'encefalina che contengono uno o due residui di acido glucuronico legati, attraverso un legame ammidico, all'amminoacido C-terminale di un pentapeptide⁵¹. Nella strategia qui

descritta, il prodotto **8** è stato ottenuto mediante 5 passaggi con resa complessiva del 73%. Tale procedura, nonostante sia più lunga, è stata preferita a quella di Toth, in quanto non ha previsto l'uso di reattivi aggressivi ed altamente igroscopici quali l' SnCl_4 , consentendo anche una maggiore riproducibilità delle reazioni effettuate.

2.3 Sintesi del supporto funzionalizzato con un derivato del lattosio (14)

La sintesi del supporto **14** ancorante un'unità di lattosio, è stata condotta come descritto nello Schema 2.

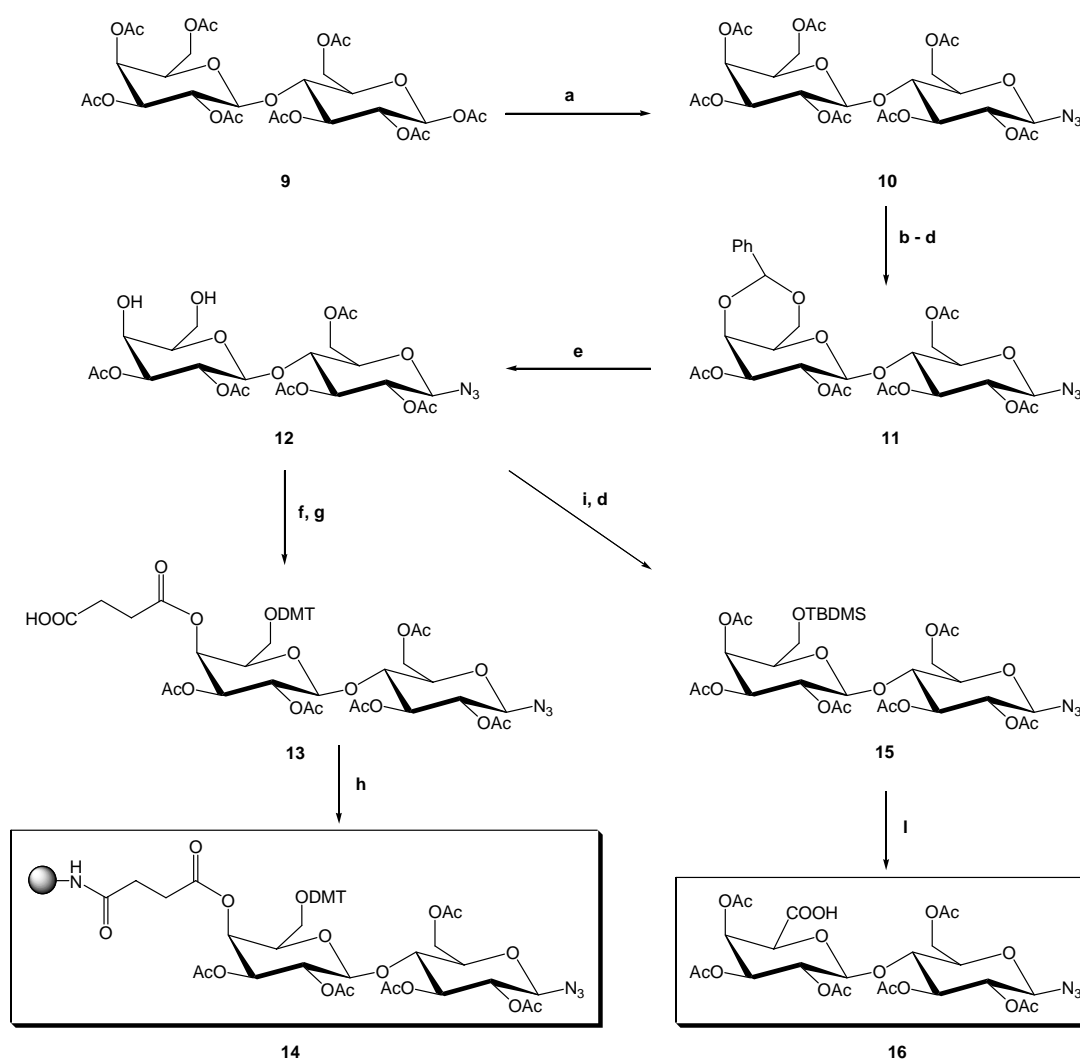
Il lattosio peracetilato **9** commercialmente disponibile, scelto come substrato di partenza, è stato sottoposto a reazione di azidazione condotta con SnCl_4 in DCM. Il prodotto ottenuto **10** è stato deacetilato per trattamento con ammoniaca metanolica, trattato con α,α -dimetossitoluene in presenza di acido p-toluensolfonico per proteggere gli ossidrili 4 e 6 dell'unità di galattosio e successivamente acetilato per trattamento con anidride acetica in piridina per ottenere l'intermedio **11** con resa del 70% per i tre passaggi.

Il trattamento con TFA per rimuovere il benzilidene ha condotto alla formazione dell'intermedio **12** con rese del 90%; tale specie è stata poi sottoposta ad una reazione di protezione dell'OH in 6 dell'unità di galattosio condotta con DMTCl in piridina per 18 ore a temperatura ambiente. Infine, il prodotto così ottenuto con rese dell'85% è stato succinilato sull'OH in 4 rimasto libero a dare la specie **13**.

Tale building block è stato incorporato nel supporto Tentagel- NH_2 in presenza di DIC, HOBt e DIPEA portando alla sintesi del supporto **14**. La resa di incorporazione della prima unità glicosidica, valutata per via spettrofotometrica attraverso il test del catione DMT, è risultata circa del 74%, corrispondente ad una funzionalizzazione di 0.20 meq/g.

La sintesi dell'intermedio **16** è stata ottenuta a partire dalla specie **12** in tre passaggi. Dapprima si è proceduto ad una reazione con TBDMSCl in DMF; tale trattamento ha condotto alla formazione di due regioisomeri sililati sull'OH in 6 e in 4 dell'unità di galattosio con resa dell'80%. La miscela di reazione così ottenuta è

stata fatta reagire con anidride acetica in piridina ed, in tali condizioni, si è osservata la migrazione spontanea del TBDMS dalla posizione 4 alla posizione 6 e l'acetilazione di tutti gli altri gruppi ossidrilici del disaccaride a dare il prodotto **15**. Infine questa specie è stata trattata con il reattivo di Jones che consente la deprotezione dell'OH dal TBDMS e l'ossidazione della funzione OH liberatasi ad acido carbossilico. La resa di recupero di tale prodotto è risultata essere del 72%.



Schema 2. a) SnCl_4 , TMSN_3 , DCM, setacci molecolari, t.a., 18 ore, 90 %; b) 7M $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 50 °C, 18 ore, quant.; c) PTSA, α,α -dimetossitoluene, 50 °C, 5ore, 70 %; d) Ac_2O /piridina (2:3, v/v), t.a., 3ore, quant.; e) TFA/ H_2O /DCM (1:0.5:10, v/v), 0 °C, 3 ore, 90 %; f) DMTCl, DMAP, piridina, t.a., 18 ore 85 %; g) anidride succinica, DMAP, piridina, t. a., 18 ore, 90 %; h) Tentagel® NH_2 , DIPEA, DIC, HOBt, piridina, r. t., 48 ore, 70 %; i) TBDMSCl, imidazolo, DMF t.a., 18 ore, 80 %; l) reattivo di Jones, acetone, -15 °C, 15 min, poi t.a., 3 ore, 90 %.

2.4 Assemblaggio del dominio oligosaccaridico

A partire dai due supporti funzionalizzati **6** e **14** e sfruttando i due building block 1-azido uronici **8** e **16**, si è proceduto all'assemblaggio del dominio glicomimetico mediante un approccio di sintesi in fase solida.

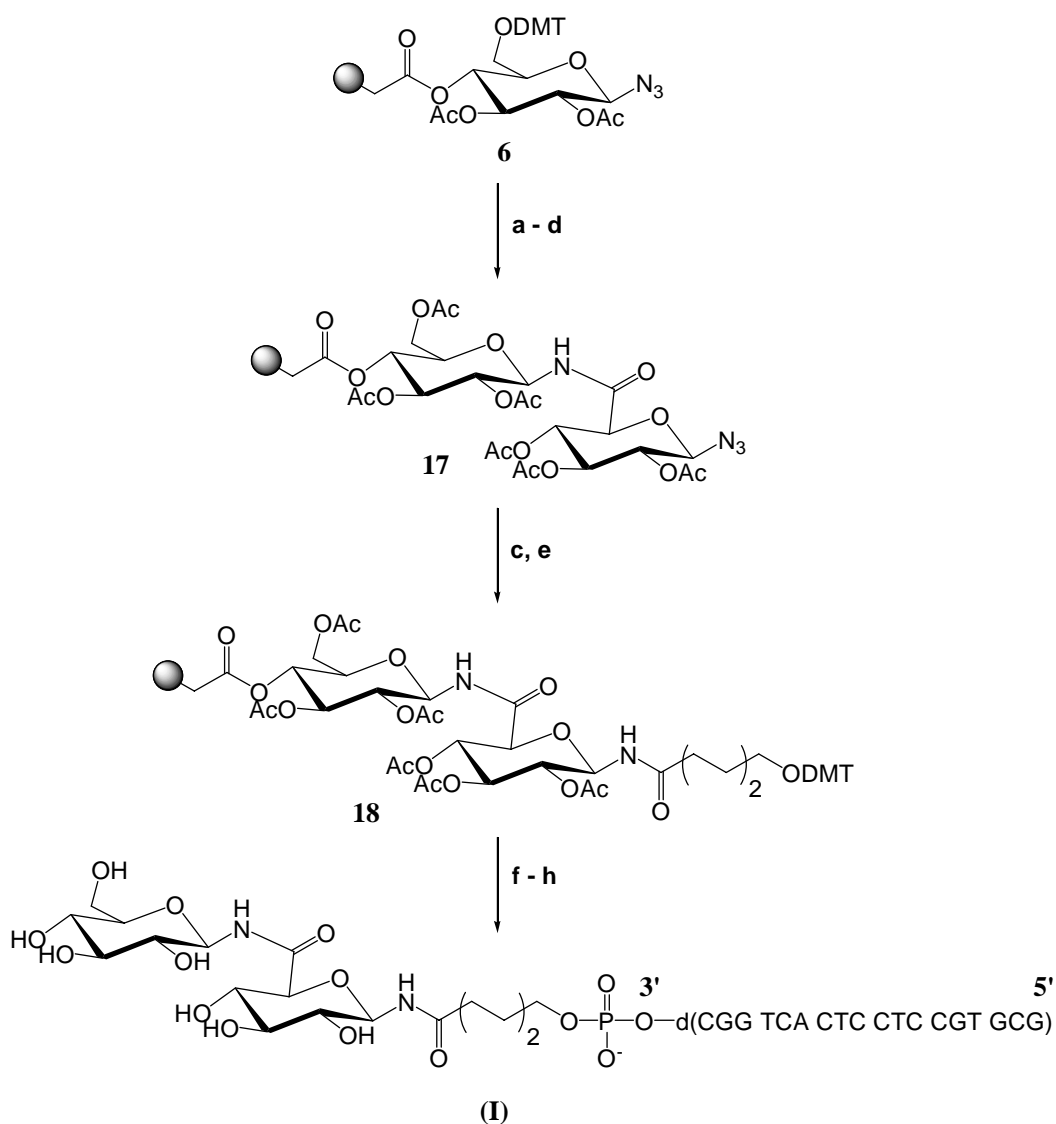
L'assemblaggio della porzione saccaromimetica ha previsto i seguenti passaggi:

- Riduzione della funzione 1-azido per aggiunta di 1,3-propanditiolo e Et₃N in DMF;
- Accoppiamento con l'opportuno acido uronico **8** o **16** in presenza di HOBt, HATU e DIPEA in DMF;
- Capping delle funzioni amminiche che, eventualmente non hanno reagito, con anidride acetica in piridina;

In particolare, per la sintesi dell'ibrido **I** (Schema 3) che contiene, come porzione oligosaccaridica, due unità di glucosio tenute insieme attraverso un legame ammidico, si è proceduto, a partire dal supporto **6**, dapprima alla rimozione del gruppo DMT dell'OH in **6** con una soluzione all'1% di DCA in DCM e a successiva acetilazione dell'OH rimasto libero con anidride acetica in piridina.

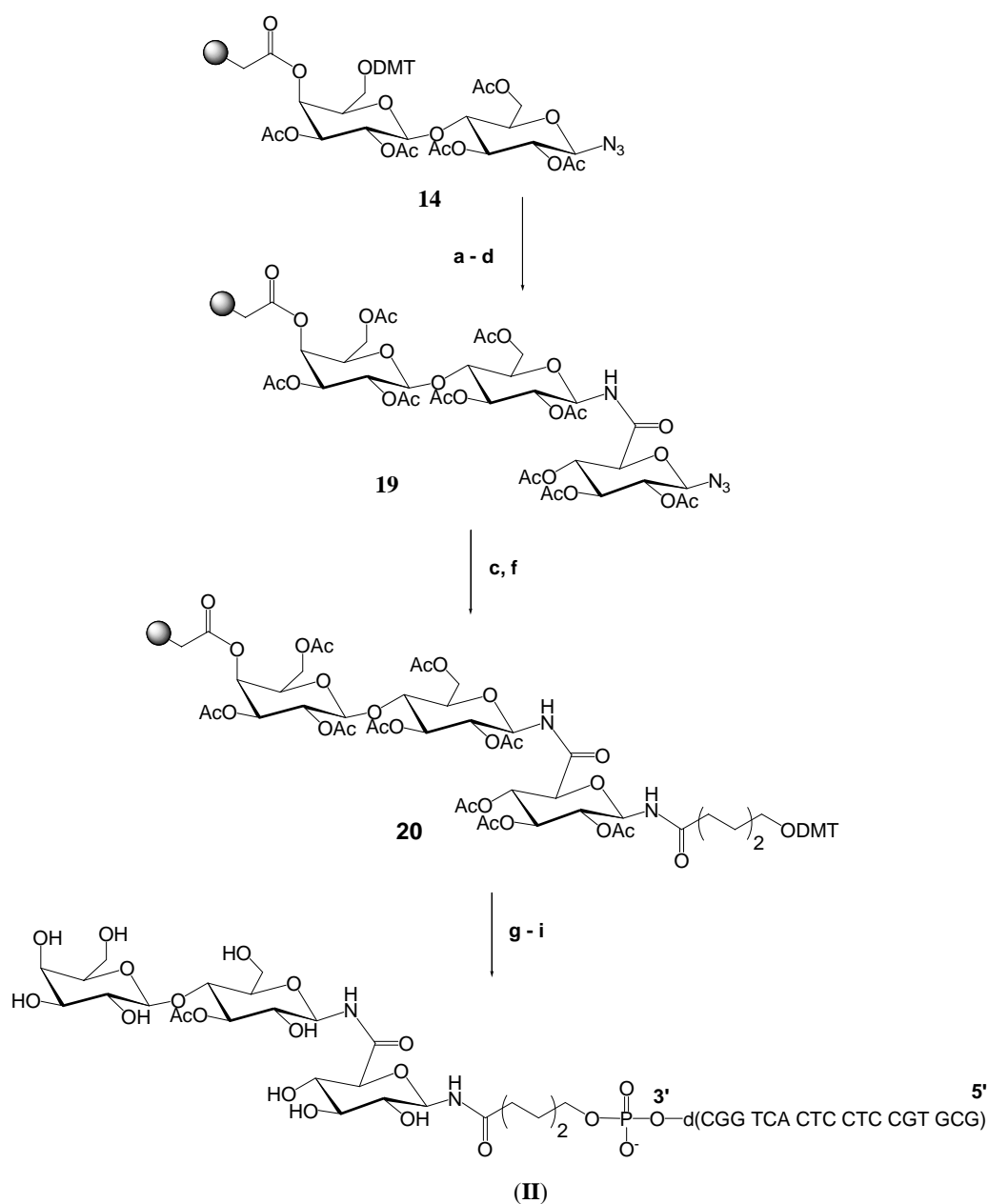
L'assemblaggio della porzione oligosaccaridica è stato realizzato mediante riduzione della funzione azido in posizione anomericale con 1,3-propanditiolo e Et₃N in DMF per 2 ore a temperatura ambiente sotto flusso di azoto.

Il supporto risultante, dopo lavaggi con DMF anidra, è stato quindi trattato direttamente con il building block **8** in presenza di DIPEA, HOBt, HATU in DMF per 2 ore a temperatura ambiente. È stato, quindi, effettuato un trattamento con Ac₂O/Py 1:1 (v/v) allo scopo di bloccare i gruppi amminici che eventualmente non hanno reagito.



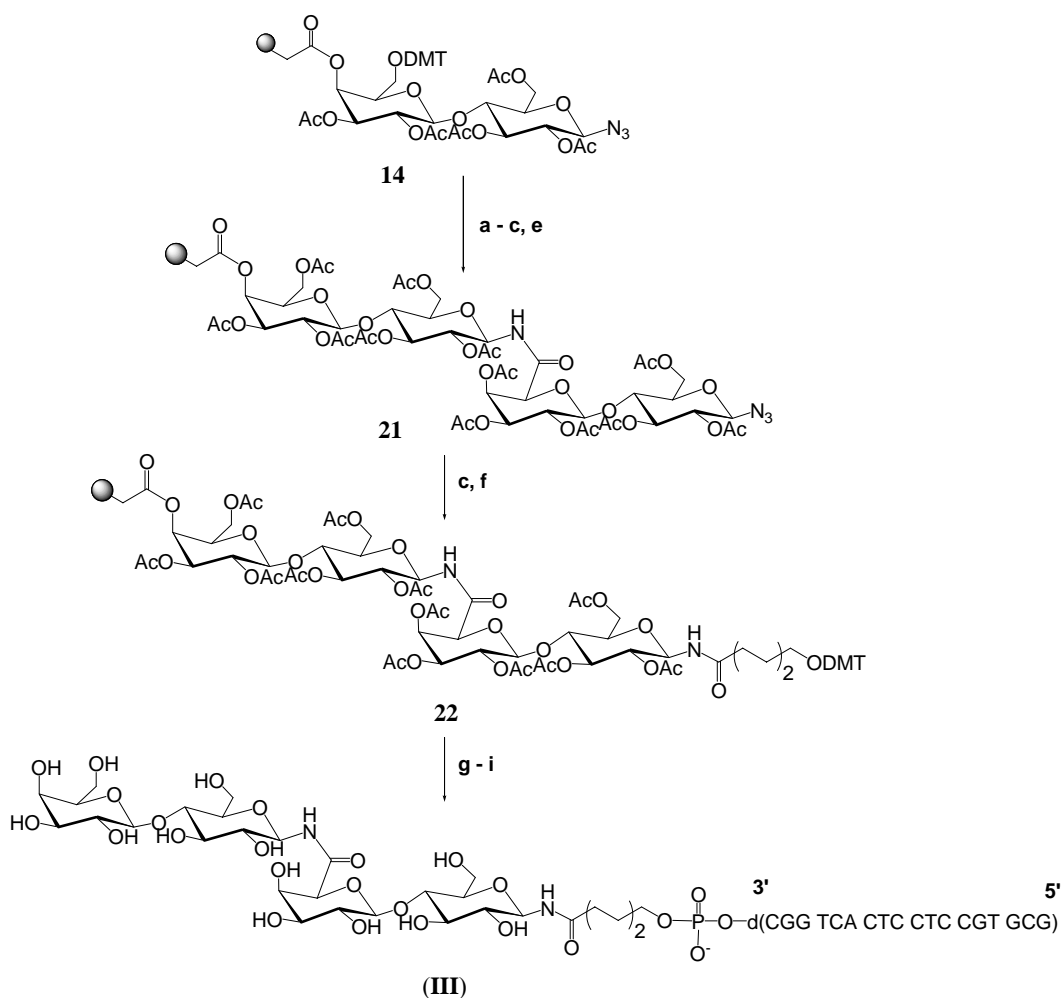
Schema 3. a) 1% DCA in DCM, t. a., 10 min; b) Ac₂O/piridina (1:1, v/v), t. a., 30 min; c) 1,3-propanditiolo, TEA, setacci molecolari, DMF, t. a., 2 ore; d) accoppiamento con **8**, HATU, HOBT, DIPEA, DMF, t. a., 1.5 ore; e) accoppiamento con DMTO(CH₂)₅COOH, HATU, HOBT, DIPEA, DMF, t.a., 1.5 ore; f) assemblaggio dell'ODN ; g) rimozione finale del DMT; h) aq. NH₃, 50 °C, 6 ore.

Per la sintesi degli ibridi **II** (schema 4) e **III** (schema 5), contenenti, come porzione oligosaccaridica, rispettivamente un'unità di lattosio ed una di glucosio (ibrido **II**) e due unità di lattosio (ibrido **III**) tenute insieme attraverso un legame ammidico, si è proceduto in maniera analoga alla sintesi di **I** sfruttando, per l'ibrido **II** il supporto **14** e l'acido uronico **8**, e, per l'ibrido **III**, il supporto **14** e l'acido uronico **16**.



Schema 4. a) 1% DCA in DCM, t. a., 10 min; b) Ac₂O/piridina (1:1, v/v)t. a., 30 min; c) 1,3-propaniditiolo, TEA, setacci molecolari, DMF, t.a., 2 ore; d) accoppiamento con **8**, HATU, HOBt, DIPEA, DMF, t.a., 1.5 ore; e) accoppiamento con **16**, HATU, HOBt, DIPEA, DMF, t. a., 1.5 ore; f) accoppiamento con DMTO(CH₂)₂COOH, HATU, HOBt, DIPEA, DMF, t.a., 1.5 ore; g) assemblaggio dell'ODN; h) frimozione finale DMT; i) aq. NH₃, 50 °C, 6 ore.

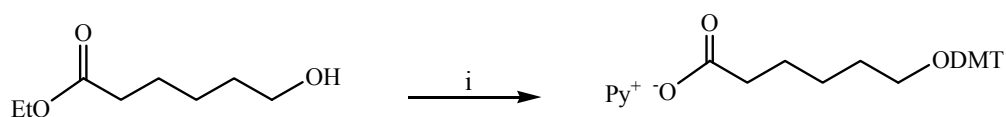
Per valutare l'avvenuta formazione della porzione oligosaccaridica, sono state prelevate tre aliquote dei supporti **17**, **19** e **21** e sono state trattate con una soluzione di NH₄OH a 50°C per 18 ore; il distaccato ottenuto è stato analizzato mediante ¹H-NMR.



Schema 5. a) 1% DCA in DCM, t. a., 10 min; b) Ac₂O/piridina (1:1, v/v)t. a., 30 min; c) 1,3-propanditolo, TEA, setacci molecolari, DMF, t.a., 2 ore; d) accoppiamento con **8**, HATU, HOBT, DIPEA, DMF, t.a., 1.5 ore; e) accoppiamento con **16**, HATU, HOBT, DIPEA, DMF, t. a., 1.5 ore; f) accoppiamento con DMTO(CH₂)₅COOH, HATU, HOBT, DIPEA, DMF, t.a., 1.5 ore, g) assemblaggio dell'ODN; h) frimozione finale DMT; i) aq. NH₃, 50 °C, 6 ore.

In tutti e tre i casi, l'analisi ¹H-NMR ha evidenziato la presenza della porzione oligosaccaridica desiderata ed una costante di accoppiamento, per i protoni anomerici, compresa tra 7.7 e 8.8 Hz; tale valore è consistente con una configurazione di tipo β per il protone anomerico. Tale dato conferma, inoltre, che la procedura di riduzione con il tiolo, che è convenzionalmente accettato proceda attraverso un meccanismo radicalico, non modifica la stereochimica della posizione anomerica. Ultimata la sintesi della porzione oligosaccaridica, prima di procedere all'assemblaggio dell'ODN su sintetizzatore automatico di DNA, in tutti e tre i casi

si è proceduto all'introduzione di un linker di acido-6-(4,4'-dimetossitriifenilmetossi)-esanoico, la cui sintesi è riportata nello Schema 6, sfruttando la stessa procedura di riduzione della funzione azido in posizione anomeric e successiva reazione della funzione amminica con il COOH del linker, descritta in precedenza.



Schema 6 i: a) DMTCl / DMAP / Py 2 ore, t.a b) NaOH, 6M in EtOH 12 ore, t.a.

Per tutti e tre gli ibridi la funzionalizzazione del supporto, dopo introduzione del linker, valutata per via spettrofotometrica attraverso il test del catione DMT, è risultata compresa tra 0.12 e 0.14 meq/g. Se ne deduce che l'assemblaggio dell'oligosaccaride procede con una resa del 65% a partire dalle supporti **6** e **14**, con una resa media per ogni ciclo di accoppiamento (riduzione dell'azide e formazione del legame ammidico) di circa l'80%.

Per la sintesi dei tre ibridi **I**, **II** e **III**, a partire dai supporti **18**, **20** e **22**, preparati come descritto in precedenza, la porzione oligonucleotidica è stata assemblata su sintetizzatore automatico di DNA seguendo un protocollo standard di sintesi degli ODN, secondo la chimica del fosforamidito. In tutti i casi, l'efficienza della sintesi è stata monitorata mediante test del catione DMT e la resa, per ogni ciclo di accoppiamento, è risultata sempre non inferiore al 98%. La sequenza oligonucleotidica sintetizzata, ($5'$ GCGTGCCTCCTCACTGGC $3'$), è stata scelta in quanto complementare ad un tratto di mRNA codificante per la proteina chinasi A di tipo 1 (PKA1), subunità RI α , che è superespressa nella maggior parte dei tumori umani.

A sintesi ultimata, un trattamento basico condotto con una soluzione di NH₄OH a 50°C per 18 ore ha consentito il distacco e la deprotezione degli ibridi sintetizzati dal supporto.

I grezzi distaccati di tutte e tre le specie sono stati purificati mediante HPLC usando una colonna a scambio anionico Nucleogen e desalificati su una colonna ad esclusione molecolare Sephadex G25 eluita con acqua. L'ulteriore analisi HPLC dei prodotti isolati, condotta utilizzando una colonna in fase inversa (NUCLEOSIL 100-5 C18), ha evidenziato una purezza, per ogni singolo prodotto, del 98%. Le specie **I**, **II** e **III** sono state quindi caratterizzate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. In tutti i casi, è stato ritrovato un solo cluster di segnali, attribuibile a $(M+H)^+$, $(M+Na)^+$, $(M+K)^+$, dove M rappresenta la massa molecolare del prodotto atteso.

2.5 Studi di stabilità chimica ed enzimatica

In una fase successiva di studio, è stato valutato l'effetto dell'introduzione della porzione oligosaccaridica in 3' sulla stabilità chimica ed enzimatica degli oligomeri realizzati e sulle capacità di binding nei confronti della sequenza oligonucleotidica complementare.

Per valutare la stabilità chimica degli oligomeri **I**, **II** e **III**, 1.0 OD di ciascun campione purificato è stato incubato a 37°C in 1 mL di tampone fosfato costituito da una soluzione acquosa

20 mM di KH_2PO_4 a tre valori differenti di pH: 5.0, 7.0 e 9.0. Gli esperimenti sono stati monitorati mediante HPLC; il campione non trattato e quelli incubati a differenti

valori di pH sono stati controllati mediante analisi HPLC su una

colonna a scambio anionico Nucleogen. I tre oligomeri sono risultati perfettamente stabili alle condizioni di pH prescelte anche dopo 20 giorni (Figura 11).

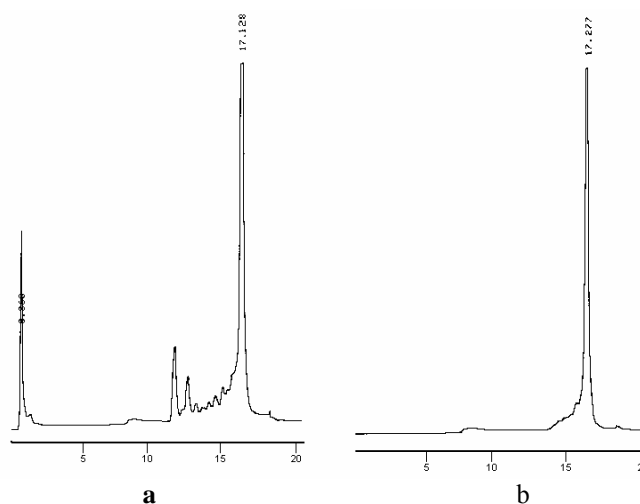


Figura 11 Profili HPLC dell'ibrido **III** non purificato (a) e, purificato, dopo 20 giorni a pH=5 (b)

colonna a scambio anionico Nucleogen. I tre oligomeri sono risultati perfettamente stabili alle condizioni di pH prescelte anche dopo 20 giorni (Figura 11).

La coniugazione alle estremità 3' e 5' di un oligonucleotide ha come scopo quello di evitare il riconoscimento dell' ODN da parte di enzimi esonucleasici che, come detto in precedenza, rappresentano la classe di nucleasi più abbondante in cellula. Tali enzimi idrolizzano irreversibilmente l'oligonucleotide a partire dall'estremità 3'-OH e/o 5'-OH, producendo mononucleotidi, riducendone drasticamente il tempo di vita in cellula.

Per verificare l'efficienza della coniugazione effettuata, per l'oligomero **III**, che presenta, come porzione oligosaccaridica, due unità di lattosio, è stata anche valutata la stabilità enzimatica incubando 1.0 OD di oligonucleotide modificato con 1 mL di siero fetale bovino a 37°C.

Un esperimento analogo è stato condotto per controllo sulla stessa sequenza oligonucleotidica non coniugata $d(5'GCGTGCCTCCTCACTGGC3')$. Sono stati, quindi, eseguiti prelievi a tempi noti delle miscele dei due ODN (naturale e coniugato) che sono stati analizzati su una colonna HPLC Nucleogen a scambio anionico. Come appare dai cromatogrammi riportati in Figura 12, l'ODN coniugato è completamente degradato ad una miscela di 3' e 5'-mononucleotidi in 6 ore, mentre quello naturale, non coniugato in tre ore. La coniugazione in 3' ha pertanto l'effetto di aumentare del 50% la stabilità dell'oligomero in mezzo biologico.

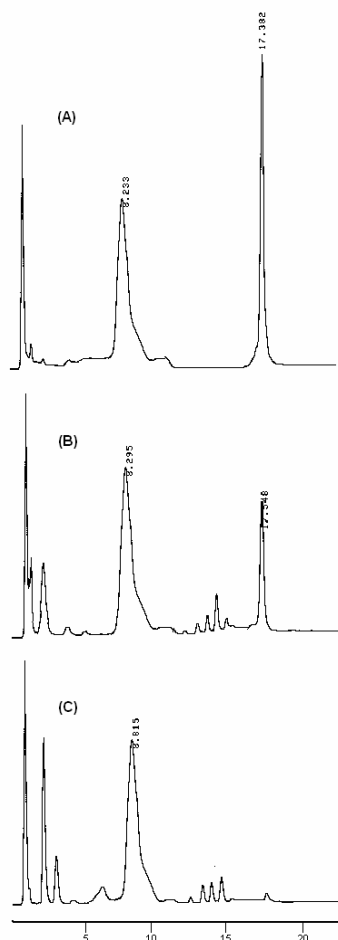


Figura 12 Profili HPLC dell'ibrido III purificato, trattato con siero fetale bovino: a) controllo effettuato dopo 15 min; b) controllo dopo 3 ore; c) controllo dopo 6 ore

2.6 Studi di denaturazione termica

Affinché un generico oligonucleotide sintetico coniugato possa trovare applicazione in esperimenti antisense è necessario che le molecole introdotte alle estremità non provochino una diminuzione dell'affinità dell' ODN nei confronti delle sequenze bersaglio. Le analisi di denaturazione termica monitorate via UV consentono di studiare la formazione e la stabilità di strutture duplex fornendo dati non solo qualitativi ma anche quantitativi sulla stabilità degli ibridi formati, espressi in termini di temperatura di fusione, cioè temperatura in corrispondenza della quale il 50 % del complesso inizialmente formato (duplex) è totalmente destrutturato (random coil).

Monitorando l'assorbimento a $\lambda = 260$ nm, all'aumentare della temperatura di miscela 1:1 di ODN aventi sequenza complementare si osserva una tipica curva sigmoideale indicativa della fusione della struttura duplex a dare i singoli filamenti come 'random coil'. La temperatura in corrispondenza del flesso di tale curva definisce la temperatura di fusione della duplex in esame. Confrontando le corrispondenti temperature di fusione, si possono ottenere dati circa la stabilità di strutture duplex modificate in relazione a quelle naturali.

La capacità degli oligomeri coniugati **I**, **II** e **III** di ibridizzarsi con l'oligodeossiribonucleotide avente sequenza complementare $5^{\text{OH}}\text{TTGCCAGTGAGGAGGCACGCAT}^{3^{\text{OH}}}$ è stata valutata attraverso esperimenti di denaturazione termica eseguiti in una soluzione a pH = 7.0 pseudo-fisiologica (100 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4). Tali esperimenti sono stati confrontati con esperimenti analoghi condotti nelle stesse condizioni sulla duplex formata dall' ODN naturale $3^{\text{OH}}\text{CGGTCACCTCCGTGCG}^{5^{\text{OH}}}$ e dal suo complementare $5^{\text{OH}}\text{TTGCCAGTGAGGAGGCACGCAT}^{3^{\text{OH}}}$.

Le curve di fusione relative alle tre duplex formate dai filamenti coniugati sono risultate completamente sovrapponibili ($T_M = 60^\circ\text{C}$) alla curva di fusione registrata per la duplex formata dai due filamenti naturali, dimostrando che la coniugazione in 3' con l'oligosaccaride non modifica le proprietà di riconoscimento delle sequenze oligonucleotidiche nei confronti del filamento complementare.

2.7 Nuova strategia sintetica per la coniugazione in 3' e in 5' degli oligonucleotidi⁵²

Per molti esperimenti in vivo ed in vitro, gli oligonucleotidi devono essere covalentemente legati alle loro estremità 3' e 5' con una varietà di molecole organiche, quali probe fluorescenti, intercalanti, molecole idrofobiche o peptidi.

Negli ultimi anni, un gran numero di pubblicazioni ha riguardato la sintesi di ODN coniugati sia all'estremità 5' che 3'. I metodi sintetici più utilizzati per la sintesi di tali oligomeri prevedono, come già detto, l'utilizzo di:

- supporti funzionalizzati con opportuni linker che consentano l'introduzione del coniugante in un approccio post-sintesi dell'ODN;
- supporti opportunamente prederivatizzati con la molecola coniugante;
- coniuganti opportunamente derivatizzati, come fosforamidito oppure H-fosfonato, da poter essere inseriti nel ciclo di accrescimento dell'ODN su sintetizzatore automatico;

I supporti proposti per la sintesi di ODN coniugati sono la CPG (Controlled Pore Glass, palline di vetro a porosità controllata) o copolimeri polistirene/PEG derivatizzati con opportune molecole bis-funzionalizzate, tali da consentire sia l'accrescimento del dominio oligonucleotidico sia la coniugazione con opportune molecole coniuganti.

In tutti i casi, le strategie sintetiche messe a punto prevedono complesse procedure per la realizzazione dei supporti o per la trasformazione dei coniuganti in derivati fosforamidito o H-fosfonato; oppure complesse procedure di purificazione per l'ottenimento dell'oligomero coniugato puro, a sintesi ultimata.

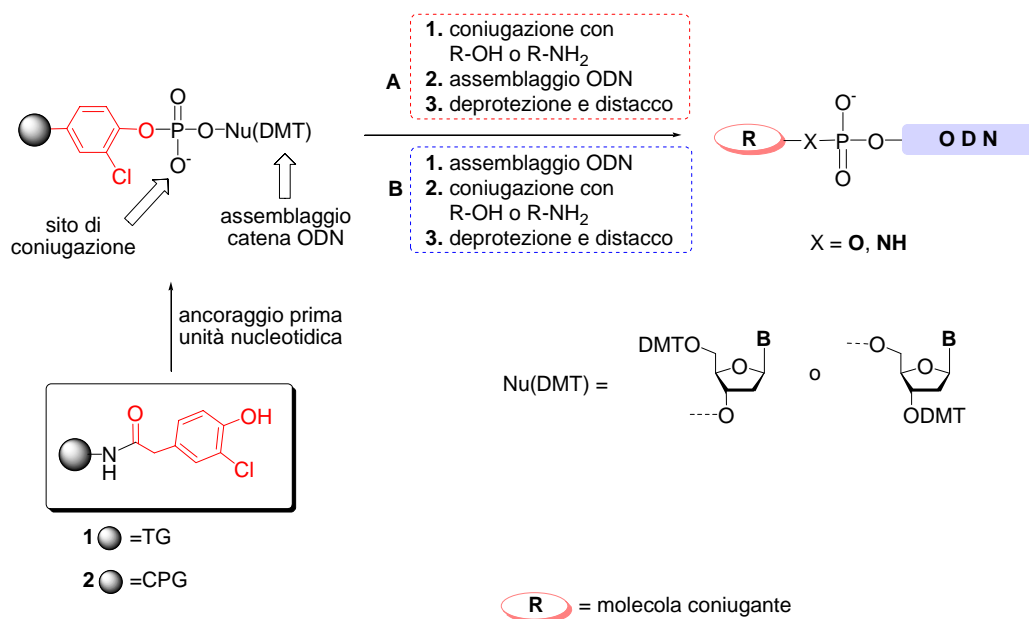
Con lo scopo di realizzare oligonucleotidi coniugati all'estremità 3' e 5' è stata messa a punto una procedura efficiente e versatile che non richiede purificazioni HPLC finali, complesse derivatizzazioni dei coniuganti o delle matrici polimeriche.

Tale procedura prevede che il coniugante, presente sotto forma di ammina o alcol, sia fatto reagire direttamente con il supporto solido opportunamente derivatizzato, consentendo la realizzazione di un legame fosforamidato o fosfodiesterico tra il

gruppo fosfato terminale dell'ODN agganciato alla fase solida e il coniugante prescelto.

Per dimostrare la versatilità della metodologia proposta, sono state esplorate condizioni di coniugazione sia *pre-* che *post-*sintesi dell'ODN, valutando la possibilità di accrescere la catena oligonucleotidica sia in direzione 3'-5' che 5'-3', ovvero di effettuare la coniugazione all'estremità 3' o 5' (schema 7).

Nella strategia sintetica messa a punto sono state sperimentate entrambe le matrici commercialmente disponibili e convenzionalmente utilizzate per la sintesi in fase solida di peptidi e oligonucleotidi: Tentagel-ammino (0,29 meq/g) e LCAA-CPG (0,10 meq/g). Le due matrici sono state funzionalizzate con il clinker da noi prescelto, anch'esso commercialmente disponibile, acido 3-cloro-4-idrossifenilacetico, portando alla formazione dei supporti **1** e **2**, rispettivamente.



Schema 7 Strategia di sintesi per la realizzazione di ODN 3', 5'-coniugati

La funzionalizzazione dei supporti con il linker è stata condotta con DIC, DIPEA, HOBt in piridina a temperatura ambiente per 18 ore. Successivamente, dopo

acetilazione del supporto e trattamento con ammoniaca acquosa per un'ora a 50° C, si è proceduto alla funzionalizzazione del supporto con la prima unità nucleotidica.

L'introduzione della prima unità nucleotidica è stata condotta, su entrambi i supporti, sfruttando monomeri, commercialmente disponibili, 3'- o 5'-fosforammidato dei nucleosidi, nonché classiche metodiche della sintesi in fase solida degli ODN secondo la chimica del fosforammidato. Essenzialmente, per la funzionalizzazione del supporto solido con il primo monomero, è stata seguita la procedura già messa a punto per la sintesi in fase solida di analoghi nucleosidici 5'-fosforammidato e 5'-fosfodiesteri⁵³, descritta nei dettagli nel paragrafo 2.7 del capitolo 1.

La conversione del fosfito a fosfato triestere è stata condotta mediante trattamento con una soluzione di I₂ in Py/acqua/THF ed è stato possibile monitorarne l'efficienza, nel caso del supporto Tentagel, mediante analisi ³¹P del supporto sospeso in CDCl₃.

La funzionalizzazione delle resine risultanti **3a-e** e **5e** (Schema 8), valutata mediante test spettrofotometrico del catione DMT rilasciato per trattamento acido su quantità pesate di resina, è risultata essere compresa tra 0.19 e 0.22 meq/g per il supporto Tentagel e tra 0.08 e 0.10 meq/g per il supporto CPG.

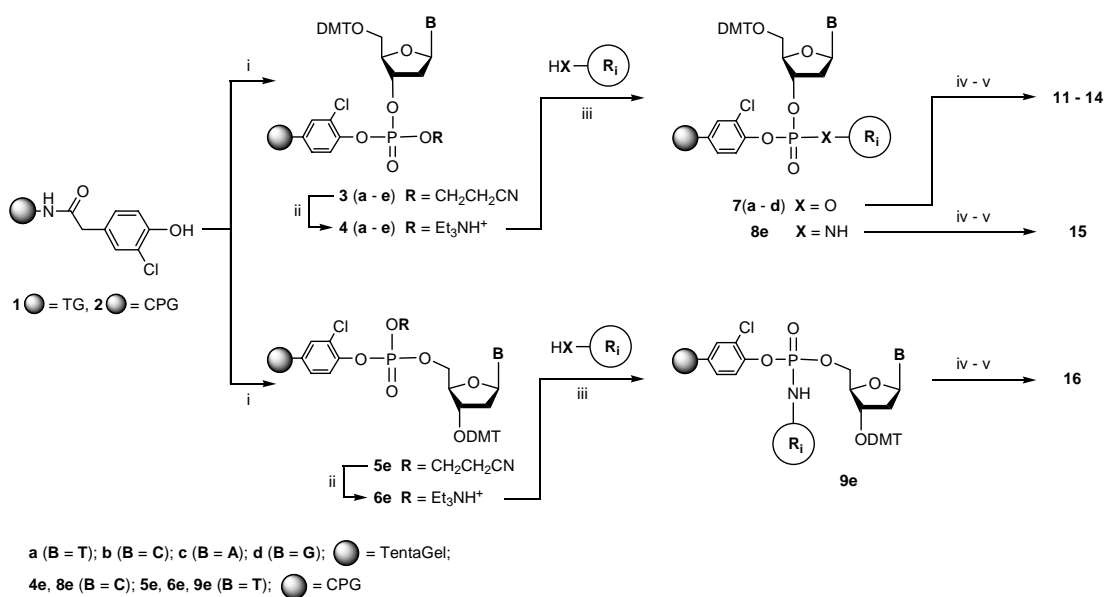
Per deproteggere il fosfato dal gruppo cianoetile, sui supporti è stato condotto un trattamento con Et₃N/piridina (1:1, v/v) per 1 ora a 50° C; tale trattamento non comporta perdita di funzionalizzazione del supporto, come confermato dal test DMT e, per i supporti **4a-d** (Schema 8) è stato monitorato mediante analisi ³¹P-NMR.

I supporti ottenuti **4a-e** e **6e** (Schema 8), dopo tali trattamenti, contengono due gruppi funzionali che possono essere ulteriormente funzionalizzati: l'OH in 3' o 5' protetto sotto forma di etere con il gruppo DMT, e la funzione fosfodiesterica in posizione 3' o 5'. Queste due funzioni possono essere utilizzate, rispettivamente, per l'accrescimento della catena oligonucleotidica e per l'introduzione della molecola coniugante in un approccio di coniugazione *pre-* o *post-* sintesi dell'ODN.

2.8 Coniugazione *pre*-assemblaggio dell'ODN

In un approccio di coniugazione *pre*-sintesi dell'ODN, l'introduzione del coniugante può avvenire secondo due differenti strategie, che sfruttano le classiche procedure della chimica del fosfotriestere.

Secondo la prima strategia, i supporti **4 a-e** (Schema 8) sono stati trattati con il coniugante prescelto, avente una funzione alcolica libera, in piridina ed in presenza dell'agente attivante MSNT, per 12 ore a temperatura ambiente. La resa di incorporazione del coniugante è sempre risultata compresa tra il 75 e l'80%, con funzionalizzazioni delle resine comprese tra 0.15 e 0.18 meq/g, solo nel caso del supporto CPG **4e**, le rese sono state sensibilmente più basse (<10%). Le rese di incorporazione del coniugante sono state valutate indirettamente mediante test DMT su campioni pesati di supporto, dopo trattamento basico, valutando la percentuale di nucleotide non coniugato rimasto ancorato al supporto.



Schema 8 Coniugazione *pre*-assemblaggio dell'ODN

i) accoppiamento con un nucleoside 3' o 5' fosforamidito; ii) Et₃N/Py, 1 ora, 50°C;
iii) accoppiamento mediante chimica del fosfotriestere; iv) assemblaggio dell'ODN;
v) deprotezione e distacco (NH₄OH, 6 ore, 55° C)

Infatti, soltanto il nucleoside legato al supporto tramite un legame fosfotriestereo (**7** e **8**), è facilmente rimosso per trattamento basico (28% NH₄OH, 50° C, 5ore). Viceversa, il nucleoside ancorato al supporto tramite un legame fosfodiesterio (**4** e **6**) l'aliquota di supporto che non ha reagito con il coniugante, è assolutamente stabile nelle stesse condizioni basiche.

Per preparare, invece, i supporti funzionalizzati **8e** e **9e**, i supporti **4e** e **6e** sono stati dapprima attivati per trattamento con tosil cloruro in piridina per 15 minuti e, dopo opportuni lavaggi, trattati con una soluzione del coniugante, avente una funzione amminica, disciolto in piridina, per altri 15 minuti. Tale trattamento è stato ripetuto tre volte e le rese di coniugazione, valutate, anche in questo caso, mediante test DMT sul supporto dopo trattamento basico, sono risultate comprese tra il 65 e l'80%, corrispondente ad una funzionalizzazione dei supporti pari a 0.05 - 0.08 meq/g.

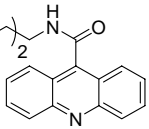
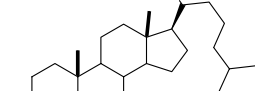
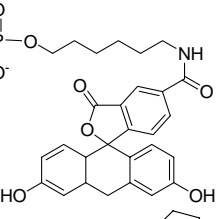
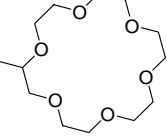
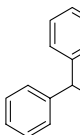
A questo punto, introdotto il coniugante, è stato effettuato l'assemblaggio della catena oligonucleotidica. In particolare, partendo dai supporti **7 (a-d)** e **8e**, è stato assemblato un decamero (CT)₅ su sintetizzatore automatico di DNA in direzione 3'-5', sfruttando le metodiche della chimica del fosforamidato.

In maniera del tutto analoga, partendo dal supporto **9e** è stato assemblato un esamero G₃AG in direzione 5'-3'.

Per ottenere il distacco degli oligomeri sintetizzati, il supporto è stato trattato con ammoniaca acquosa a 50° C per 6 ore e i grezzi distaccati sono stati analizzati mediante HPLC su una colonna Nucleogel a scambio anionico. In tutti i casi tale analisi ha dimostrato la presenza di una sola specie, corrispondente ai prodotti desiderati **11-16** (Tabella 1). Tale elevata purezza può essere ottenuta in quanto solo gli oligomeri che siano legati al supporto attraverso un legame fosfotriestereo o fosforamidato vengono distaccati per trattamento basico. Viceversa, gli ODN legati tramite un legame fosfodiesterio, ovvero le sequenze che non hanno reagito con il coniugante, rimangono ancorate al supporto. I grezzi distaccati sono stati purificati mediante cromatografia ad esclusione molecolare su colonna Sephadex G25 eluita con H₂O/EtOH (4:1, v/v). L'analisi MALDI-TOF dei prodotti ha confermato le strutture attese.

Tabella 1

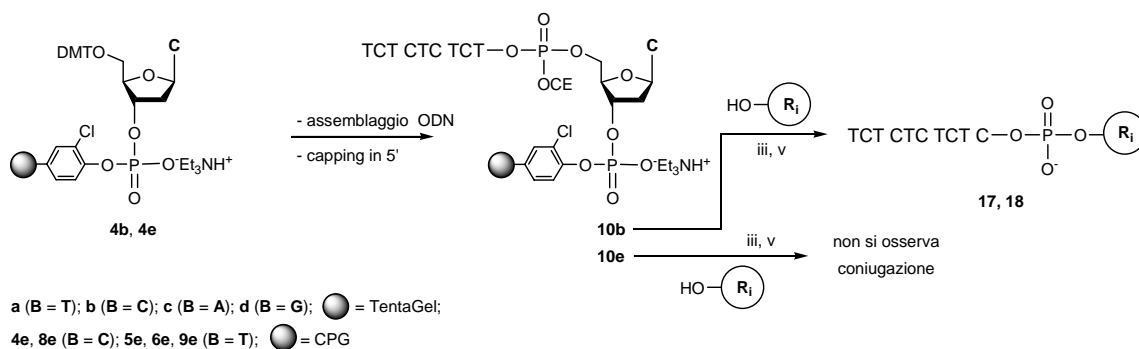
Sequenze Oligonucleotidiche sintetizzate con approccio pre-assemblaggio dell'ODN

ODN	supporto di partenza	Sequenza oligonucleotidica 5'-3'	MS sperimentale / calcolato	t_R , (min)	Resa (%)
6	4a	CTC TCT CTC T-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -N-C(=O)- 	3286.96 3287.63	18.35	41
7	4b	TCT CTC TCT C-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O- 	3351.32 3351.82	34.10	47
13	7c	TCT CTC TCT A-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -N-C(=O)-Lys-Lys-Lys-NH ₂	3484.10 3490.87	13.81	31
14	7d	TCT CTC TCT G-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O- 	3484.44 3480.63	22.21	37
15	8e	TCT CTC TCT C-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -N- 	3263.13 3258.64	15.83	50
16	9e	 -N-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-TGG GAG	2133.22 2130.43	12.45	38

In un esperimento tipico, a partire da 50 mg dei supporti **7 a-d** con una funzionalizzazione media, dopo incorporazione del coniugante, pari a 0.15 meq/g, sono stati recuperati 150-200 OD di oligomeri **11-14** puri, dopo un semplice passaggio di gel filtrazione. Nel caso dei supporti **8e e 9e**, partendo da 50 mg di supporto con una funzionalizzazione media di 0.08 meq/g, sono stati recuperati 80-100 OD dell' oligonucleotide coniugato dopo gel filtrazione.

2.9 Coniugazione *post*-assemblaggio dell'ODN

In un approccio di coniugazione *post*-sintesi dell'ODN, i supporti **4b** e **4e** (Schema 9), previamente trattati con Et₃N/Py (1:1, v/v, 50°C, 1 ora) per rimuovere il gruppo cianoetile al fosfato, sono stati utilizzati per l'assemblaggio, su sintetizzatore automatico di DNA, della sequenza (CT)₅. A sintesi ultimata, l'OH in 5' dell'ultimo residuo nucleotidico è stato acetilato per trattamento con Ac₂O/Py (1:1, v/v, 30 min., t.a.) e sui supporti risultanti è stato effettuata la reazione di condensazione con l'alcol coniugante in presenza di MSNT e piridina per 12 ore a temperatura ambiente.



Schema 9 Coniugazione *post*-assemblaggio dell'ODN

i. accoppiamento con un nucleoside 3'- o 5'- fosforamidito; ii. Et₃N/piridina, 1 ora, 50 °C; iii. Accoppiamento con la chimica del fosfotriestere; iv. Assemblaggio ODN ; v. deprotezione e distacco (NH₄OH, 6 ore, 55 °C).

Per valutare l'efficienza della metodologia proposta, sono stati introdotti sui supporti **10b** e **10e**, quali coniuganti, l'esaetilenglicole, sotto forma di mono-DMT-etero derivato, e il 6-amminoesanolo, protetto alla funzione amminica dal gruppo MmTr quali linker flessibili che consentono, poi, ulteriori funzionalizzazioni dell'oligomero. Le rese di incorporazione, valutate mediante test del catione DMT o MmTr, sono risultate in tutti i casi accettabili e intorno al 60% per il supporto **10b**, mentre per il supporto **10e** sono risultate minori del 5%. Ulteriori esperimenti condotti sul supporto **10e**, anche con alcoli differenti, hanno comunque confermato che l'attivazione della funzione fosfodiesterica mediante l'MSNT non è efficiente su supporti di tipo CPG.

In ogni caso, per i supporti Tentagel, le rese di incorporazione del coniugante sono sempre risultate soddisfacenti ed inoltre è possibile ottimizzare ulteriormente l'incorporazione ripetendo più volte il trattamento con l'alcol e l'MSNT.

Anche in questo caso il distacco degli oligomeri è stato ottenuto mediante un semplice trattamento basico con ammoniaca acquosa a caldo. L'analisi HPLC su una colonna Nucleogel a scambio anionico, dei grezzi distaccati ha dimostrato la presenza di una sola specie, corrispondente ai prodotti **17-19**, la cui struttura è stata confermata mediante analisi di massa MALDI-TOF (Tabella 2).

Tabella 2
Sequenze Oligonucleotidiche sintetizzate con approccio *post*-assemblaggio dell'ODN

ODN	supporto di partenza	Sequenza oligonucleotidica 5'-3'	MS sperimentale/ calcolato	t_R , (min)	Resa (%)
17	10b	TCT CTC TCT C-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -(O-CH ₂) ₄ -O-CH ₂ -CH ₂ -OH	3248.69 3247.63	18.14	25
18	10b	TCT CTC TCT C-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-(CH ₂) ₆ -NH ₂	3099.42 3096.59	17.35	29
19	10b	TCT CTC TCT C-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-β-ciclodestrina	Non trovato 4099.83	18.49	27

L'approccio di coniugazione *post*-sintesi proposto risulta utile per due esigenze sintetiche in particolare: introducendo all'estremità degli oligonucleotidi un linker bifunzionale che presenti una funzione nucleofila all'altra estremità, opportunamente protetta, la metodologia proposta può essere efficacemente estesa anche per la coniugazione di molecole che siano presenti sotto forma di elettrofilici, come ad esempio acidi carbossilici.

Inoltre, molti coniuganti possono presentare legami non stabili ai trattamenti previsti per la sintesi dell'ODN; in tali casi una efficiente coniugazione dell'ODN può essere realizzata solo mediante un approccio *post*-sintetico.

In tale categoria di molecole coniuganti rientra anche la β-ciclodestrina, che è stata scelta come coniugante per l'oligomero **19**.

Studi preliminari, condotti su un supporto ancorante mediante il linker cloro-fenilfosfato, un residuo di 2'-deossiadenosina-5'-O-acetilata ed un'unità di β-

ciclodestrina, hanno mostrato che il residuo di ciclodestrina non è stabile né ai trattamenti acidi né al trattamento ossidativo previsti dal protocollo di sintesi dell'ODN con la chimica del fosforammidito.

Pertanto per la preparazione del coniugato **19**, è stata realizzata dapprima la sequenza (CT)₅ e successivamente è stato effettuato l'accoppiamento con la ciclodestrina sfruttando MSNT come agente attivante, secondo un protocollo fosfotriestereo standard.

Una volta isolato l'ODN coniugato **19** non è stato possibile confermare la struttura mediante esperimenti di massa MALDI-TOF. Infatti, la ciclodestrina non è stabile in presenza delle matrici acide utilizzate di routine per la rivelazione degli ODN mediante MALDI (acido picolinico/acido idrossipicolinico/acido sinapinico). D'altra parte è stato da noi verificato che la matrice comunemente usata per la rivelazione degli oligosaccaridi (DHB) non consente il desorbimento di strutture oligonucleotidiche. Per tale specie, la caratterizzazione è stata effettuata mediante analisi ¹H-NMR dell'oligomero distaccato, che ha mostrato sia i segnali dei nucleosidi, sia i segnali dei residui di glucosio della β-ciclodestrina nel rapporto atteso.

3. CONCLUSIONI

Durante il triennio di dottorato, la vasta tematica degli oligonucleotidi modificati è stata affrontata mettendo a punto due differenti strategie sintetiche entrambe in fase solida; una consente l'ottenimento di oligonucleotidi coniugati all'estremità 3' con mimici di oligosaccaridi a struttura variabile; l'altra, invece, consente la sintesi di oligonucleotidi coniugati all'estremità 3' e 5' con una varietà di molecole organiche in maniera rapida ed efficiente e con un elevato grado di purezza.

Nel primo caso, è stata messa a punto una strategia di sintesi in fase solida on-line che sfrutta supporti solidi Tentagel funzionalizzati opportunamente con unità di glucosio o lattosio scelti come zuccheri modello, per l'assemblaggio della porzione oligosaccaridica, building block costituiti da derivati 1 azido di acidi uronici di lattosio e di glucosio. Partendo da tali specie, mediante riduzione della funzione 1 azido seguita da accoppiamento con il gruppo carbossilico del building block acido uronico, sono stati realizzati una serie di ibridi oligonucleotidici recanti in 3' un dominio oligosaccaridico in cui i legami O-glicosidici sono sostituiti da legami ammidici. Gli ibridi **I**, **II** e **III** sintetizzati sono stati caratterizzati mediante spettrometria di massa MALDI. Su tali specie sono stati condotti esperimenti di denaturazione termica monitorati via UV, ed esperimenti volti a valutarne la stabilità chimica ed enzimatica.

L'altra strategia sintetica messa a punto prevede l'utilizzo di un supporto polimerico insolubile funzionalizzato con un'unità di o-clorofenolo, sul quale la prima unità nucleosidica è incorporata tramite il corrispondente derivato fosforamidato. Il supporto così ottenuto è stato sperimentato in un approccio di coniugazione sia *pre-* che *post-*sintesi dell'ODN e ha consentito una efficiente coniugazione, sia all'estremità 3' che 5' degli oligonucleotidi, di una varietà di molecole organiche purchè aventi un gruppo nucleofilo, amminico o alcolico, mediante attivazione della funzione fosfodiesterica.

Al termine della sintesi un semplice trattamento basico consente il distacco della sola molecola coniugata in forma molto pura.

Sfruttando tale strategia sono stati realizzati numerosi ibridi **11-19** coniugati con molecole quali probe fluorescenti, peptidi, intercalanti, molecole lipofile, carrier ecc.

Bibliografia

- ¹ Stephenson, M. L., Zamecnik, P. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1978**, *75*, 285;
- ² a) Dias, N., Stein, C.A., *Molecular cancer Therapeutics*, **2002**, *1*, 347-355; b) Uhlmann, Peymann, *Chem.Rev.*, **1990**, *90*,4;
- ³ Leumann, J.C., *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 841-854;
- ⁴ Altmann, K-H., Dean, N.M., Fabbro, D., Freier, S.M., Geiger, T.; Häner, R.; Hüsken, D., Monia, B. P., Müller, M., Natt, F.; Nicklin, P.; Phillips, J.; Piele, U.; sasmor, H.; Moser, H.E., *Chimia*, **1996**, *50*, 168;
- ⁵ Freier, S. M., Altmann, K.H. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4429;
- ⁶ a) Eschenmoser, A. *Science*, **1999**, *284*, 2118, b) Eschenmoser, A., Dobler, M., *Helv. Chim. Acta*, **1992**, *75*, 218;
- ⁷ Steffens, R., Leumann, C. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 3249;
- ⁸ Hendrix, C., Rosenmeyer, H., Verheggen, I., Seela, F., Van Aershot, A., Herdewijn, P. *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 110;
- ⁹ a) Braasch, D. A., Corey, D. R. *Chem. Biol.*, **2001**, *8*, 1; b) Wengel, J. *Acc. Chem. Res.*, **1999**, *32*, 301;
- ¹⁰ O'Dwyer, P.J. et al. *J. Drug Targeting* ; **1998**, *4*, 225-234;
- ¹¹ Southern, E. M., Casegreen, J. K., Elder, J. K., Jonshon, K.U., Wang, L., Williams, J. C., *Nucleic Acids. Res.*, **1994**, *22*, 1368;
- ¹² Akhtar, S. et al. *Advanced Drug Delivery*, **2000**, *44*, 3-21e rif. ivi citati;
- ¹³ Goodchild, J., *Bioconjugate Chem.*, **1990**, *1*, 165-187;
- ¹⁴ Virta, P., Katajisto, J., Niittymäki, T., Lönnberg H., *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 5137-5174 e rif. ivi citati;
- ¹⁵ Krieg, A.M., Tonkinson, J., Matson, S., Zhao, Q., Saxon, M., Zhang, L.M., Bhanjia, U., Yakubov, L., Stein, C.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, *90*, 1048-1052;
- ¹⁶ Shea, R.G., Maerstes, J.C., Bischofberger, N., *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3777-3783;
- ¹⁷ Jäschke, A. V., Fürste J. P., Nordhoff, E., Hillenkamp, F., Cech, D., Erdmann, V.A., *Nucleic Acids Res.*, **1994**, *22*, 4810-4817;
- ¹⁸ a) Stetsenko, D.A., Gait, M.J., *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 4900-4908; b) Tung, C. H., Stein, S., *Bioconjugate Chemistry*, **2000**, *11*, 605-618;
- ¹⁹ Agrawal, S., Christodoulou, C., Gait, M.J., *Nucleic Acids Res.*, **1986**, *14*, 6227-6245;
- ²⁰ Misiura, K., Durrant, I., Evans, M.R., Gait, M.J., *Nucleic Acids Res* **1990**, *18*, 86-98;
- ²¹ a) Adamezyk, M., Chan, C. M., Fino, J. R., Mattingly, P. G., *J. Org. Chem*, **2000**, *65*, 596-601; b) Czapinski, J.L., Sheppard, T.L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 8618-8619;
- ²² a) Efimov, V. A., Kalinkina, A. L., Chakhmakhcheva, O. G., *Nucleic Acids Res.*, **1993**, *32*, 1715-1718; b) Li, H., Fedorova, O. S., Trumble, W. R., Fletcher, T. R., Czuchajowski, L., *Bioconjugate Chem.*, **1997**, *8*, 49-56;
- ²³ Hovinev, J., Guzaev, A., Azhayev, A., Lönnberg, H., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1994**, *1*, 2745-2749;

-
- ²⁴ Schmidt, K. S., Filippov, D.V., Meeuwenoord, N. J., Van der Marel, G., Van Boom, J.H., Lippert, B., Reedijk, J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 375-377;
- ²⁵ Stetsenko, D. A., Gait, M. J., *Bioconjugate Chem.*, **2001**, *12*, 576-586 e rif ivi citati;
- ²⁶ Nelson, P. S., Frye, R. A., Liu, E., *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*, 7187-7194;
- ²⁷ Nelson, P. S., Kent, M., Muthini, S., *Nucleic Acids Res.*, **1992**, *23*, 6253-6259;
- ²⁸ Theisen, P., McCollum, C., Upadhy, K., Jacobsen, K., Andrius, A., *Tetrahedron Letters*, **1992**, *33*, 5033-5036;
- ²⁹ Lin, K. Y., Matteucci, M., *Nucleic Acids Res.*, **1991**, *19*, 3111-3114;
- ³⁰ De Napoli, L., Di Fabio, G., Messere, A., Varra, M., Piccialli, G., Pepe, A., *Gazz. Chim. Ital.*, **1996**, *126*, 755-759;
- ³¹ Sheppard, T. L.; Wong, C. H.; Joyce, G. F. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 3660-3663;
- ³² Adinolfi, M., Barone, G., De Napoli, L., Guariniello, L., Iadonisi, G., Piccialli, G. *Tetrahedron Letters*, **1999**, *40*, 2607-2610;
- ³³ Adinolfi, M., De Napoli, L., Di Fabio, G., Iadonisi, A., Montesarchio, D., Piccialli, G. *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 6697-6704;
- ³⁴ Adinolfi, M., De Napoli, L., Di Fabio, G., Guariniello, L., Iadonisi, A., Messere, A., Montesarchio, D., Piccialli, G. *Synlett*, **2001**, *6*, 745-748;
- ³⁵ Lis, H.; Sharon, N., *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 637-674;
- ³⁶ Gruner, S. A. W.; Locardi, E.; Lohof, E.; Kessler, H. *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 491-514;
- ³⁷ a) Hang, H. C.; Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.*, **2001**, *34*, 727-736; b) Davis, B. G.; Lloyd, R. C.; Jones, J. B. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 9614-9615;
- ³⁸ Malkinson, J. P.; Falconer, R. A.; Toth, I. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 5249-5252;
- ³⁹ Silva, D. J.; Sofia, M. J. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 855-858;
- ⁴⁰ a) Sofia, M. J.; Hunter, R.; Chan, T. Y.; Vaughan, A.; Dulina, R.; Wang, H.; Gange, D. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 2802-2803; b) Ghosh, M.; Dulina, R. G.; Kakarla, R.; Sofia, M. J. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 8387-8390;
- ⁴¹ a) Lehman, I. R.; Pratt, E. A. *J. Biol. Chem.*, **1960**, *235*, 3254-3259; b) Gommers-Ampt, J.; van Leeuwen, F.; de Beer, A. L. J.; Viliegenthart, J. F. G.; Dizdarouglu, M.; Kowalak, J. A.; Crain, P. F.; Borst, P. *Cell*, **1993**, *75*, 1129; c) van Leeuwen, F.; Taylor, M. C.; Mondragon, A.; Moreau, H.; Gibson, W.; Kieft, R.; Borst, P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *USA*, *95*, 2366;
- ⁴² a) Wiberg, J. S. *J. Biol. Chem.*, **1967**, *242*, 5824; b) Revel, H. R. in *DNA modification: Glucosylation - Bacteriophage T4*, Eds. Mathews, C. K.; Kutter, E. M.; Mosig, G.; Berget, P.B. Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., USA, **1983**, pp. 156-165; c) Gommers-Ampt, J.; Borst, P. *FASEB J.*, **1995**, *9*, 1034-1042; d) Janosi, L.; Yonemitsu, H.; Hong, H.; Kaji, A. *J. Mol. Biol.*, **1994**, *242*, 45-61; e) Berkner, K. L.; Folk, W. R. *J. Biol. Chem.*, **1977**, *252*, 3185-3193; f) Cross, M.; Kieft, R.; Sabatini, R.; Wilm, M.; de Kort, M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; van Leeuwen, F.; Borst, P. *EMBO J.*, **1999**, *18*, 6573-6581;
- ⁴³ a) Letsinger, R. L.; Finan, J. L.; Heavner, G. A.; Lunsford, W. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 3278-3279; b) Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *48*, 2223-2311;

-
- ⁴⁴ de Kort, N.; de Visser, P. C.; Kurzeck, J.; Meeuwenoord, N. J.; van der Marel, G. A.; Rüger, W.; van Boom, J. H. *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 2075-2082;
- ⁴⁵ a) Wyatt, G. R.; Cohen, S. S. *Nature*, **1952**, *170*, 1072-1073; b) Lamm, N.; Wang, Y.; Mathews, C. K.; Rüger, W. *Eur. J. Biochem.*, **1988**, *172*, 553-563; c) Josse, J.; Kornberg, A. *J. Biol. Chem.*, **1962**, *237*, 1968-1976; d) Wyatt, G. R.; Cohen, S. S. *Biochem. J.*, **1953**, *55*, 774-782;
- ⁴⁶ Adinolfi, M., De Napoli, L., Di Fabio, G., Iadonisi, A., Montesarchio, D. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 1879-1886;
- ⁴⁷ D'Onofrio, J., de Champdorè, M., De Napoli, L., Montesarchio, D., Di Fabio, G. *Bioconjugate Chem.*, **2005**, *16*, 1299-1309;
- ⁴⁸ a) von Roedern, E. G.; Lohof, E.; Hessler, G.; Hoffmann, M.; Keslker, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 10156-10167; b) Kallus, C.; Opatz, T.; Wunberg, T.; Shmidt, W.; Henke, S.; Kunz, H. *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 7783; c) Wunberg, T.; Kallus, C.; Opatz, T.; Henke, S.; Shmidt, W.; Kunz, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2503;
- ⁴⁹ a) Nicolaou, K. C.; Flörke, H.; Egan, M. G.; Barth, T.; Estevez, V. A. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 1775; b) Müller, C.; Kitas, E.; Wessel, H. P. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 2425; c) Wessel, H. P.; Mitchell, C. M.; Lobato, C. M.; Schmid, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, *34*, 2712; d) Suhara, Y.; Hildreth, J. E. K.; Ichikawa, Y. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 1575; e) Suhara, Y.; Hildreth, J. E. K.; Ichikawa, Y. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 2549; f) Anisfeld, S. T.; Lansbury, P. T. *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 5560-5562;
- ⁵⁰ a) Kunz, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1987**, *26*, 294; b) Kunz, H., Waldmann, H. (1985) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, *24*, 883.
- ⁵¹ Drouillat, B., Kellam, B., Dekany, G., Starr, M. S., Toth, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *39*, 2247-2250;
- ⁵² D'Onofrio, J., De Napoli, L., Montesarchio, D., Di Fabio, G. *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 4927-4930;
- ⁵³ De Napoli, L., Di Fabio, G., D'Onofrio, J., Montesarchio, D. *Chem. Commun.* **2004**, 2586-2588;

CAPITOLO 3

SINTESI IN FASE SOLIDA DI OLIGONUCLEOTIDI ADATTI ALLA FORMAZIONE DI STRUTTURE QUADRUPLEX

1. INTRODUZIONE

La tendenza di oligonucleotidi ricchi di guanine a formare strutture quadruplex è nota da circa 40 anni¹; tali strutture posseggono un'inusuale mobilità elettroforetica e sono stabilizzate da tetradi di G². Queste tetradi consistono in un arrangiamento planare di quattro guanine associate attraverso un'organizzazione ciclica di legami ad idrogeno in cui ciascuna base contemporaneamente dona e riceve due legami (Figura 1).

Alla stabilità delle strutture elicoidali (G-quadruplex) contribuiscono delle forti interazioni di "stacking" tra i piani adiacenti di G-tetradi distanti circa 3.4 Å in cui ogni tetrad è avvolta secondo un'avvolgimento destrorso. La formazione di G-quadruplex richiede la presenza di cationi metallici che giocano un ruolo importante nella stabilizzazione della struttura. Ioni metallici possono coordinare piani adiacenti di G attraverso quattro gruppi carbonilici elettronegativi delle guanine, che sono dirette verso il centro di ciascuna tetrad (Figura 2).

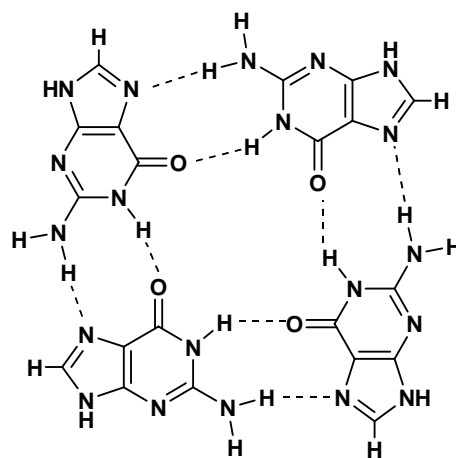


Figura 1 Tetrade di G

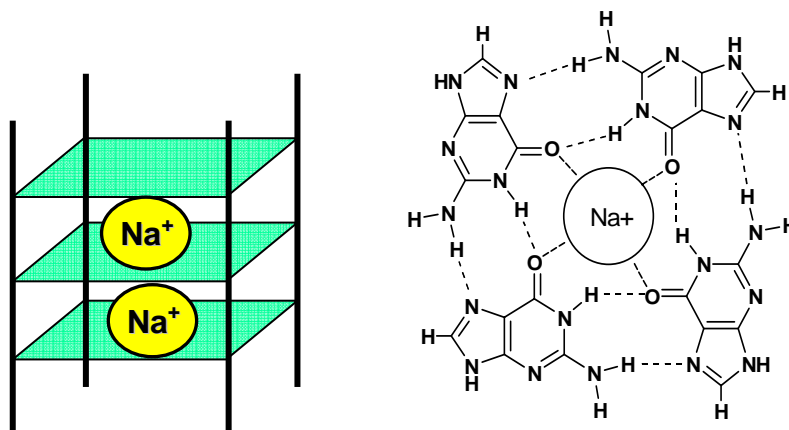


Figura 2 Struttura di una quadruplex con ioni sodio disposti tra piani adiacenti di tetradi di G; Tetrade di G con uno ione sodio al centro

Nonostante strutture quadruplex siano state osservate solo in vitro, negli ultimi anni l'interesse nei confronti di tali specie è notevolmente aumentato, essendo state rinvenute molte evidenze della loro esistenza in vivo. Sequenze ricche di guanine, in grado di strutturarsi in quadruplex, si ritrovano nelle nucleasi, elicasi e in molte regioni significative del genoma umano, quali i telomeri e in sequenze strettamente correlate con alcune malattie umane³.

Sembra che G-quadruplex siano coinvolte nella ricombinazione di sequenze ricche di G⁴, nella protezione ed elongazione dei telomeri⁵ e nella regolazione trascrizionale⁶. In aggiunta alla completa comprensione dei ruoli svolti in vivo dalle G-quadruplex, recentemente un grosso sforzo di ricerca in questo settore è diretto verso due obiettivi principali: a ritrovare potenziali farmaci nelle terapie anticancro e nel design di nuovi aptameri degli acidi nucleici, specie che sono in grado di legarsi ed inibire l'azione di particolari proteine.

La prima applicazione prende origine dall'osservazione che la formazione di G-quadruplex stabili alle estremità 3' dei telomeri può inibire l'azione dell'enzima telomerasi, superespresso nelle cellule tumorali che in tal modo sfuggono all'invecchiamento e quindi alla morte cellulare programmata⁷. Infatti, l'induzione in vivo delle telomerasi può trasformare cellule sane in malate.

La seconda applicazione è mirata a produrre opportuni aptameri, basati su strutture quadruplex, in grado di legarsi in maniera specifica ad alcune proteine⁸ ad esempio fattori di trascrizione, promotori ecc. che in tal modo competono significativamente con il DNA per i siti di legame sulla proteina, saturandoli. Ad esempio, ODN che formano strutture quadruplex sono risultati dei potenti inibitori dell'integrasi dell'HIV1, l'enzima responsabile dell'inserzione del DNA virale all'interno del genoma della cellula ospite⁹.

Numerose sono le possibili conformazioni assunte da una quadruplex di DNA: in tutti i casi le caratteristiche strutturali, così come le loro proprietà cinetiche e termodinamiche dipendono dalla sequenza oligonucleotidica scelta e dallo ione metallico utilizzato per il binding.

1.1 Arrangiamento strutturale delle G-quadruplex

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi strutturali per comprendere a fondo la struttura di queste specie; tali studi sono stati condotti tramite metodiche di diffrazione ai raggi X, spettroscopia Raman, studi di dicroismo circolare ed NMR ed hanno confermato la convinzione che queste regioni ricche di guanine sono caratterizzate da uno stupefacente polimorfismo¹⁰.

Le G-quadruplex possono essere classificate in base al numero di filamenti che si associano (uno, due, quattro) a formare l'intera struttura. Sono poi ulteriormente classificate in base all'arrangiamento e all'orientazione dei filamenti; questi possono essere tutti paralleli, uno antiparallelo e

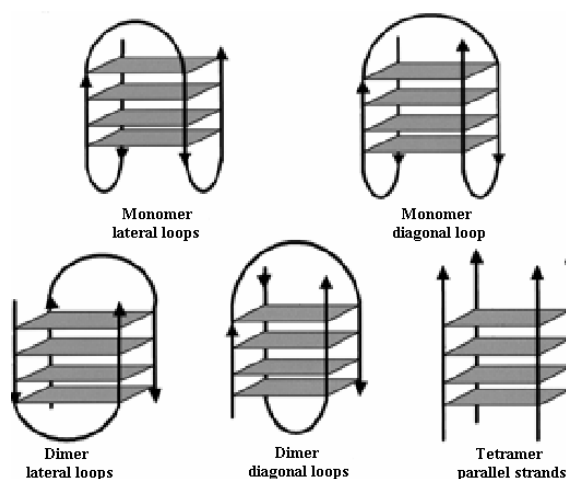


Figura 3 Differenti strutture G-quadruplex

tre paralleli, filamenti adiacenti paralleli o alternativamente paralleli e antiparalleli (Figura 3).

Possono essere ancora classificate in base alla conformazione sin o anti dei legami N-glicosidici delle basi. Solitamente nel DNA le basi si ritrovano esclusivamente in conformazione anti; invece in questo caso, possono essere anche in conformazione sin.

Una conseguenza di questa variazione nella conformazione glicosidica è la differente energia di stacking e la diversa orientazione delle basi oltre che della natura dei solchi che si formano tra i filamenti di DNA. Infatti normalmente il DNA presenta due solchi, uno maggiore e uno minore; invece nel caso delle G-quadruplex si formano quattro solchi che non sono necessariamente identici. Se i legami N-glicosidici di una tetrad sono tutti anti, i quattro solchi sono identici e di grandezza media; se c'è, invece, un'alternanza sin-anti-sin-anti, due solchi presentano una distanza tra i due gruppi fosfato di 7-9 Å e due una distanza maggiore.

Infine, se l'orientazione è sin-sin-anti-anti, i solchi sono tutti di grandezza diversa tra loro. La dimensione di questi solchi gioca un ruolo importante nel riconoscimento specifico delle G-quadruplex da parte di specifici ligandi.

Un altro elemento che consente la classificazione di queste specie è la natura dei loop che connettono i vari filamenti della quadruplex. Questi possono essere classificati in tre famiglie principali: loop che connettono due filamenti adiacenti antiparalleli, loop diagonali che connettono due filamenti antiparalleli opposti, e loop che connettono filamenti adiacenti paralleli. Solitamente oligonucleotidi con una singola sequenza ricca di residui di 2'-deossiguanosine, formano quadruplex tetramolecolari con quattro filamenti paralleli (spesso chiamate quadruplex lineari) e con tutte le guanine in conformazione anti. Ciò suggerisce che questa struttura sia preferita in assenza di loop; così come per una quadruplex unimolecolare, i tre loop costringono le catene di G-quadruplex ad essere tutte antiparallele. In conclusione l'effetto combinato di tutti i fattori sopra citati dà luogo a differenti topologie di G-quadruplex.

1.2 Utilizzo di ODN G-quadruplex nelle terapie anticancro

Le estremità 3' dei cromosomi, dette telomeri, sono costituite da porzioni di DNA e da varie proteine ad esso associate; il DNA telomerico è strutturato in forma duplex ma le estremità 3' sono costituite da filamenti ricchi di guanine, che adottano strutture quadruplex di varia tipologia¹¹ (Figura 4).

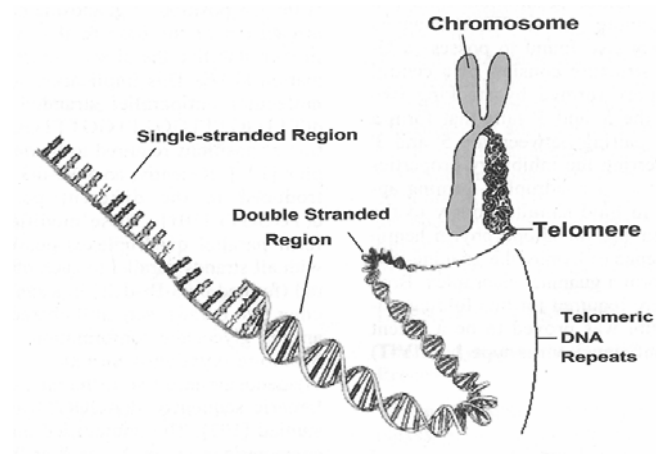


Figura 4 Struttura del DNA telomerico

Nelle cellule normali, i telomeri progressivamente si accorciano durante il processo di replicazione, in quanto le DNA polimerasi non sono in grado di copiare con assoluta fedeltà le estremità del DNA telomerico¹². Ad ogni ciclo replicativo, il DNA telomerico delle cellule eucariotiche è accorciato di circa 80-100 basi fino ad uno stadio cruciale in cui non è più possibile la replicazione e si ha la morte cellulare¹³.

Tale accorciamento progressivo, per quanto evitato dalla telomerasi, un enzima che catalizza la sintesi di DNA telomerico all'estremità 3', è comunque un fenomeno inevitabile dovuto anche ad una progressiva perdita di attività dell'enzima stesso. Un'attività telomerasica anormale è riscontrata in molte cellule tumorali; tale enzima mantenendo inalterata la lunghezza dei telomeri, gioca quindi un ruolo importante nello sviluppo dei tumori stessi¹⁴.

Questo, dunque, è il punto di partenza per lo sviluppo di inibitori della telomerasi come potenziali agenti anticancro¹⁵.

Nel 1991, Zahler e collaboratori hanno scoperto che il folding di DNA ricco di G in forma quadruplex inibisce in vitro l'azione della telomerasi¹⁶. Dunque, un approccio promettente per inibire la telomerasi in cellule tumorali prevede il targeting di strutture di DNA in G-quadruplex che si pensano coinvolte nella funzione di telomeri e telomerasi.

Il primo farmaco trovato che inibisce l'attività della telomerasi umana è stato il 2,6-diamidoantrachinone, utilizzato sulla sequenza 5'-TTAGGG-3'¹⁷; successivamente si è visto che anche altre molecole sono in grado di interagire con strutture G-quadruplex come fluorenoli, acridine disostituite, porfirine cationiche ed altre ancora.

Recentemente, è stato scoperto che nelle cellule della leucemia mieloide acuta, la telomastatina induce un accorciamento dei telomeri portando all'apoptosi cellulare e ad una elevata risposta al trattamento con daunorubicina e citosina arabinoside¹⁸. Ancora, si è visto che la telomastatina esercita un effetto antiproliferativo nelle cellule del mieloma multiplo attraverso l'inibizione della telomerasi e la conseguente riduzione nella lunghezza dei telomeri¹⁹.

Tutti questi risultati rivelano che la telomerasi è un importante target terapeutico per la cura del mieloma multiplo e che le specie che interagiscono con le sequenze telomeriche in G-quadruplex possono essere degli importanti agenti anticancro. Le strutture G-quadruplex sono anche coinvolte nel controllo trascrizionale del gene c-MYC²⁰. La superespressione dell'oncogene c-MYC è associata ad una varietà di tumori umani: del colon, della cervice, con l'osteoblastoma, leucemie, ecc²¹.

La regione NHE III₁ può formare G-quadruplex ed è un punto cruciale per il processo della trascrizione; dunque specie che si legano in maniera specifica a tale G-quadruplex possono essere dei buoni agenti anticancro²⁰. Infatti, ligandi di G-quadruplex, noti come inibitori delle telomerasi, stabilizzano la formazione di una quadruplex intramolecolare per la specie c-MYC e possono essere utilizzati per inibire la trascrizione di tale gene nelle cellule tumorali.

1.3 ODN formanti G-quadruplex come aptameri²²

Gli aptameri sono piccoli frammenti di acidi nucleici che si legano in maniera specifica a target molecolari. Le molecole target sono svariate e includono da proteine, acidi nucleici fino a piccole molecole organiche^{8a}. Il termine aptamero deriva dal greco $\alpha\pi\tau\epsilon\iota\nu$ che vuol dire “legare a” e può essere esteso a tutti gli acidi nucleici che mostrano attività quali potenziali agenti terapeutici. Un modo per ottenere oligonucleotidi con elevata attività e specificità per determinate molecole target consiste nell’evoluzione sistematica dei ligandi realizzata attraverso una tecnologia di arricchimento sequenziale (SELEX)²³. In tal modo gli aptameri sono selezionati in vitro a partire da una libreria combinatoriale che contiene un numero molto elevato di sequenze.

È stato osservato che alcuni aptameri formano strutture quadruplex e tra queste l’aptamero più studiato è il TBA (thrombin-Binding-Aptamer), un pentadecamero ricco di guanine che adotta in soluzione una struttura G-quadruplex intramolecolare. Ancora, è stato ritrovato che uno degli aptameri che lega l’RNasi H1 umana è strutturato in G-quadruplex; così come è in grado di legarsi contemporaneamente alla proteina citocromo c e all’emina metalloporfirina. Infine, si è visto che strutture G-quadruplex sono delle potenti inibitrici della replicazione del virus dell’HIV1 umano^{9,24}.

In alcuni casi, gli aptameri non possono essere adoperati direttamente in vivo, ma richiedono un adattamento alle condizioni di vita delle cellule. Ancora, possibili utilizzazioni degli acidi nucleici per scopi terapeutici sono realizzabili solo per molecole che siano stabili in condizioni fisiologiche.

Per aumentare l’affinità degli aptameri per i loro target e contemporaneamente per aumentare la loro stabilità all’interno di fluidi biologici, sono stati utilizzati numerosi oligonucleotidi modificati. Le modifiche chimiche possono impartire maggiore stabilità alle strutture quadruplex, oppure possono aumentare la stabilità agli enzimi nucleasici²⁵. Purtroppo, il design di nuovi aptameri è un aspetto piuttosto complesso della chimica sintetica, in quanto numerosi fattori riguardanti la stabilità ed attività di queste molecole non sono ancora stati chiariti. La crescente capacità dei chimici di

sintetizzare oligonucleotidi modificati, insieme con lo sviluppo di sempre più approfonditi studi chimici e biofisici, ha prodotto un notevole progresso nella produzione di aptameri con migliori proprietà chimico-fisiche e biologiche che hanno un significativo impatto biotecnologico sullo sviluppo di nuovi farmaci. L'incorporazione di basi modificate all'interno di sequenze oligonucleotidiche può produrre utili variazioni nelle proprietà chimico-fisiche e biologiche dei frammenti di DNA risultanti, oppure può produrre maggiore resistenza agli enzimi nucleolitici²⁴. Ancora, le modifiche possono essere utili per mantenere la concentrazione del farmaco in situ per il tempo richiesto²⁶. Generalmente, gli aptameri modificati sono utilizzati per incrementare le interazioni con i loro target. In alcuni casi, le modifiche favoriscono la funzionalità di queste molecole.

Tuttavia, ancora pochi sono i lavori disponibili in letteratura sulle modifiche di strutture quadruplex utilizzate come aptameri.

Modifiche sono state proposte allo scopo di aumentare l'attività contro il virus dell'HIV1 umano²⁷ o l'attività antiproliferativa per un determinato tipo di cellule tumorali²⁸. Altri studi sono stati dedicati alla caratterizzazione strutturale e biofisica di quadruplex modificate di sequenze telomeriche²⁹.

Una modifica interessante ha previsto la bromurazione di una guanosina in una struttura quadruplex³⁰. Tale linea di ricerca ha preso spunto dagli studi sull'importanza biologica di ciclici 3'-5' monofosfato dell'8-bromoguanosina³¹. Si è visto che la presenza al carbonio in 8 di un sostituito ingombrante può spostare l'equilibrio conformazionale del legame glicosidico da anti a sin. Tale effetto è stato studiato su una quadruplex unimolecolare antiparallela di sequenza TTTGGTTTGGTTTGGTTTGG, in cui la conformazione anti adottata destabilizzava la quadruplex³². Risultati analoghi sono stati ottenuti anche su altre sequenze tipiche dei telomeri umani: TGGGT²⁸, AGGGT e TAGGGT³³.

Un'interessante modifica strutturale consiste nell'introdurre una porzione di PNA all'interno dello scheletro oligonucleotidico, formando in tal modo chimere DNA-PNA, molecole dalle interessanti proprietà biologiche come agenti antisenso³⁴ ed antigene³⁵.

Si è visto che sequenze PNA-DNA ricche di guanine sono in grado di formare strutture quadruplex³⁶ e questo può essere importante considerando che il tratto di

PNA può aumentare la stabilità contro l'azione degradativa delle esonucleasi e inoltre favorire processi di riconoscimento nei confronti di proteine che legano selettivamente strutture quadruplex³⁷.

Ancora un'altra classe di analoghi è costituita dai "Locked Nucleic Acids" (LNA), promettenti molecole antisense in vitro ed in vivo³⁸. È stato visto che un oligomero contenente LNA di sequenza TGGGT forma una struttura quadruplex stabili in soluzione³⁹; dunque, le interessanti proprietà delle quadruplex LNA possono aprire nuove prospettive per le applicazioni biologiche degli LNA come nuovi aptameri.

1.4 TG₃AG modificati in 5'

Negli ultimi anni, un ampio numero di oligonucleotidi antisense e di oligonucleotidi che formano strutture triplex sono stati progettati, sintetizzati e saggiati quali potenziali agenti anti HIV^{9,23}. L'HIV1 è stato il virus più studiato come target di ODN naturali e modificati⁴⁰. Questi ODN agiscono a diversi livelli, incluso il binding a specifiche cellule target. Si legano anche all'RNA virale e prevengono la sintesi del DNA provirale attraverso l'inibizione della trascrizione inversa. In ogni caso si è visto che ODN che si aggregano in strutture inter e intra molecolari di ordine più elevato, quali le quadruplex, sono stati individuati come potenti farmaci anti-HIV che agiscono attraverso differenti meccanismi. Tra questi AR177 è un 17-mer costituito solo da residui di 2'-deossiguanosina e timidina con legame internucleosidico di tipo tioato, avvolto in una struttura di G-quadruplex. Questa molecola è fortemente resistente all'attività delle nucleasi e possiede un'elevata attività antivirale dovuta sia al legame tioato che

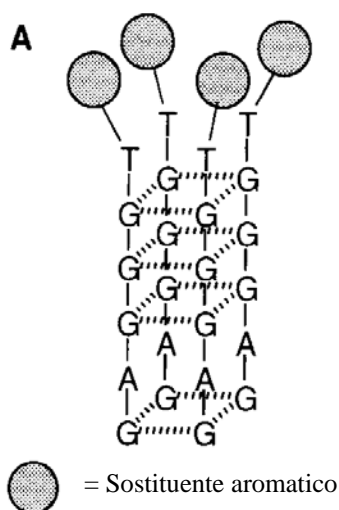


Figura 5 Struttura della G-quadruplex con un sostituito aromatico all'estremità 5'

alla strutturazione in quadruplex⁴¹.

Ancora, Furukawa e collaboratori hanno riportato che un 15-mer con legami internucleosidici di tipo fosfodiesterico e con un gruppo dimetossitritile all'estremità 5', complementare ad un tratto della proteina TAT del virus dell'HIV-1, possiede anch'esso una potente attività contro il virus dell'HIV-1⁴². Successivamente numerosi gruppi di ricerca si sono interessati a questa sequenza ed hanno verificato che la più corta sequenza attiva è il 6-mer 5'TGGGAG^{3'}.

Studi condotti dal gruppo di Hotoda hanno portato alla conclusione che frammenti non modificati dell'ON in questione non presentano attività contro l'HIV-1, mentre legando all'estremità 5' del frammento un gruppo aromatico, l'ON esplica una notevole attività antivirale e risulta contemporaneamente poco citotossico⁴³.

In particolare hanno focalizzato l'attenzione sulla sequenza recante in 5' dapprima il gruppo dimetossitritile (DMT). Data la labilità di tale gruppo in ambiente acido, sono stati anche sintetizzati vari esameri recanti in 5' altri gruppi aromatici simili al DMT e si è potuto osservare che la sequenza recante un gruppo 3,4-dibenzilossibenzile (DBB) risulta una molecola con ottime proprietà antivirali. Sottoponendo 5'TGGGAG^{3'} non modificato a denaturazione termica è stato possibile dimostrare che la presenza di quattro guanine pressoché consecutive favorisce la formazione di una struttura elicoidale, detta "quadruplex", costituita da quattro catene nucleotidiche disposte in parallelo tra loro (Figura 5). La presenza del gruppo DBB in 5' contribuisce ad aumentare ulteriormente la stabilità di tale struttura, probabilmente grazie all'instaurarsi di interazioni idrofobiche.⁴⁴ Una plausibile spiegazione di questi dati è che l'attività biologica di questa particolare sequenza è determinata dalla capacità di organizzarsi in strutture quadruplex, che risulterebbero significativamente più stabili in presenza di un sostituito aromatico di adeguate dimensioni all'estremità 5'.

Il vero e proprio meccanismo d'azione dell'oligo DBB-5'-d(TGGGAG) contro l'HIV-1 è stato chiarito solo successivamente con esperimenti *in vitro*, che hanno dimostrato la capacità del composto d'interagire sia con un particolare sito presente sulla glicoproteina virale di superficie *gp120* (che normalmente lega i recettori CD 4 presenti sulle cellule immunitarie bersaglio), sia con la struttura dei recettori cellulari stessi in corrispondenza di una regione nota come *loop V3*.⁴⁵

Queste interazioni impedirebbero, da un lato, l'adsorbimento del virus alle cellule linfocitiche MT-4, dall'altro una possibile trasmissione del materiale virale mediata da adesione tra i linfociti stessi.

2. RISULTATI E DISCUSSIONE

I dati raccolti da Hotoda^{41,42,46} hanno evidenziato che la sequenza TGGGAG, quando non è modificata, non esplica attività nei confronti del virus; viceversa, la stessa sequenza recante in 5' il gruppo 3,4-dibenzilossibenzile (DBB) mostra una potente attività inibitrice con un valore di $I_c 50$ pari a 0.37 μM e non presenta citotossicità per concentrazioni fino a 40 μM .

Spettri CD di tali sequenze hanno dimostrato che la presenza del sostituente aromatico favorisce fortemente la strutturazione in quadruplex della sequenza. Inoltre, sequenze in cui una delle guanosine è sostituita con una timidina non riescono a strutturarsi in quadruplex e non mostrano alcuna attività anti HIV-1; ancora, sequenze recanti in 3' il gruppo tert-butil dimetilsilile, o sequenze recanti in 5' un gruppo aromatico relativamente piccolo, quale il benzile, riescono a strutturarsi in quadruplex ma non mostrano rilevante attività anti HIV-1. Da una razionalizzazione dei dati raccolti, è risultato che sia la possibilità per la sequenza di strutturarsi in quadruplex che la presenza in 5' di un gruppo aromatico di dimensioni adeguate sono requisiti fondamentali perché tali esameri esplichino, da aptameri, la loro attività anti-HIV-1.

Confortati da tali dati, e poiché non sono stati condotti studi strutturali approfonditi volti a comprendere le relazioni esistenti tra la struttura e l'attività di tali sequenze, durante il dottorato si è focalizzata l'attenzione su tre delle sequenze studiate da Hotoda che mostrano la massima attività anti-HIV-1: la sequenza recante in 5' il gruppo DMT, TBDPhSi e il DBB. Tali sequenze sono state sintetizzate e su di esse sono in corso studi per una completa caratterizzazione chimico-fisica di tali quadruplex, condotta mediante DSC e CD, in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Guido Barone del dipartimento di Chimica dell'Università degli studi di Napoli "Federico II".

2.1 Sintesi della sequenza ^{DMT}TG₃AG

La sintesi della sequenza **1** ^{5'}TGGGAG^{3'}, recante in 5' il gruppo aromatico DMT, è stata realizzata sfruttando monomeri nucleosidici 3'-fosforamidito commercialmente disponibili. L'assemblaggio della sequenza è stato effettuato su sintetizzatore automatico di DNA a partire da un supporto CPG con funzionalizzazione pari a 0.1 meq/g, recante ancorato il primo monomero nucleosidico dG. La sequenza è stata assemblata secondo un classico protocollo di sintesi automatizzata, basata sulla chimica del fosforamidito, non procedendo a rimozione del gruppo DMT sull'ultimo monomero dT introdotto.

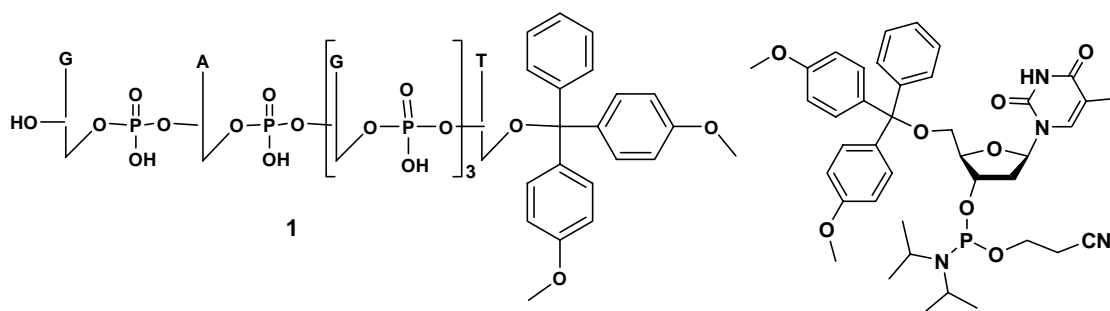


Figura 6 Sequenza ^{DMT}TG₃AG e monomero di timidina utilizzato per l'assemblaggio

A sintesi ultimata, un trattamento basico con NH₄OH concentrata, a 50°C per 18 ore, ha consentito il distacco della sequenza dal supporto e la totale deprotezione dell'oligonucleotide. Il grezzo distaccato è stato purificato mediante HPLC su una colonna a fase inversa (NUCLEOSIL 100-5 C18) usando come eluenti una soluzione 0.1 M di TEAB e CH₃CN. L'analisi di massa MALDI-TOF per il picco principale eluito a 17 min., dopo desalificazione su Sephadex G25 eluita con acqua, ha confermato la struttura attesa.

2.2 Sintesi della sequenza ^{TBDPhSi}TG₃AG

La sequenza **2** recante in 5' il gruppo TBDPhSi è stata assemblata su sintetizzatore automatico di DNA sfruttando una resina CPG con funzionalizzazione

pari a 0.1 meq/g, recante ancorato il primo monomero nucleosidico dG. Gli altri 4 nucleotidi sono stati introdotti sfruttando monomeri 3' fosforammidito protetti in 5' con il gruppo DMT, commercialmente disponibili. Per inserire il gruppo TBDPhSi in 5' è stato necessario preparare *ad hoc* il derivato 3'-fosforammidito della timidina **4** (Figura 7), che è stato utilizzato per l'ultimo accoppiamento su sintetizzatore automatico di DNA.

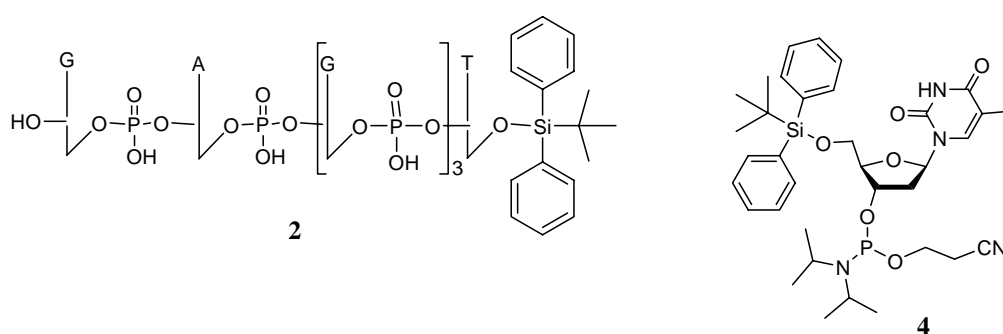
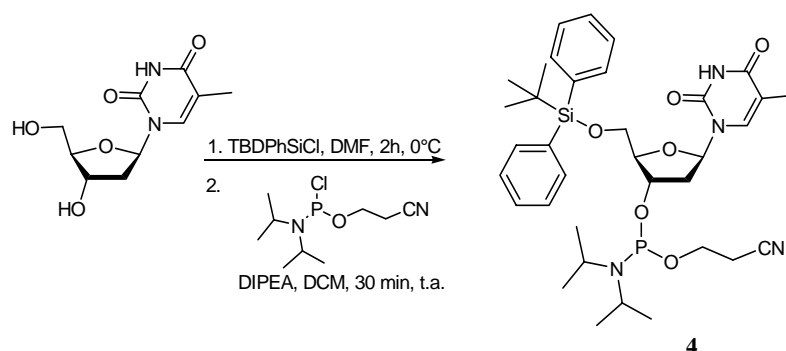


Figura 7 Sequenza ^{TBDPhSi} TG₃AG e monomero utilizzato per l'assemblaggio

La sintesi di tale monomero riportata nello Schema 1, ha previsto dapprima la protezione dell'OH in 5' mediante reazione della timidina con TBDPhSiCl in DMF e imidazolo a 0°C per 2 ore. Successivamente è stata condotta la reazione di fosfitilazione dell'OH in 3' con 2-cianoetil diisopropilclorofosforammidito e DIPEA in DCM per 30 min a temperatura ambiente.

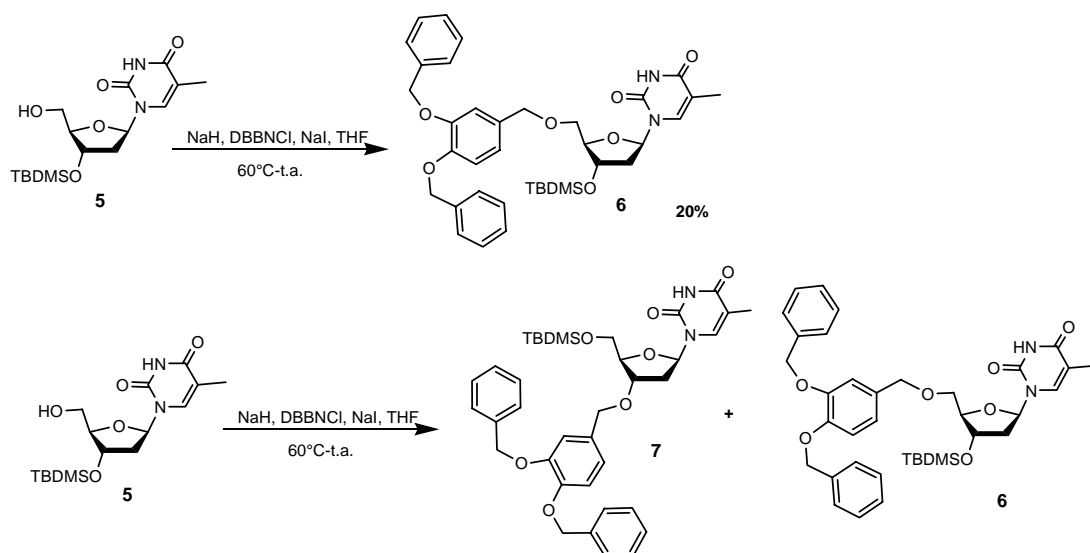


Schema 1 Sintesi di Timidina 5' *tert*-butildifenilsilile,3'-fosforammidito

Al termine dell'assemblaggio della sequenza oligonucleotidica, un trattamento basico con NH_4OH concentrata a 50°C per 18 ore ha consentito il distacco della sequenza dal supporto in forma deprotetta. Il grezzo distaccato è stato purificato mediante HPLC su una colonna a fase inversa (NUCLEOSIL 100-5 C18) usando come eluenti una soluzione 0.1 M di TEAB e CH_3CN . L'analisi di massa MALDI-TOF per il picco principale eluito a 15.00 min., dopo desalificazione su Sephadex G25 eluita con acqua, ha confermato la struttura attesa.

2.3 Sintesi della sequenza $\text{DBB}^{\text{DBB}}\text{TG}_3\text{AG}$

La sintesi dell'oligomero recante in 5' il gruppo DBB, a differenza delle altre due sequenze modificate descritte in precedenza, ha richiesto maggiori accorgimenti sintetici e la messa a punto di un schema sintetico per l'ottenimento del monomero timidina 5'-O-dibenzilossibenzile-3'-fosforammidito. In letteratura⁴⁵, è riportata una alchilazione diretta della timidina 3'-O-*tert*-butildimetilsilile condotta con DBBCl ed NaI in THF; questa reazione è effettuata attivando dapprima il substrato con NaH a 60°C per 2 ore e, successivamente, prevede l'aggiunta dell'agente alchilante, lasciando la miscela di reazione a temperatura ambiente per 18 ore.



Schema 2 Alchilazione diretta della 3'-*tert*-butildimetilsilil timidina

In tali condizioni di reazione oltre ad osservare rese di alchilazione molto basse (30%) è riportata come sottoreazione –di cui gli autori non specificano l'importanza in percentuale- una parziale migrazione del gruppo TBDMS dall'OH in 3' a quello in 5', con conseguente formazione di due prodotti: uno alchilato in posizione 5' ed uno alchilato in posizione 3'⁴⁷ (Schema 2).

Per poter sintetizzare la 5'-O-dibenzilossibenzil timidina, abbiamo ripetuto tale alchilazione, in varie condizioni di reazione.

Purtroppo, in nessun caso è stata osservata la formazione del prodotto desiderato, ottenendosi piuttosto il prodotto di alchilazione sull'N3 della base eterociclica.

Forzando le condizioni di reazione, è stato isolato, come unico prodotto, il derivato **8** (Figura 8), prodotto di bis alchilazione sull'OH in 5' del ribosio e sull'N3 della base eterociclica.

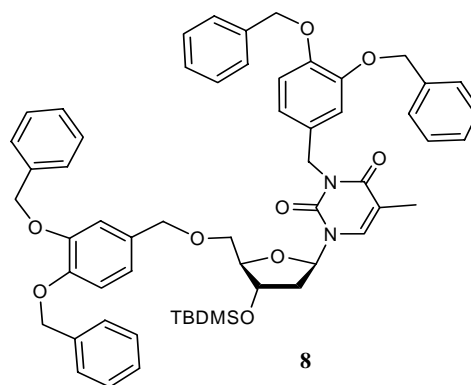


Figura 8 Prodotto di bis alchilazione ottenuto

A partire da tali risultati, è stata quindi progettata una sequenza sintetica alternativa che prevede un gruppo protettore per l'OH in 3' maggiormente stabile alle condizioni di reazione per l'alchilazione ed una protezione transiente per l'N3 della base eterociclica. Il gruppo protettore scelto per l'OH in 3' è stato il DMT; un DMT-etero è notevolmente stabile alle condizioni basiche previste per l'alchilazione con NaH, il che consente di forzare le condizioni di reazione in modo da poter ottenere delle rese di introduzione del gruppo DBB più elevate rispetto a quelle riportate in precedenza.

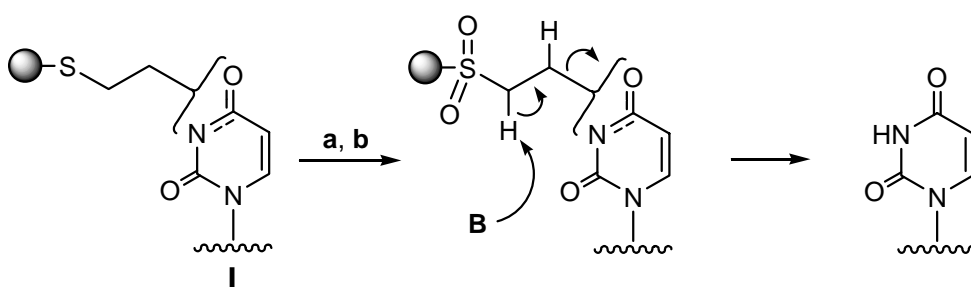
La scelta del gruppo protettore per l'N3 della base eterociclica ha richiesto uno studio sintetico più accurato; infatti la specie introdotta deve essere assolutamente stabile nelle condizioni di introduzione del gruppo DBB, ortogonale al DBB e facilmente rimovibile, a sintesi ultimata, nelle condizioni basiche previste per il distacco dell'ODN dal supporto solido.

Nelle metodiche standard previste per la sintesi di oligonucleotidi, la base timina raramente è protetta. Laddove ciò sia richiesto, ad esempio nel metodo del fosfotriestere, la protezione della base nella timidina viene effettuata mediante

conversione della funzione immidica in imminoeterea con, ad esempio, il nitrofenile effettuata attraverso un intermedio reattivo, quale il 4-cloro o il 4-triazolil derivato.

L'inserzione di tale gruppo protettore prevede condizioni di reazioni drastiche e l'utilizzo di reagenti altamente tossici (come POCl_3);⁴⁸ la sua rimozione richiede generalmente un trattamento prolungato con ioni ossimato.

In letteratura sono riportati pochi esempi di protezione alternativa. Uno di questi riporta la protezione dell'N3 come N-acil derivato dell'anisoile⁴⁹. In questo caso la sequenza sintetica ha previsto tre conversioni del substrato, che ha fornito il derivato desiderato con una resa complessiva del 75%. Entrambi i gruppi sopra esposti sono rimovibili in condizioni basiche blande, ma non stabili a condizioni troppo drastiche. Per le nostre esigenze, poiché il gruppo protettore scelto per la timidina deve essere stabile alle condizioni fortemente basiche richieste per l'introduzione del gruppo DBB, si è pensato di proteggere l'N-3 della timidina alchilandola attraverso reazione di Mitsunobu⁵⁰ con il 2-feniltioetano. L'idea di sfruttare tale N-alchilazione nasce dall'utilizzo di una specie analoga (vedi supporto **I** Schema 3 e paragrafo 2.2, capitolo 1) come linker per un supporto solido che è stato, poi, funzionalizzato con un'unità nucleosidica ancorata attraverso la base eterociclica. Nel caso del supporto **I** il rilascio del nucleoside avviene per blando trattamento basico, attraverso un meccanismo di β -eliminazione.



Schema 3. Meccanismo di distacco del nucleoside mediante β -eliminazione

a) 0.5 M *m*-CPBA in DCM, 25 °C, 1 ora; b) 17 M NH_4OH , 60 °C, 18 ore

Il 2-feniltioetanolo consente un meccanismo di rilascio del tutto analogo quando la funzione tioeterea è ossidata a solfonica, è, viceversa, molto stabile in condizioni fortemente basiche, quando lo zolfo è presente sotto forma di tioetere.

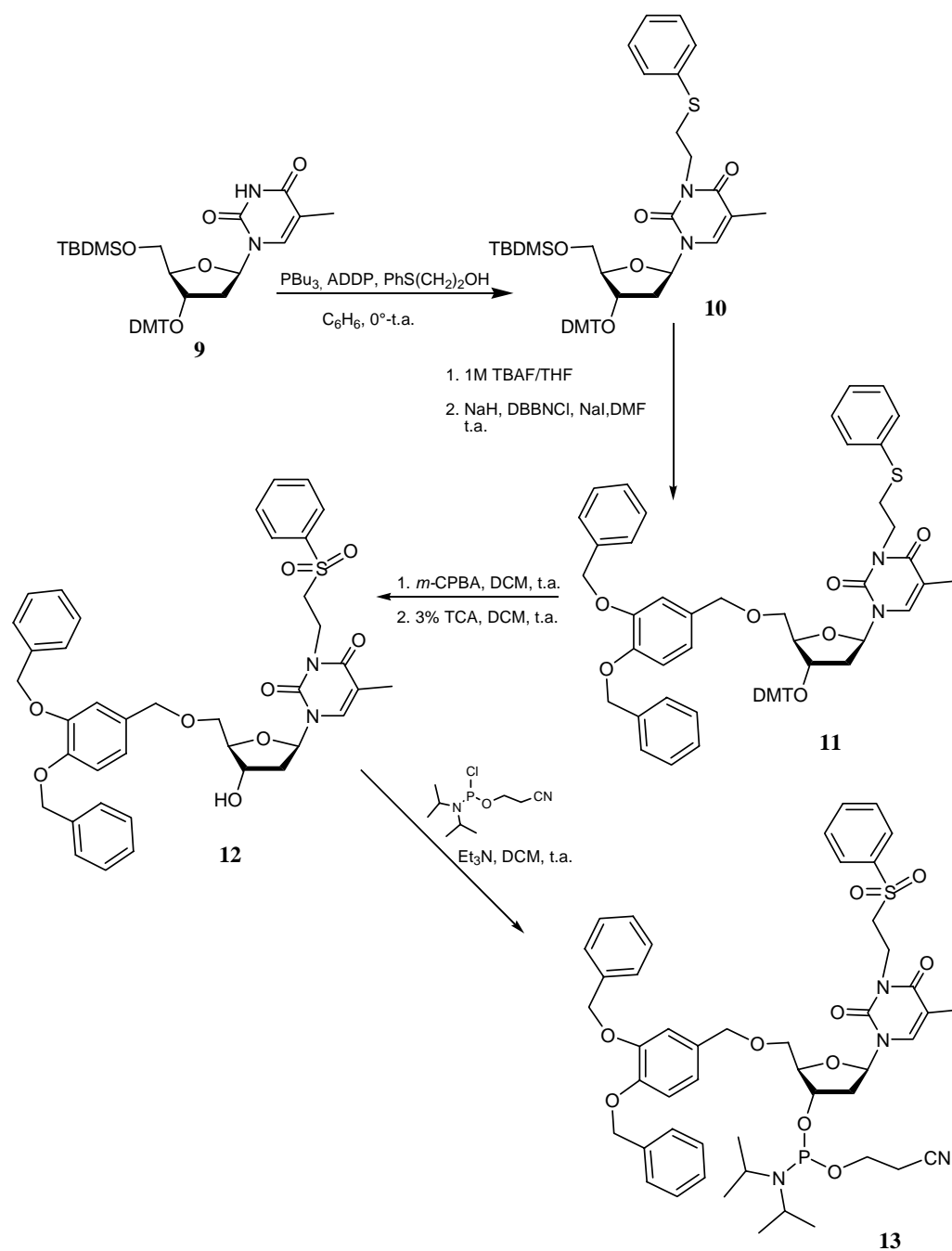
A partire dalla timidina 5'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-3'-O-*tert*-butildimetilsililtimidina sono state effettuate inizialmente delle prove, volte a valutare l'efficacia della specie scelta come gruppo protettore. Dapprima sono state messe a punto le condizioni di introduzione del gruppo protettore mediante reazione di Mitsunobu. Successivamente, dopo ossidazione della funzione tioeterea a solfonica e deprotezione degli OH in 3' e 5', sono state ottimizzate le condizioni di rimozione di tale gruppo, in ambiente basico, che sfruttano un meccanismo di β -eliminazione. È stato ritrovato che un trattamento basico condotto con NH_4OH per 18 ore a 50° C, analogo a quello previsto per il distacco degli ODN dal supporto al termine della sintesi, porta alla formazione della timidina totalmente deprotetta, come confermato da analisi $^1\text{H-NMR}$ ed ESI-MS nonché da confronto con un campione autentico del prodotto della reazione.

A questo punto, ottimizzata la scelta del gruppo protettore sia per la base eterociclica sia per l'unità di ribosio, si è potuto procedere alla sintesi del monomero **8** secondo i passaggi descritti nello Schema 4.

A partire dalla timidina si è proceduto all'introduzione in 5' e in 3' di due gruppi protettori ortogonali, facendo dapprima reagire il substrato con TBDMSCl e imidazolo in DMF a 0° C per 2 ore. Successivamente una reazione con DMTCl condotta in piridina a t.a. per 18 ore consente l'introduzione del gruppo DMT sull'OH in 3'.

A questo punto, è stata effettuata la reazione di protezione della base eterociclica. La reazione è stata condotta per 18 ore a t.a. in benzene, in presenza di $\text{PhS}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ e utilizzando, come coppia trialkilfosfina-azacomposto, PBU_3/ADDP . Successivamente è stata effettuata la deprotezione dell'OH in 5' con TBAF 1 M in THF per 2 ore e quindi l'introduzione del DBB, condotta attivando il substrato in presenza di NaH a t.a. per 20 minuti e aggiungendo poi DBBCl e NaI e lasciando la miscela a reagire per altre 18 ore. Introdotto il gruppo DBB, è stata effettuata l'ossidazione della funzione tioeterea a solfonica e poi, dopo deprotezione dell'OH in 3' per trattamento con una soluzione al 3% di TFA in DCM, la fosfitilazione dell'OH

in 3' per reazione con 2-cianoetil,N,N-diisopropilclorofosforamidato, DIPEA in DCM per 30 minuti a t.a.



Schema 4. Sintesi del building block 13

Il monomero **13**, così preparato è stato utilizzato per l'ultimo accoppiamento della sintesi su sintetizzatore automatico di DNA della sequenza desiderata, sfruttando una resina CPG con funzionalizzazione pari a 0.1 meq/g, recante ancorato il primo monomero nucleosidico dG e monomeri 3' fosforammidito protetti in 5' con il gruppo DMT, per le altre basi introdotte (Figura 9).

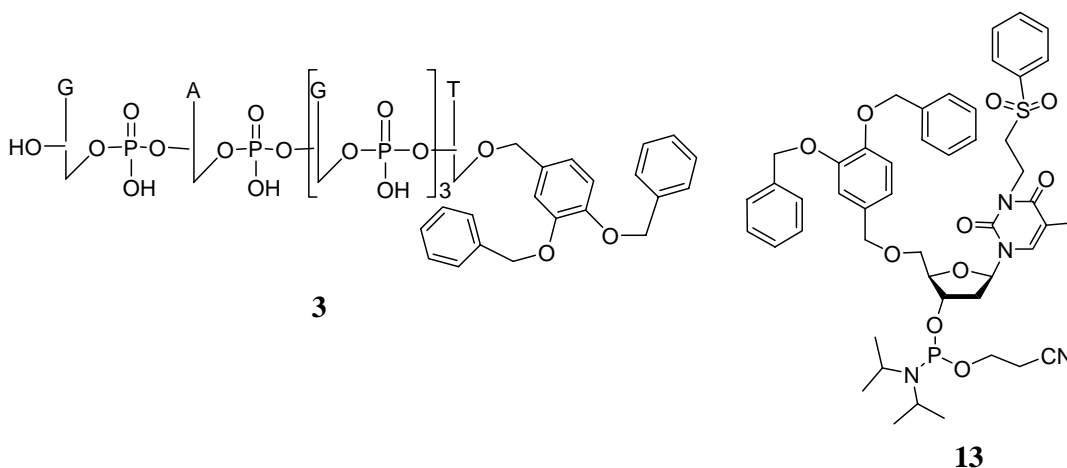


Figura 9 Sequenza ^{DBB} TG₃AG e monomero utilizzato per l'assemblaggio

A sintesi ultimata, un trattamento basico con NH₄OH concentrata a 50° C per 18 ore ha consentito il distacco della sequenza dal supporto e la rimozione di tutti i gruppi protettori labili alle basi. Il grezzo distaccato è stato purificato mediante HPLC su una colonna a fase inversa C18 (NUCLEOSIL 100-5) usando come eluenti una soluzione 0.1 M di TEAB e CH₃CN. L'analisi di massa MALDI-TOF per il picco principale eluito a 11.03 min., dopo desalificazione su Sephadex G25 eluita con acqua, ha confermato la struttura attesa.

3. CONCLUSIONI

Durante il triennio di dottorato, prendendo spunto dagli studi del prof. Hotoda su sequenze oligonucleotidiche $5'TG_3AG^{3'}$ recanti in 5' un gruppo aromatico, si è focalizzata l'attenzione sulla sintesi di sequenze $5'TGGGAG^{3'}$ recanti in posizione 5' il DMT (4,4'-dimetossitriifenilmetile), il TBDPhSi (*tert*-butildifenilsilile) e il DBB (3,4-dibenzilossibenzile). In particolare l'assemblaggio della sequenza **3** ha richiesto la messa a punto di uno schema sintetico *ad hoc* per la realizzazione del monomero timidina 5'-dibenzilossibenzile-3'-fosforammidito, che ha previsto la protezione dell'N-3 della base eterociclica mediante alchilazione con il 2-feniltioetanololo. Tale gruppo è facilmente installabile mediante reazione di Mitsunobu ed è assolutamente stabile alle condizioni di reazione previste per l'introduzione del gruppo DBB in 5'. Inoltre, una volta ossidata la funzione tioeterica a solfonica, è facilmente rimovibile in ammoniacca acquosa a 50° C per 18 ore, condizioni tipicamente utilizzate per il distacco degli ODN dal supporto al termine della sintesi.

Bibliografia

-
- ¹ Gellert, M., Lipsett, M. N., Davies, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1962**, *48*, 2013-2018;
- ² Philips, K., Dauter, Z., Morchie, A.I.H., Lilley, D. M. J., Luisi, B. *J. Mol. Biol.*, **1997**, *273*, 171-182;
- ³ Blackburn, E.H. *Cell*, **1994**, *77*, 621-623;
- ⁴ Sun, H., Yabuki, A., Maizels, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 12444-12339;
- ⁵ a) Henderson, E., Hardin, C. C., Walk, S. K., Tinoco, I. Jr., Blackburn, E. H. *Cell*, **1997**, *51*, 899-908; b) Yanez, G. H., Khan, S. J., Locovei, A. M., Pedroso, I. M., Fletcher, T. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, *328*, 49-56; c) Zhaller, A. M., Williamson, J. R., Cech, T. R., Prescott, D. M. *Nature*, **1991**, *350*, 718-720; d) Salazar, M., Thompson, Kerwin, S. M., Hurley, L. H. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 16110-16115;
- ⁶ Simonsson, T., Pecinka, P., Kubista, M. *Nucl. Acids. Res.*, **1998**, *26*, 1167-1172;
- ⁷ a) Zhung, J., Wang, H., Bishop, J., Blackburn, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 3723-3728; b) Mokbel, K. *Curr. Med. Res. Opin.*, **2003**, *19*, 470-472;
- ⁸ a) Rimmele, M. *Chem Bio Chem*, **2003**, *4*, 963-971; b) Wenn, J. D., Gray, D. M. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 11438-114488;
- ⁹ Jing, N., Hogan, M.E. *J. Biol. Chem*, **1998**, *273*, 34992-34999;
- ¹⁰ a) Simonsson, T. *Biol. Chem.*, **2001**, *382*, 621-628; b) Kenery, M. *Biopolymers*, **2001**, *56*, 123-146;
- ¹¹ a) Blackburn, E. H., *Nature*, **1991**, *350*, 569-573; b) Rhodes, D., Giraldo, R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 311-322;
- ¹² Bryan, T. M., Cech, T. R. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1999**, *11*, 318-324;
- ¹³ Harley, C. B., Futcher, A. B., Greider, C. W. *Nature*, **1990**, *345*, 458-460;
- ¹⁴ Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L. C., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, R., Shay, J W. *Science*, **1994**, *366*, 2011-2015;
- ¹⁵ Sharma, S., Raymond, E., Soda, H., Sun, D., Hilsenbeck, S. G., Sharma, A., Izbicka, E., Windle, B., Von Hoff, D. D. *Ann. Oncol.*, **1997**, *8*, 1063-1074;
- ¹⁶ Zahler, A. M., Williamson, J. R., Cech, T. R., Prescott, D. M. *Nature*, **1991**, *350*, 718-720;
- ¹⁷ Sun, D., Thompson, B., Cathers, B. E., Salazar, M., Kerwin, S. M., Trent, J. O., Jenkins, T. C., Neidle, S., Hurley, L. H. *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 2113-2116;
- ¹⁸ Sumi, M., Tauchi, T., Sashida, G., Nakajima, A., Gotoh, A., Shin-Ya, K., Ohyashiki, K. *Int. J. Oncol.*, **2004**, *24*, 1481-1487;
- ¹⁹ Shamma, M. A., Shmookler, Reis, R. J., Li, C., Koley, H., Hurley, L. H., Anderson, K. C., Munshi, N. C. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, *10*, 770-776;
- ²⁰ Siddiqui-Jain, A., Grand, C. L., Bearss, D. J., Hurley, L. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 11593-11598;
- ²¹ Spencer, C.A., Groudine, M. *Adv. Cancer Res.*, **1991**, *56*, 1-48;
- ²² Petraccone, L., Barone, G., Giancola, C. *Curr. Med. Chem-Anticancer Agents*, **2005**, *5*, 463-475 e rif. ivi citati;

-
- ²³ a) Ellington, A. D., Szostak, J. W. *Nature*, **1990**, *346*, 818; b) Tuerk, C., Gold, L. *Science*, **1990**, *249*, 505-510;
- ²⁴ Jing, N., Rando, R. F., Pommier, Y., Hogan, M. E. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 12498-12505;
- ²⁵ Kusser, W. *Biotechnol.*, **2000**, *74*, 27-38;
- ²⁶ Mahato, R. I., Takahura, Y., Hashida, M. J. *Drug Target*, **1997**, *4*, 337-357;
- ²⁷ a) Jaksa, S., Kralj, B., Pannecoque, C., Balzarini, J., De Clercq, E., Kobe, J. *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids*, **2004**, *23*, 77-88; b) Urata, H., Kumashiro, T., Kawahata, T., Otake, T., Akagi, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, *313*, 55-61;
- ²⁸ Dapic, V., Bates, P. J., Trent, J. O., Rodger, A., Thomas, S. D., Miller, D. M. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 3676-3685;
- ²⁹ a) Catalanotti, B., Galeone, A., Gomez-Paloma, L., Mayol, L., Pepe, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 2005-2009; b) Phan, A.T., Patel, D. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 15021-15027; c) Petraccone, L., Erra, E., Nasti, L., Galeone, A., Randazzo, A., Esposito, V., Mayol, L., Barone, G., Giancola, C. *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids*, **2003**, *22*, 1677-1680;
- ³⁰ Esposito, V., Randazzo, A., Piccialli, G., Petraccone, L., Giancola, C., Mayol, L. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 313-318;
- ³¹ Deng, W., Parbhu, D. J., Baker, D. A. *Biochem. J.*, **2003**, *374*, 559-565;
- ³² Dias, E., Battiste, J. L., Williamson, J. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 4479-4480;
- ³³ Petraccone, L., Erra, E., Esposito, V., Randazzo, A., Galeone, A., Barone, G., Giancola, C. *Biopolymers*, **2005**, *77*, 75-85;
- ³⁴ van der Laar, A. C., Havenaar, P., Oosting, R. S., KuylYeheschiely, E. U., van Boom, J. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 663-668;
- ³⁵ Petraccone L., Erra, E., Messere, A., Montesarchio, D., Piccialli, G., De Napoli, L., Barone, G., Giancola, C. *Biopolymers*, **2004**, *73*, 434-442;
- ³⁶ Hardin, C.C., Perry, A. G., White, K. *Biopolymers*, **2001**, *56*, 147-194;
- ³⁷ Shaker, R. H., Smirnov, I. *Biopolymers*, **2001**, *56*, 209-227;
- ³⁸ Jepsen, J.S., Sorensen, M. D., Wengel, J. *Oligonucleotides*, **2004**, *14*, 130-146;
- ³⁹ Randazzo, A., Esposito, V., Ohlenschlager, O., Ramachandran, R., Mayol, L. *Nucl. Acids Res.*, **2004**, *32*, 3083-3092;
- ⁴⁰ Tarrago-Litvak, L., Andreola, M. L., Fournier, M., Nevinski, G. A., Parissi, V., de Soultrait, V. R., Litvak, S. *Curr. Pharm. Des.*, **2002**, *8*, 595-614;
- ⁴¹ Rando, R. F., Ojwang, J., Elbafgarri, A., Reyes, R., Tinder, R., McGrath, M. S., Hogan, M. E. *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 1754-1760;
- ⁴² Furukawa, H., Momota, K., Agatsuma, T., Yamamoto, I., Rimura, S., Shimada, K. *Nucleic Acids Res.*, **1994**, *22*, 5621-5627;
- ⁴³ Koizumi, M., Koga, R., Hotoda, H., Ohmine, T., Furukawa, H., Agatsuma, T., Nishigaki, T., Abe, K., Kosaka, T., Tsutsumi, S., Sone, J., Kaneko, M., Rimura, S., Shimada, K. *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, *6*, 2469-2475 e rif. ivi citati;
- ⁴⁴ Hotoda, H., Koizumi, M., Koga, R., Kaneko, M., ohmine, T., Furukawa, H., Hagatsuma, T., Nishigaki, T., Sone, J., Tsutsumi, S., Kosaka, T., Abe, K., Rimura, S., Shimada, K. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 3655-3663;

-
- ⁴⁵ a) Furukawa, H., Momota, K., Agatsuma, T., Yamamoto, I., Rimura, S., Shimada, K. *Antisense Res. Dev.*, **1995**, *5*, 89; b) Furukawa, H., Momota, K., Agatsuma, T., Yamamoto, I., Rimura, S., Shimada, K. *Antisense Res. Dev.*, **1997**, *7*, 167-175;
- ⁴⁶ a) Koizumi, M., Koga, R., Hotoda, H., Ohmine, T., Furukawa, H., Agatsuma, T., Nishigaki, T., Abe, K., Kosaka, T., Tsutsumi, S., Sone, J., Kaneko, M., Rimura, S., Shimada, K. *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, *12*, 2235-2243; b) Hotoda, H., Momota, K., Furukawa, H., Nakamura, T., Kaneko, M. *Nucleosides & Nucleotides*, **1994**, *13*, 1375-1395;
- ⁴⁷ Jaksa, S.; Kralj, B.; Pannecouque, C.; Balzarini, J.; de Clercq, E.; Kobe, J. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **2004**, *23*, 77.
- ⁴⁸ a) Reese, C. B., Skone, P.A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1994**, 1263-1271; b) Reese, C. B., Yan, H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **2002**, 2619-2633;
- ⁴⁹ Reese, C. B., Song, Q., Rao Vaman, M., Becker, I. *Nucleosides & Nucleotides*, **1998**, *17*, 451-480;
- ⁵⁰ Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1-28.

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 1

Procedure generali

Le misure UV sono state effettuate su uno spettrofotometro Jasco V530.

Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR sono stati registrati su spettrometri Bruker WM 400, Varian-Gemini 200 e 300 e INOVA 500; tutti i chemical shift sono espressi in ppm utilizzando come riferimento il segnale residuo del solvente; le costanti di accoppiamento (J) sono espresse in Hz.

Gli spettri ^{31}P -NMR, sono stati registrati a 161.98 MHz su uno spettrometro Bruker WM-400 utilizzando H_3PO_4 all'85% come standard esterno.

Gli spettri di massa sono stati determinati con uno spettrometro Waters Micromass ZQ in modalità elettrospray.

Le TLC sono state eseguite su lastre analitiche di silice Merk (Kieselgel 40 F254) ed i prodotti sono stati visualizzati mediante luce UV a $\lambda = 254$ nm. Per le cromatografie su colonna è stata utilizzata silice Merk (Kieselgel 60, 0.063-0.200 mm).

Il supporto solido Tentagel[®] (TG-NH₂, TG-OH, 0.29-0.27 meq/g e TG-NH₂ HL 0.40 meq/g), è un prodotto acquistato dalla Novabiochem.

La funzionalizzazione dei supporti è stata condotta in una piccola colonna di vetro di 7 cm di lunghezza e 1 cm di diametro interno, munita ad un'estremità di filtro di vetro e rubinetto e all'altra di tappo.

La sintesi degli oligonucleotidi in fase solida è stata effettuata su un sintetizzatore automatico di DNA Expedite PerSeptive Biosystem.

Le analisi HPLC degli analoghi sintetizzati sono state condotte su un apparecchio Beckman System Gold munito di rivelatore UV Beckman mod. 166 e di un integratore Shimadzu Chromatopac C-R6A.

PARTE SPERIMENTALE PGR 2.2-2.3

5'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-uridina (12)

1 g (4.0 mmol) di uridina, precedentemente anidrificato mediante ripetute coevaporate con piridina anidra, sono stati sciolti in 5 mL di piridina anidra e alla miscela risultante sono stati aggiunti 1.5 g (4.5 mmol) di 4,4'-dimetossitritilcloruro e 50 mg (0.4 mmol) di DMAP. La miscela è stata tenuta a temperatura ambiente per 10 ore e la reazione monitorata mediante cromatografia su strato sottile. La reazione è stata interrotta per aggiunta di CH_3OH e la miscela seccata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice sospesa in CHCl_3 ed eluita con $(\text{CHCl}_3/\text{Py} (1:0.05, \text{v/v}))/\text{CH}_3\text{OH} (9:1, \text{v/v})$.

Sono stati recuperati 1.9 g (3.48 mmol) del prodotto desiderato (resa=87%), puro da controllo TLC ed NMR.

R_f = 0.5 [eluente CHCl₃/CH₃OH (9:1, v/v)];

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 10.21 (1H, singoletto, N-H), 8.03 (1H, doppietto, H-6, J=8.0 Hz), 7.39-6.81 (13H, segnali complessi, protoni aromatici gruppo DMT), 5.89 (1H, doppietto, H-1', J=1.6 Hz), 5.43 (1H, doppietto, OH legato al C-2'), 5.35 (1H, doppietto, H-5, J=8.0 Hz), 4.43 (1H, multipletto, H-3'), 4.34 (1H, singoletto, H-2'), 4.17 (1H, multipletto, H-4'), 3.77 (6H, singoletto, 2 OCH₃ gruppo DMT), 3.51 (2H, multipletto, H₂-5'), 3.31 (1H, doppietto, OH legato al C-3').

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 163.71 (C-4), 158.58, 144.23, 135.17, 134.99, 129.97, 128.00, 127.02, 113.19 (C aromatici gruppo DMT), 151.00 (C-2), 140.34 (C-6), 102.12 (C-5), 90.62 (C-1'), 86.91 (C quaternario gruppo DMT), 83.67 (C-4'), 77.10 (C-2'), 75.41 (C-3'), 69.55 (C-5'), 55.13 (2 OCH₃).

Massa calcolata per C₃₀H₃₀N₂O₈: 546.20.

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 547.01.

5'-O-(4,4'-dimetossitrifetilmetil)-1'-(β-D-arabinofuranosil)-uridina 2,2'-anidro (13)

1 g (1.8 mmol) di **12** sono stati sciolti in 8 mL di DMF anidra e alla miscela risultante sono stati aggiunti 509 mg (2.3 mmol) di difenilcarbonato e 7.5 mg (0.9 mmol) di NaHCO₃. La miscela è stata tenuta a 120 °C per 5 ore e la reazione monitorata mediante TLC. La miscela è stata seccata a pressione ridotta ed il prodotto ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice, eluita con un gradiente di metanolo in diclorometano/piridina, 1:0.05 (v/v), dal 5% al 10%. Sono stati recuperati 780 mg (1.5 mmol) del prodotto desiderato (resa=83%), puro da controllo TLC ed NMR.

R_f = 0.5 [eluente AcOEt/CH₃OH (8:2, v/v)];

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 8.57 (1H, doppietto, H-6, J=7.6 Hz), 7.29-6.71 (13H, segnali complessi, protoni aromatici gruppo DMT), 6.14 (1H, doppietto, H-1', J=5.6 Hz), 5.88 (1H, doppietto, H-5, J=7.6 Hz), 5.29 (1H, doppietto, H-2', J=5.6 Hz), 4.58 (1H, singoletto, H-3'), 4.42 (1H, multipletto, H-4'), 3.71 (6H, singoletto, 2 OCH₃ gruppo DMT), 3.04 (1H, multipletto, H_a-5'), 2.93 (1H, multipletto, H_b-5');

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 159.50 (C-4), 158.37, 144.23, 135.32, 135.26, 129.73, 129.01, 123.79 (C aromatici gruppo DMT), 149.20 (C-2), 136.32 (C-6), 109.69 (C-5), 90.034 (C-1'), 89.21 (C-2'), 87.36 (C quaternario gruppo DMT), 86.12 (C-4'), 75.45 (C-3'), 62.75 (C-5'), 55.06 (2 OCH₃).

Massa calcolata per C₃₀H₂₈N₂O₇: 528.19.

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 529.27.

5'-O-(4,4'-dimetossitrifenilmetil) 2'- α -azido-uridina (14)

A 700 mg (1.3 mmol) di **13**, sciolti in 9 mL di DMF anidra, sono stati aggiunti 416 μ L (9.2 mmol) di una soluzione di LiN₃ al 20% in acqua e la reazione è stata tenuta a ricedere per una notte. La miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta, ridisciolta in CHCl₃ e lavata per tre volte con H₂O. La fase organica è stata recuperata, anidrificata su MgSO₄ anidro, filtrata, concentrata e caricata su una colonna di gel di silice eluita con un gradiente di MeOH in CHCl₃/piridina, 1:0.05 (v/v) dallo 0% al 10%, ottenendo 343 mg (0.6 mmol) del prodotto desiderato (resa=46%), puro da controllo TLC ed NMR.

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

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz): 8.61 (1H, singoletto slargato, NH), 7.91 (1H, doppietto, H-6, J=8.5 Hz), 7.37-6.83 (13H, segnali complessi, protoni aromatici gruppo DMT), 5.93 (1H, doppietto, H-1', J=3.0 Hz), 5.37 (1H, doppietto, H-5, J=8.5 Hz), 4.54 (1H, multipletto, H-3'), 4.16 (1H, multipletto, H-2'), 4.07 (1H, multipletto, H-4'), 3.79 (6H, singoletto, 2 OCH₃ gruppo DMT), 3.60 (1H, doppietto, H-5'_a), 3.48 (1H, doppietto, H-5'_b).

¹³C NMR (C₆D₆, 75 MHz): 163.66 (C-4) 159.31, 145.23, 135.79, 135.68, 130.65, 130.57, 113.69 (C aromatici gruppo DMT), 150.32 (C-2), 139.72 (C-6), 102.29 (C-5), 88.70 (C-1'), 87.38 (C quaternario gruppo DMT), 82.99 (C-4'), 69.99 (C-3'), 67.00 (C-5'), 61.82 (C-2'), 54.84 (2 OCH₃).

Massa calcolata per C₃₀H₂₉N₅O₇: 571.21.

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 572.22.

5'-O-(4,4'-dimetossitrifenilmetil)-2'- α -azido-3'-O-*tert*-butildimetilsililuridina (16)

300 mg (0.5 mmol) di **14** sono stati sciolti in 3 mL di THF anidro e alla miscela risultante sono stati aggiunti setacci molecolari (4Å), 1.8 mL (10.4 mmol) di DIEA, 880 mg (5.2 mmol) di AgNO₃ e 783 g (5.2 mmol) di *tert*-butildimetilsililcloruro. La miscela è stata tenuta a ricadere per 3 ore e la reazione monitorata mediante TLC. La miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta, ridisciolta in CHCl₃ e lavata per tre volte con una soluzione al 5% di NaHCO₃. La fase organica è stata recuperata, anidrificata su MgSO₄ anidro, filtrata, concentrata e caricata su una colonna di gel di silice eluita con un gradiente di AcOEt in C₆H₆/piridina, 1:0.05 (v/v) dal 2% al 10%, ottenendo 300 mg (0.4 mmol) del prodotto desiderato (resa=80%), puro da controllo TLC ed NMR.

R_f = 0.4 [eluente C₆H₆/AcOEt (75:25, v/v)].

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz): 8.00 (1H, doppietto, H-6 J=8.4 Hz), 7.60-8.80 (13H, segnali complessi, protoni aromatici gruppo DMT), 6.10 (1H, doppietto, H-1', J=4.2 Hz), 5.44 (1H, doppietto, H-5, J=8.4 Hz), 4.49 (1H, tripletto, H-3', J=5.4 Hz), 4.14 (1H, multipletto, H-2'), 3.89 (1H, multipletto, H-4'), 3.84 (6H, singoletto, OCH₃), 3.74 (1H, doppio doppietto, H-5'_a, J_{gem}=11.1 Hz, J_{4',5'}=2.4 Hz), 3.38 (1H, doppio

doppio, H-5'_b, J_{gem}=11.1 Hz, J_{4',5'}=2.4 Hz), 0.88 (9H, singoletto, CH₃ del *tert*-butile), 0.15 (3H, singoletto, CH₃ sul silicio), 0.01 (3H, singoletto, CH₃ sul silicio).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 163.07 (C-4), 158.79, 143.82, 134.87, 130.12, 128.18, 127.97, 127.27, 113.27 (C aromatici gruppo DMT), 150.16 (C-2), 139.40 (C-6), 102.58 (C-5), 87.29 (C quaternario gruppo DMT), 86.89 (C-1'), 84.05 (C-4'), 71.85 (C-3'), 66.04 (C-5'), 61.41 (C-2'), 55.21 (2 OCH₃), 25.54 (CH₃ del *tert*-butile), 17.89 (C quaternario gruppo *tert*-butile), -4.73 (CH₃ sul silicio), -5.23 (CH₃ sul silicio).

Massa calcolata per C₃₆H₄₃N₅O₇Si: 685.29.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 708.35.

ESI-MS [M+K]⁺: m/z 724.35.

5'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-2',3'-di-O-acetil-inosina (7)

300 mg (1.1 mmol) di inosina, precedentemente anidrificati mediante ripetute coevaporate con piridina anidra, sono stati sciolti in 2 mL di piridina anidra e alla miscela risultante sono stati aggiunti 360 mg (1.1 mmol) di 4,4'-dimetossitritilcloruro e 20 mg (0.1mmol) di DMAP. La miscela è stata tenuta a temperatura ambiente per 18 ore e la reazione monitorata mediante TLC. La reazione è stata interrotta per aggiunta di MeOH e la miscela seccata a pressione ridotta. Il grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice eluita con un gradiente di MeOH in CHCl₃/piridina; 0:0.05 v/v dall'1% al 10%. Sono stati recuperati 600 mg (1.0 mmol) del prodotto desiderato (resa=94%).

Il prodotto così ottenuto è stato acetilato con una miscela 1:1 di Ac₂O/Py, lasciando la reazione per una notte a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta e lavata per tre volte con H₂O/CHCl₃. La fase organica è stata recuperata, anidrificata con MgSO₄, filtrata e concentrata. Sono stati recuperati 500 mg (0.8 mmol, resa=73%) del prodotto desiderato, puro per TLC ed NMR.

Rf = 0.8 [eluente CHCl₃/CH₃OH (9:1, v/v)].

5'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-3'-O-acetil-N-isobutirril-2'-deossiguanosina (8)

A 250 mg (0.4 mmol) di 5'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-N-isobutirril-2'-deossiguanosina commercialmente disponibile, precedentemente anidrificati mediante ripetute coevaporate con piridina anidra, sono stati aggiunti 2 mL di una miscela 1:1 di Ac₂O/Py. La reazione è stata bloccata dopo 1 ora con H₂O, la miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta e lavata per tre volte con H₂O/CHCl₃. La fase organica è stata recuperata, anidrificata con MgSO₄, filtrata, concentrata e purificata su colonna di gel di silice eluita con MeOH/CHCl₃ (3:97) con 0.05% di piridina. Sono stati recuperati 200 mg (0.3 mmol) del prodotto desiderato (resa=75%) puro per TLC ed NMR.

Rf = 0.7 [eluente CHCl₃/CH₃OH (9:1, v/v)].

Acido 6-[2-(4,4'-dimetossitriifenilmetossi)]-etilsulfanil-esanoico (17)

A 980 μ l (14 mmol) di 2-mercaptoetanolo sciolti in 5 mL di DMF anidra sono stati aggiunti 2.9 g (21 mmol) di K_2CO_3 anidro e successivamente 1.12 mL (7 mmol) di 5-bromovalerato di etile. La reazione è stata tenuta per 3 ore a 60° C ed è stata interrotta aggiungendo qualche goccia di H_2O . La miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta, lavata per tre volte con $H_2O/CHCl_3$ e la fase organica è stata anidrificata su $MgSO_4$ anidro e seccata sotto vuoto.

La purificazione del grezzo di reazione è stata effettuata su colonna di gel di silice utilizzando un sistema eluente al 20 % di AcOEt in benzene. Sono stati in tal modo recuperati 0.93 g del composto puro (5.2 mmol, 74 %).

A 0.5 g (2.4 mmol) del substrato così ottenuto, anidrificati per ripetute coevaporazioni con piridina anidra, sono stati aggiunti 15 mg di DMAP (0.1 mmol) e 0.81 g (2.4 mmol) di DMTCl sciolti in 4 mL di piridina anidra e la miscela di reazione risultante è stata lasciata a temperatura ambiente e sotto agitazione. Dopo una notte la reazione è stata interrotta per aggiunta di H_2O , la miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta, ridisciolta in $CHCl_3$ e lavata per tre volte con H_2O ; la fase organica poi è stata anidrificata su $MgSO_4$ anidro e seccata sotto vuoto. La purificazione del grezzo è stata condotta su una colonna di gel di silice, utilizzando come sistema eluente una miscela al 5% di AcOEt in benzene/piridina, 0:0.1, v/v. Sono stati recuperati 1.2 g (2.3 mmol, 96 %) di prodotto dimetossitritilato.

A 0.5 g (0.9 mmol) del substrato così ottenuto, sciolti in 4 mL di etanolo, sono stati aggiunti 2 mL di una soluzione acquosa 3 M di NaOH e la miscela di reazione è stata lasciata per 1 notte a temperatura ambiente e sotto agitazione. La miscela di reazione è stata seccata sotto vuoto, ridisciolta in $CHCl_3$ e lavata per tre volte con H_2O ; la fase organica è stata trattata con $MgSO_4$ anidro, filtrata e seccata a pressione ridotta. La fase organica è stata ridisciolta in benzene, caricata su una colonna di gel di silice eluita con un gradiente di AcOEt in benzene/piridina 0:0.1 (v/v), dal 10% al 20%, ottenendo 408 mg (0.85 mmol, 94%) di prodotto pulito da controllo TLC ed NMR.

Rf = 0.5 [eluente $C_6H_6/AcOEt$ (6:4, v/v)].

1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): 7.45-6.76 (13 H, segnali complessi, protoni aromatici, DMT); 3.70 (6H, singoletto, 2 OCH_3 DMT); 3.22 (2H, tripletto, CH_2ODMT); 2.58 (2H, tripletto, SCH_2CH_2ODMT); 2.42 (2H, tripletto, $CH_2SCH_2CH_2ODMT$); 2.23 (2H, tripletto, $HOOCCH_2$); 1.56 (4H, multipletto, $CH_2CH_2CH_2CH_2$).

^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): 175.76 ($HOOCCH_2$); 160.47, 147.05, 137.98, 131.68, 129.75, 129.21, 128.23, 114.54 (C sp^2 del DMT); 88.01 (C quaternario del gruppo DMT); 65.15 (CH_2ODMT); 56.19 (OCH_3); 34.94 ($HOOCCH_2$); 33.41 (SCH_2CH_2ODMT), 33.10 (CH_2S CH_2CH_2ODMT); 30.68 ($HOOCCH_2CH_2$); 25.62 ($CH_2CH_2CH_2S$).

Massa calcolata per $C_{28}H_{32}O_5S$: 480.20.

ESI-MS $[M+H]^+$: m/z 481.34.

Funzionalizzazione di Tentagel-NH₂ con l'acido 6-[2-(4,4'-dimetossitriifenilmetossi)]-etilsulfanil-esanoico (1)

A 0.2 g di resina Tentagel[®]-NH₂ (0.29 meq/g di gruppi ossidrilici disponibili, 0.06 mmol) sospesa in 100 μ L di DCM anidro, sono stati aggiunti 320 mg (0.6 mmol) dell'acido 6-[2-(4,4'-dimetossitriifenilmetossi)]-etilsulfanil-esanoico precedentemente anidrificato per ripetute coevaporazioni con piridina anidra e ridisciolti in 500 μ L di Py anidra, 80 mg (0.6 mmol) di HOBt precedentemente anidrificato per ripetute coevaporazioni con piridina anidra e ridisciolti in 500 μ L di Py anidra, 90 μ L (0.6 mmol) di DIC e 100 μ L (0.6 mmol) di DIEA. La miscela è stata tenuta sotto agitazione per circa 48 ore a temperatura ambiente. Il supporto risultante, dopo ripetuti lavaggi con DCM e MeOH, è stato seccato a pressione ridotta per circa 2 ore. La funzionalizzazione, valutata spettroscopicamente mediante misure di assorbanza a $\lambda=498$ nm del catione DMT ($\epsilon=71700$ cm⁻¹M⁻¹) rilasciato per trattamento acido (HClO₄/EtOH, 6:4, v/v) di campioni seccati e pesati del supporto, è risultata essere di 0.22 meq/g, corrispondenti a una resa media del 76 %.

Il supporto è stato trattato per un'ora a temperatura ambiente con la miscela Py/Ac₂O (1:1, v/v) e successivamente è stato lavato con DCM e MeOH e seccato a pressione ridotta. Tale supporto è stato infine deprotetto dal gruppo DMT per trattamento acido, lavando ripetutamente con una soluzione all'1% di DCA in DCM fino a scomparsa del colore arancione tipico del catione DMT. Il supporto deprotetto è stato poi lavato ripetutamente con DCM, Py e MeOH e quindi seccato a pressione ridotta per 2 ore.

Funzionalizzazione del supporto TG-SCH₂CH₂-OH con analoghi nucleosidici via reazione di Mitsunobu

A 0.2 g (0.04 mmol) del supporto **1** sono stati aggiunti 0.35 mmol di nucleoside sciolti in 300 μ L di DCM anidro e il complesso DEAD/TPP, preparato sciogliendo 400 mg (1.4 mmol) di TPP in 300 μ L di THF anidro e aggiungendo 250 μ L (1.4 mmol) di DEAD mantenendo la miscela a 0° C per 20' e poi a temperatura ambiente per altri 10 min. La miscela è stata tenuta sotto agitazione per circa 5 ore a temperatura ambiente. Il supporto risultante, dopo ripetuti lavaggi con DCM e MeOH, è stato seccato a pressione ridotta e trattato per 30 minuti a temperatura ambiente con la miscela Py/Ac₂O (1:1, v/v). Il supporto è stato poi lavato ripetutamente con DCM e MeOH e seccato a pressione ridotta.

La funzionalizzazione media, valutata spettroscopicamente mediante misure di assorbanza a $\lambda=498$ nm del catione DMT ($\epsilon=71700$ cm⁻¹M⁻¹) rilasciato per trattamento acido (HClO₄/EtOH, 6:4 v/v) di campioni seccati e pesati, è risultata essere di 0.21 meq/g, corrispondenti a una resa media del 95 %.

Sintesi dei derivati amminoacidici 19-22

35 mg (0.07 mmol) del supporto solido **18** sono stati trattati con 2.25 mL di una soluzione 0.35 M di PBU₃ in THF, preparata sciogliendo 553 μ L di PBU₃ in

THF/H₂O/EtOH e poi è stata trattata con 10 eq di HATU, 15 eq di DIPEA, 10 eq di HOBt e 10 eq di dell'amminoacido sotto forma di N-Fmoc derivato in DMF a temperatura ambiente per 1 ora. Il supporto ottenuto, dopo ripetuti lavaggi con DCM e MeOH è stato seccato a pressione ridotta.

La funzionalizzazione media, valutata spettroscopicamente mediante misure di assorbanza a $\lambda=301$ nm del fluorenilo ($\epsilon=7800$ cm⁻¹M⁻¹) rilasciato per trattamento basico (tre trattamenti da 5 min.; piperidina/DMF al 20 %) di campioni seccati e pesati del supporto, è risultata essere di 0.20 meq/g, corrispondenti a una resa media del 90 %. Il supporto è stato trattato con una soluzione al 20% di piperidina in DMF (tre trattamenti da 5 min. l'uno) e successivamente per 30 min a temperatura ambiente con la miscela Py/Ac₂O (1:1, v/v). Infine è stato lavato ripetutamente con DCM e MeOH e seccato a pressione ridotta. La resina è stata ossidata con 3 mL di una soluzione 0.5 M di *m*-CPBA in DCM per 1 ora a t.a. e successivamente deprotetta alla funzione 3'OH per trattamento con 1 mL di una soluzione Et₃N•3HF (0.49 mmol)/THF 1:1 (v/v) per 18 ore a t.a. e alla funzione 5'OH per trattamento con una soluzione all'1% di DCA in DCM. Dopo ripetuti lavaggi con MeOH e CH₂Cl₂, la resina è stata trattata con una soluzione di NH₄OH 17 M per 18 ore a 60° C. Il distaccato è stato seccato a pressione ridotta, ridisciolto in H₂O, filtrato e purificato per HPLC su colonna a fase inversa NUCLEOSIL[®] 100-5 C8. Per l'eluizione del grezzo è stato usato un gradiente lineare da 0 a 100 % di CH₃CN in H₂O in 30 min con flusso di 0.8 mL/min e rivelazione a $\lambda = 260$ nm. I prodotti purificati sono stati caratterizzati mediante ¹H NMR e ESI-MS.

Uridina-2'-NH-Leu-NHAc (19)

¹H NMR (500 MHz, D₂O): 7.78 (1H, doppietto, H-6, J=7.5 Hz), 6.06 (1H, doppietto, H-1', J=8.0 Hz), 5.89 (1H, doppietto, H-5, J=7.5 Hz), 4.60 (1H, multipletto, H-2'), 4.33-4.22 (2H, segnali complessi, H-3' e CH α della leucina), 4.20 (1H, multipletto, H-4'), 3.85 (2H, multipletto, H₂-5'), 2.00 (3H, singoletto, CH₃ dell'acetile), 1.60-1.57 (3H, segnali complessi, CH β e CH γ della leucina), 0.90 e 0.86 (3H ciascuno, due doppietti, CH₃ della leucina).

Massa calcolata per C₁₇H₂₆N₄O₇ : 398.18.

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 399.27.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 421.21.

ESI-MS [M+K]⁺: m/z 437.20.

Uridina-2'-NH-Phe-OH (20)

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) segnali significativi: 7.86 (1H, doppietto, H-6, J=8.0 Hz), 7.42-7.26 (5H, segnale complesso, protoni aromatici), 6.01 (1H, doppietto, H-1', J=7.0 Hz), 5.93 (1H, doppietto, H-5, J=8.0 Hz), 4.21 (1H, doppio doppietto, CH α della fenilalanina), 4.16 (1H, multipletto, H-4'), 3.93-3.84 (2H, multipletto, H₂-5'), 3.81 (1H, multipletto, H-3'), 3.73 (2H, multipletto, CH β della fenilalanina), 1.97 (3H, singoletto, CH₃ dell'acetile), il segnale di H-2' è coperto dal segnale HDO residuo del solvente.

Massa calcolata per C₂₀H₂₄N₄O₇: 432.16.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 455.25.

ESI-MS [M+K]⁺: m/z 471.23.

Uridina-2'-NH-Val-NHAc (21)

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) segnali significativi: 7.75 (1H, doppietto, H-6, J=8.0 Hz), 6.07 (1H, doppietto, H-1', J=8.0 Hz), 5.89 (1H, doppietto, H-5, J=8Hz), 4.72-4.64 (1H, multipletto, H-2'), 4.34 (1H, doppio doppietto, H-3', J=5.5 e J=2.5 Hz), 4.20 (1H, multipletto, H-4'), 4.12 (1H, doppietto, CH_α della valina, J=6.5 Hz), 3.85 (2H, multipletto, H₂-5'), 2.18-2.12 [1H, multipletto, CH(CH₃)₂] della valina), 1.83 (3H, singoletto, CH₃ dell'acetile), 0.92 e 0.89 (3H ciascuno, due doppietti, CH(CH₃)₂ della valina, J=7 Hz).

Massa calcolata per C₁₆H₂₄N₄O₇: 384.16.

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 385.22.

Uridina-2'-NH-Lys-(NHAc)NHAc (22)

¹H NMR (D₂O, 500 MHz): 7.85 (1H, doppietto, H-6, J=8.5 Hz), 6.05 (1H, doppietto, H-1', J=8.5 Hz), 5.92 (1H, doppietto, H-5, J=8.5 Hz), 4.65 (1H, multipletto, H-2'), 4.35 (1H, multipletto, H-3'), 4.30 (1H, multipletto, CH_α Lys), 4.25 (1H, multipletto, H-4'), 3.85 (2H, multipletto, H₂-5'), 3.25 (2H, tripletto, CH₂ ε Lys), 2.08 e 2.04 (3H ciascuno, 2 singoletti, acetili), 1.75 (2H, multipletto, CH₂ β Lys), 1.55 (2H, multipletto, CH₂ δ Lys), 1.35 (2H, multipletto, CH₂ γ Lys).

Massa calcolata per C₁₉H₂₉N₅O₈: 455.20.

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 456.44.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 478.42.

Sintesi degli ibridi 23 e 24

35 mg di supporto solido **18** con funzionalizzazione 0.21 meq/g sono stati deprotetti dal gruppo DMT per trattamento con una soluzione all'1% di DCA in DCM e acetilati per trattamento con Ac₂O/Py (1:1, v/v) per 30 min a t.a.. Successivamente il supporto è stato trattato con 2.25 ml di una soluzione 0.35 M di PBU₃ in THF, preparata sciogliendo 553 μL di PBU₃ in THF/H₂O/EtOH e poi per 1 ora a temperatura ambiente con la miscela Py/Ac₂O (1:1, v/v) ed è stato poi lavato ripetutamente con DCM e MeOH e seccato a pressione ridotta per la sintesi del derivato **23**. Per ottenere il derivato **24**, dopo riduzione della funzione azide, il supporto è stato trattato con 10 eq di HATU, 15 eq di DIPEA, 10 eq di HOBT e 10 eq di Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH in DMF a temperatura ambiente per 1h. Dopo accoppiamento con l'amminoacido, un trattamento con Ac₂O in piridina per 30 min a t.a. ha consentito di bloccare le funzioni amminiche che eventualmente non avessero reagito.

La resina è stata ossidata con 3 mL di una soluzione 0.5 M di acido *m*-CPBA in DCM per 1 ora a temperatura ambiente e poi deprotetta alla funzione 3'OH per

trattamento con 1 mL di una soluzione Et₃N•3HF/THF (1:1, v/v) per 18 ore a temperatura ambiente. Successivamente è stata sottoposta ad un singolo ciclo di accoppiamento sul sintetizzatore automatico di DNA con 5'-DMT-dCitidina (N⁴-Benzoil)3'-β-cianoetil fosforammidito per il derivato **23** e 5'-DMT-Timidina (N⁴-Benzoil)3'-β-cianoetil fosforammidito per il derivato **24**, utilizzando una concentrazione di monomero di addizione pari a 35 mg/mL. L'accoppiamento, controllato monitorando l'assorbimento del catione 4,4'-dimetossitriifenilmetile rilasciato per trattamento acido, è avvenuto con resa dell'80 %. Dopo ripetuti lavaggi con MeOH e CH₂Cl₂, la resina è stata trattata con una soluzione al 20 % di piperidina in DMF a t.a. per 10 min, per la rimozione del gruppo Fmoc; infine il supporto è stato trattato con una soluzione di NH₄OH 17 M per 18 ore a 60° C. Il distaccato è stato seccato a pressione ridotta, ridisciolto in H₂O, filtrato e purificato per HPLC su una colonna a fase inversa NUCLEOSIL[®] 100-5 C8. Per l'eluizione del grezzo è stato usato un gradiente lineare da 0 a 100 % di CH₃CN in H₂O in 30 min con flusso di 0.8 mL/min e rivelazione a λ = 260 nm. I prodotti eluiti a t_R=10.76 min (**23**) e 10.01 min (**24**) sono stati raccolti e caratterizzati mediante ¹H NMR ed ESI-MS

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) segnali significativi: 7.86 (1H, doppietto, H-6 U, J=7.5 Hz), 7.78 (1H, doppietto, H-6 C, J=7.5 Hz), 6.31 (1H, doppio doppietto, H-1' C, J=6.5 e 7.0 Hz), 6.14 (1H, doppietto, H-5 C, J=7.5 Hz), 6.07 (1H, doppietto, H-5 U, J=7.5 Hz), 5.88 (1H, doppietto, H-1' U, J=8.0 Hz), 3.89-3.76 (4H, segnali sovrapposti, H₂-5' U e C), 2.62-2.30 (2H, multipletto, H-2' C), 2.15 (1H, multipletto, H-2' U), 1.93 (3H, singoletto, acetile).

Massa calcolata per C₂₀H₂₇N₆O₁₂P: 574.14.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 573.10.

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) segnali significativi: 7.40 (1H, doppietto, H-6 U, J=8.0 Hz), 7.67 (1H, singoletto, H-6 T), 6.35 (1H, doppio doppietto, H-1' T, J=6.5 e 6.5 Hz), 6.09 (1H, doppietto, H-1' U, J=8.5 Hz), 5.91 (1H, doppietto, H-5 U, J=8.0 Hz); H-3', H-2' U and H-3' T sono coperti dal segnale HDO residuo, 4.15 (5H, segnali sovrapposti, H-4' U, H-4' T, CH₂ α Lys e H₂-5' T), 3.85 (2H, multipletto, H₂-5' U), 3.28 (2H, multipletto, CH₂ ε Lys), 2.36 (2H, multipletto, H₂-2' T), 1.93 (3H, singoletto, CH₃ T), 1.85 (2H, multipletto, CH₂ β Lys), 1.79 (2H, multipletto, CH₂ δ Lys), 1.22 (2H, multipletto, CH₂ γ Lys).

Massa calcolata per C₂₅H₃₈N₇O₁₃P: 675.23.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 674.54.

Sintesi dell'ibrido **25**

35 mg di supporto solido **18** con funzionalizzazione 0.21 meq/g sono stati deprotetti dal gruppo DMT con una soluzione all'1% di DCA in DCM e acetilati per trattamento con Ac₂O/Py (1:1, v/v) per 30 min a t.a. Successivamente il supporto è stato trattato con 2.25 mL di una soluzione 0.35 M di PBU₃ in THF, preparata sciogliendo 553 μL di PBU₃ in THF/H₂O/EtOH e poi con 10 eq di HATU, 15 eq di DIPEA, 10 eq di HOBt e 10 eq di Fmoc-Lys-OH in DMF a temperatura ambiente per

1 ora. Dopo accoppiamento con l'amminoacido, il supporto è stato trattato con una soluzione di Ac₂O in piridina per 30' a t.a. per bloccare le funzioni amminiche che eventualmente non avessero reagito.

La resina è stata ossidata con 3 mL di una soluzione 0.5 M di *m*-CPBA in DCM per 1 ora a temperatura ambiente e poi deprotetta alla funzione 3'OH per trattamento con 1 mL di una soluzione Et₃N•3HF/THF (1:1, v/v) per 18 ore a temperatura ambiente. Successivamente è stata sottoposta ad un singolo ciclo di accoppiamento sul sintetizzatore automatico di DNA con 3'-DMT-timidina-5'-β-cianoetil fosforammidito, utilizzando una concentrazione di monomero di addizione pari a 35 mg/mL. L'accoppiamento, controllato monitorando l'assorbimento del catione 4,4'-dimetossitriifenilmetile rilasciato per trattamento acido, è avvenuto con resa dell'80%. Dopo ripetuti lavaggi con MeOH e CH₂Cl₂, la resina è stata seccata a pressione ridotta e trattata con una soluzione al 20% di piperidina in DMF per 5 minuti a temperatura ambiente. Infine è stata trattata con NH₄OH 17 M per 18 ore a 60°C. Il distaccato è stato seccato a pressione ridotta, ridisciolto in H₂O, filtrato e purificato per HPLC su colonna a fase inversa NUCLEOSIL® 100-5 C8. Per l'eluizione del grezzo è stato usato un gradiente lineare da 0 a 100 % di CH₃CN in H₂O in 30 min con flusso di 0.8 mL/min e rivelazione a λ = 260 nm. Il prodotto eluito a t_R=10.80 min è stato raccolto e caratterizzato mediante ¹H NMR ed ESI-MS.

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) segnali significativi: 7.91 (1H, doppietto, H-6 U, J=8.0 Hz), 7.68 (1H, singoletto, H-6 T), 6.32 (1H, doppio doppietto, H-1' T, J=6.5 e 6.5 Hz), 6.10 (1H, doppietto, H-1' U, J=8.0 Hz), 5.94 (1H, doppietto, H-5 U, J=8.0 Hz); H-3', H-2' U sono coperti dal segnale HDO residuo; 4.47 (2H, segnali sovrapposti, H-4' T e H-4' U), 4.19 (5H, segnali sovrapposti, H₂-5' U, H₂-5' T e CH α Lys), 3.24 (2H, multipletto, CH₂ ε Lys), 2.33 (2H, multipletto, H₂-2' T), 1.93 (3H, singoletto, CH₃ T), 1.80 (2H, multipletto, CH₂ β Lys), 1.72 (2H, multipletto, CH₂ δ Lys), 1.18 (2H, multipletto, CH₂ γ Lys).

³¹P NMR (D₂O, 161.98 MHz): 1.75.

Massa calcolata per C₂₅H₃₈N₇O₁₃P: 675.23.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 674.47.

Sintesi dell'ibrido 26

35 mg di supporto solido **18** con funzionalizzazione 0.21 meq/g sono stati trattati con 2.25 mL di una soluzione 0.35 M di PBU₃ in THF, preparata sciogliendo 553 μL di PBU₃ in THF/H₂O/EtOH e poi è stato trattato con 10 eq di HATU, 15 eq di DIPEA, 10 eq di HOBt e 10 eq di Fmoc-Lys-(Fmoc)-OH in DMF a temperatura ambiente per 1h. Dopo accoppiamento con l'amminoacido, un trattamento con Ac₂O in piridina ha consentito l'acetilazione delle funzioni amminiche che eventualmente non avessero reagito.

La resina è stata ossidata con 3 mL di una soluzione 0.5 M di acido *m*-CPBA in DCM per 1 ora a temperatura ambiente e poi deprotetta alla funzione 5'OH per trattamento una soluzione all'1% di DCA in DCM per 10 min a t.a. Successivamente è stata sottoposta ad un singolo ciclo di accoppiamento sul

sintetizzatore automatico di DNA con 5'-DMT-2'-deossi-adenosina (N⁴-Benzoil)-3'- β -cianoetil fosforammidito, utilizzando per il monomero di addizione, sciolto in CH₃CN anidro, una concentrazione di 35 mg/ml. L'accoppiamento, controllato monitorando l'assorbimento del catione 4,4'-dimetossitriifenilmetile rilasciato per trattamento acido, è avvenuto con resa dell'80%. Dopo rimozione del gruppo DMT per trattamento con una soluzione all'1% di DCA in DCM per 10 min a t.a. e acetilazione con Ac₂O in piridina per 30 min a t.a., la resina è stata trattata con 1 mL di una soluzione Et₃N•3HF/THF (1:1, v/v) per 18 ore a temperatura ambiente. Dopo ripetuti lavaggi con MeOH e CH₂Cl₂ è stata seccata a pressione ridotta e sottoposta ad un singolo ciclo di accoppiamento al sintetizzatore automatico di DNA con 3'-DMT-timidina-5'- β -cianoetil fosforammidito, sciolto in CH₃CN anidro, ad una concentrazione di 35 mg/ml. L'accoppiamento, controllato monitorando l'assorbimento del catione 4,4'-dimetossitriifenilmetile rilasciato per trattamento acido, è avvenuto con resa dell'80%. Dopo rimozione del gruppo DMT per trattamento una soluzione all'1% di DCA in DCM per 10 min a t.a. il supporto è stato trattato con una soluzione al 20% di piperidina in DMF a temperatura ambiente per 5 minuti e poi trattata con una soluzione di NH₄OH 17 M per 18 ore a 60° C. Il distaccato è stato seccato a pressione ridotta, ridisciolto in H₂O, filtrato e purificato per HPLC su colonna a fase inversa NUCLEOSIL[®] 100-5 C8. Per l'eluizione del grezzo è stato usato un gradiente lineare da 0 a 100 % di CH₃CN in H₂O in 30 min con flusso di 0.8 mL/min e rivelazione a $\lambda = 260$ nm. Il prodotto eluito a t_R=15.20 min è stato raccolto e caratterizzato mediante ¹H NMR ed ESI-MS.

¹H NMR (D₂O, 500 MHz), segnali significativi: 8.33 (1H, singoletto, H-2 A), 8.29 (1H, singoletto, H-8 A), 7.78 (1H, doppietto, H-6 U, V J=9.5 Hz, 7.53 (1H, singoletto, H-6 T), 6.44 (1H, doppio doppietto, H-1' A, J=7.0 e 7.5 Hz), 6.19 (1H, doppio doppietto, H-1' T, J=8.0 e 8.5 Hz), 6.11 (1H, doppietto, H-1' U, J=11.0 Hz), 5.80 (1H, doppietto, H-5 U, J=9.5 Hz), 3.35 (2H, multipletto, CH₂ ϵ Lys); H-3', H-2' U e H-3' A sono coperti dal segnale HDO residuo; 2.55 (2H, multipletto, H₂-2' A), 2.32 (2H, multipletto, H₂-2' T), 1.84 (3H, singoletto, CH₃ T), 1.68-1.49 (4H, segnali sovrapposti, CH₂ β and CH₂ δ Lys), 1.19 (2H, multipletto, CH₂ γ Lys).

³¹P NMR (D₂O, 161.98 MHz): 2.20 e 1.92.

Massa calcolata per C₃₅H₅₀N₁₂O₁₈P₂: 988.28.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 987.52.

ESI-MS [M-2H]²⁻: m/z 493.46.

Prove di distacco sul supporto ancorante la 5'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-2',3'-di-O-acetil-inosina (30)

1) Prova distacco con 17 M NH₄OH

35 mg di supporto solido **30** (0.21 meq/g) sono stati deprotetti dal gruppo DMT per trattamento con una soluzione all'1% di DCA in DCM fino a scomparsa del colore arancione dalla resina. Il supporto deprotetto è stato poi lavato ripetutamente con DCM, MeOH e quindi seccato a pressione ridotta. Il supporto **32** è stato poi

trattato con una soluzione di NH_4OH concentrato a 60°C per 18 ore. Il distaccato è stato seccato a pressione ridotta, ridisciolto in H_2O , filtrato e purificato per HPLC su colonna a fase inversa NUCLEOSIL[®] 100-5 C8. Per l'eluizione è stato usato un gradiente lineare da 0 a 100 % di CH_3CN in H_2O in 20 min con flusso di 0.8 mL/min e rivelazione a $\lambda = 260\text{ nm}$. I prodotti eluiti a $t_{\text{R}}=9.07\text{ min}$ e $t_{\text{R}}=11.00\text{ min}$, caratterizzati mediante $^1\text{H NMR}$ e confronto con campioni autentici, sono risultati essere rispettivamente inosina (**36**) e adenosina (**38**).

Inosina (**36**) - $^1\text{H NMR}$ (DMSO, 500 MHz): 12.44 (1H, singoletto slargato, NH), 8.37 (1H, singoletto, H-2), 8.11 (1H, singoletto, H-8), 5.90 (1H, doppietto, H-1', $J=5.7\text{ Hz}$), 5.54 (1H, singoletto slargato, OH in 2'), 5.25 (1H, singoletto slargato, OH in 3'), 5.12 (1H, singoletto slargato, OH in 5'), 4.52 (1H, doppietto, H-2', $J=5.7\text{ Hz}$), 4.16 (1H, singoletto, H-3'), 3.98 (1H, multipletto, H-4'), 3.68 (1H, multipletto, H-5'), 3.58 (1H, multipletto, H-5').

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO, 125 MHz): 156.51 (C-6), 148.12 (C-4), 145.84 (C-2), 138.70 (C-8), 124.32 (C-5), 87.36 (C-1'), 85.53 (C-4'), 74.03 (C-3'), 70.22 (C-2'), 61.19 (C-5').

Adenosina (**38**) - $^1\text{H NMR}$ (DMSO, 500 MHz)-: 8.38 (1H, singoletto, H-2), 8.17 (1H, singoletto, H-8), 7.41 (2H, singoletto slargato, NH_2), 5.91 (1H, doppietto, H-1'), 5.51 (1H, singoletto slargato, OH in 2'), 5.48 (1H, singoletto slargato, OH in 5'), 5.24 (1H, singoletto slargato, OH in 3'), 4.64 (1H, multipletto, H-2'), 4.17 (1H, multipletto, H-3'), 3.99 (1H, multipletto, H-4'), 3.69 (1H, multipletto, H-5'), 3.58 (1H, multipletto, H-5').

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO, 125 MHz): 156.86 (C-6), 153.16 (C-2), 149.84 (C-4), 140.72 (C-8), 120.09 (C-5), 88.75 (C-1'), 86.65 (C-4'), 74.26 (C-2'), 71.41 (C-3'), 62.41 (C-5').

2) Prova distacco con 2 M NH_3/MeOH

35 mg di supporto solido **30** (0.21 meq/g) sono stati deprotetti dal gruppo DMT per trattamento con una soluzione all'1% di DCA in DCM fino a scomparsa del colore arancione dalla resina. Il supporto deprotetto è stato poi lavato ripetutamente con DCM, MeOH e quindi seccato a pressione ridotta. Il supporto **32** è stato poi trattato con una soluzione 2 M di NH_3 in MeOH, a 60°C per 18 ore. Il distaccato è stato seccato a pressione ridotta, ridisciolto in H_2O , filtrato e purificato per HPLC su colonna a fase inversa NUCLEOSIL[®] 100-5 C8. Per l'eluizione è stato usato un gradiente lineare da 0 a 100 % di CH_3CN in H_2O in 30 min con flusso di 0.8 mL/min e rivelazione a $\lambda = 260\text{ nm}$. Il prodotto eluito a $t_{\text{R}}=10.07\text{ min}$, caratterizzato mediante dati $^1\text{H NMR}$ è risultato essere inosina (**36**) per confronto con un campione autentico e con dati di letteratura.

3) Prova distacco con 0.5 M NaOH

35 mg di supporto solido **30** (0.21 meq/g) sono stati deprotetti dal gruppo DMT per trattamento con una soluzione all'1% di DCA in DCM fino a scomparsa del

colore arancione dalla resina. Il supporto deprotetto è stato poi lavato ripetutamente con DCM, MeOH e quindi ossidato con una soluzione 0.5 M di acido *m*-cloroperbenzoico a temperatura ambiente per 1 ora. Il supporto è stato, poi, trattato con una soluzione 0.5 M di NaOH a 60° C per 18 ore. Il distaccato è stato seccato a pressione ridotta, ridisciolto in H₂O, filtrato e purificato per HPLC su colonna a fase inversa NUCLEOSIL[®] 100-5 C8. Per l'eluizione è stato usato un gradiente lineare da 0 a 100 % di CH₃CN in H₂O in 20 min con flusso di 0.8 mL/min e rivelazione a $\lambda = 260$ nm. Il prodotto eluito a $t_R=9.69$ min, caratterizzato mediante ¹H NMR, è risultato essere inosina (**36**) per confronto con un campione autentico e con dati di letteratura.

Parte sperimentale pgr 2.4-2.6

5'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-3'-O-acetil-timidina (**5**)

300 mg (1.2 mmol) di timidina, precedentemente anidrificati mediante ripetute coevaporate con piridina anidra, sono stati sciolti in 2 mL di piridina anidra e alla miscela risultante sono stati aggiunti 545 mg (1.6 mmol) di 4,4'-dimetossitritilcloruro e 15 mg (0.1 mmol) di DMAP. La miscela è stata tenuta a 25 °C per 18 ore e la reazione monitorata mediante TLC. La reazione è stata interrotta per aggiunta di MeOH e la miscela seccata a pressione ridotta. Il grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice eluita con un gradiente di MeOH in CHCl₃/piridina (1:0.1) dall'1% al 10%. Sono stati recuperati 545 mg (1.0 mmol) del prodotto desiderato (resa=83%).

Il prodotto così ottenuto è stato acetilato per trattamento con una miscela 1:3 (v/v) di Ac₂O/Py, per una notte a 25 °C. La miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta e lavata per tre volte con H₂O/CHCl₃. La fase organica è stata recuperata, anidrificata con MgSO₄, filtrata e concentrata. Sono stati recuperati 411 mg (0.7 mmol, resa=70%) del prodotto desiderato, puro per TLC ed NMR. R_f = 0.5 [eluente benzene/acetato di etile (9:1, v/v)].

5'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-2',3'-di-O-acetil-uridina (**6**)

300 mg (1.2 mmol) di uridina, precedentemente anidrificati mediante ripetute coevaporate con piridina anidra, sono stati sciolti in 2 mL di piridina anidra e alla miscela risultante sono stati aggiunti 520 mg (1.5 mmol) di 4,4'-dimetossitritilcloruro e 15 mg (0.1 mmol) di DMAP. La miscela è stata tenuta a 25 °C per 18 ore e la reazione monitorata mediante TLC. La reazione è stata interrotta per aggiunta di MeOH e la miscela seccata a pressione ridotta. Il grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice eluita con un gradiente dall'1 % al 10 % di MeOH in CHCl₃/Py (1:0.1, v/v). Sono stati recuperati 600 mg (1.1 mmol) del prodotto desiderato (resa=92%).

Il prodotto così ottenuto è stato acetilato per trattamento con una miscela 1:1 (v/v) di Ac₂O/Py, per una notte a 25 °C. La miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta e lavata per tre volte con H₂O/CHCl₃. La fase organica è stata recuperata, anidrificata con MgSO₄, filtrata e concentrata. Sono stati recuperati 500 mg (0.8 mmol, resa=73%) del prodotto desiderato, puro per TLC ed NMR. R_f = 0.8 [eluente CHCl₃/CH₃OH (9:1, v/v)].

5'-O-(*p*-toluensolfonil)-timidina

1.0 g (4.1 mmol) di timidina sono stati sciolti in 7 mL di piridina anidra e sono stati lasciati per 10 minuti alla temperatura di -10°C in un bagno di ghiaccio e NaCl. Sempre a -10°C alla miscela risultante sono state effettuate tre aggiunte di 288 mg (1.5 mmol) di *p*-toluensolfonilcloruro, a intervalli di 1 ora ciascuna. La miscela è stata tenuta alla temperatura di -10°C per 4 ore e la reazione monitorata mediante cromatografia su strato sottile. La reazione è stata interrotta per aggiunta di H_2O e la miscela seccata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice sospesa in CHCl_3 ed eluita con un gradiente di CH_3OH in CHCl_3 dallo 0% al 5%. Sono stati recuperati 850 mg (2.1 mmol) del prodotto desiderato (resa=51%), puro da controllo TLC ed NMR.

$R_f = 0.5$ [eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1, v/v)];

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): 11.5 (1H, singoletto, N-H), 7.89 (2H, doppietto, protoni aromatici del tosile, $J=8.1$ Hz), 7.56 (2H, protoni aromatici del tosile, $J=8.1$ Hz), 7.47 (1H, singoletto, H-6), 6.24 (1H, tripletto, H-1', $J=6.9$ Hz), 5.55 (1H, doppietto, OH 3'), 4.34-4.24 (3H, segnali sovrapposti, H-5' e H-3'), 3.96 (1H, multipletto, H-4'), 2.51 (3H, singoletto, CH_3 del tosile), 2.35-2.15 (2H, multipletto, H_2 -2'), 1.86 (3H, singoletto, CH_3 della timidina).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz): 163.61 (C-4), 150.33 (C-2), 145.17 (C-6), 135.86 (C quaternario legato allo S del tosile), 132.09 (C quaternario legato al CH_3 del tosile), 130.16, 127.59 (C del tosile), 109.79 (C-5), 83.95 (C-4'), 83.17 (C-1'), 70.12 (C-3'), 69.90 (C-5'), 38.316 (C-2'), 21.07 (CH_3 del tosile), 12.05 (CH_3 della timidina).

Massa calcolata per $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$: 396.10.

ESI-MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 419.23.

ESI-MS $[\text{M}+\text{K}]^+$: m/z 435.16.

5'-azido-timidina

A 850 mg (2.1 mmol) di 5'-O-(*p*-toluensolfonil)-timidina, sciolti in 4 mL di DMF anidra, sono stati aggiunti 210 mg (3.2 mmol) di NaN_3 e la reazione è tenuta a 100°C per 1 ora. La miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta e poi caricata su una colonna di gel di silice sospesa ed eluita con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 85:15 (v/v), ottenendo 550 mg (2.0 mmol) del prodotto desiderato (resa=95%), puro da controllo TLC ed NMR.

$R_f = 0.4$ [eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1, v/v)].

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 200MHz): 11.39 (1H, singoletto slargato, NH), 7.54 (1H, singoletto, H-6), 6.25 (1H, tripletto, H-1', $J=6$ Hz), 5.46 (1H, singoletto slargato, OH legato al C-3'), 3.89 (1H, multipletto, H-3'), 3.60 (2H, doppietto, H_2 -5', $J=5.2$ Hz), 2.55 (1H, singoletto, H-4'), 2.27 (2H, multipletto, H_2 -2'), 1.83 (3H, singoletto, CH_3 della timidina).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 50 MHz): 163.69 (C-4), 150.52 (C-2), 136.10 (C-6), 109.82 (C-5), 84.56 (C-4'), 83.87 (C-1'), 70.73 (C-3'), 51.69 (C-5'), 38.08 (C-2'), 12.09 (CH₃ della timidina).

Massa calcolata per C₁₀H₁₃N₅O₄: 267.24.

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 268.22.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 290.20.

ESI-MS [M+K]⁺: m/z 306.14.

5'-deossi-5'-ammino-timidina

550 mg (2.0 mmol) di 5'-α-azido-timidina sono stati sciolti in 35 mL di EtOH ed alla miscela risultante è stato aggiunto il 10% di (Pd)C. La miscela è stata lasciata sotto atmosfera di H₂ per 3 ore. La reazione è stata monitorata mediante TLC. La miscela di reazione è stata filtrata, seccata a pressione ridotta e sono stati recuperati 490 mg (2.0 mmol) del prodotto desiderato (resa=100%), puro da controllo TLC ed NMR.

R_f = 0.2 [eluente CHCl₃/CH₃OH (7:3, v/v)].

¹H NMR (D₂O, 200 MHz): 7.34 (1H, singoletto, H-6), 6.16 (1H, tripletto, H-1', J_{1,2}=6.8 Hz), 4.32 (1H, multipletto, H-3'), 3.90 (1H, multipletto, H-4'), 2.94 (2H, multipletto, H-5'), 2.30 (2H, multipletto, H₂-2'), 1.79 (3H, singoletto, CH₃ della timidina).

¹³C NMR (D₂O, 50 MHz): 166.29 (C-4), 151.00 (C-2), 135.06 (C-6), 109.25 (C-5), 83.26 (C-1' e C-4'), 69.22 (C-3'), 40.17 (C-2'), 35.66 (C-5'), 9.56 (CH₃ della timidina).

Massa calcolata per C₁₀H₁₅N₃O₄: 241.23.

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 242.17.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 264.16.

ESI-MS [M+K]⁺: m/z 280.14.

5'-N-(4-monometossitriifenilmetil)-timidina (12)

490 mg (2.0 mmol) di 5'-deossi-5'-ammino-timidina, precedentemente anidrificati mediante ripetute coevaporate con piridina anidra, sono stati sciolti in 10 mL di piridina anidra e alla miscela risultante sono stati aggiunti 975 mg (3.1 mmol) di 4-monometossitritilcloruro e 815 μL (4.7 mmol) di DIPEA. La miscela è stata tenuta a 25 °C per 3 ore e la reazione monitorata mediante cromatografia su strato sottile. La reazione è stata interrotta per aggiunta di CH₃OH e la miscela seccata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice sospesa in CHCl₃ ed eluita con CHCl₃ e lo 0.5% di piridina con un gradiente fino al 2% di CH₃OH. Sono stati recuperati 1.0 g (1.9 mmol) del prodotto desiderato (resa=95%), puro da controllo TLC ed NMR.

R_f = 0.4 [eluente CHCl₃/CH₃OH (95:5, v/v)];

¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): 11.40 (1H, singoletto slargato, N-H), 7.56-7.41 (14H, segnali complessi, protoni aromatici gruppo Mmtr), 6.39 (1H, tripletto, H-1'), 5.48 (1H, doppietto, OH legato al C-3'), 4.44 (1H, singoletto, H-3'), 4.07 (1H, doppietto, H-4', J=4.0 Hz), 3.97 (3H, singoletto, OCH₃ gruppo Mmtr), 2.89 (1H, tripletto, NH, J=8.0 Hz), 2.55-2.31 (4H, segnali sovrapposti, H₂-5' e H₂-2'), 1.94 (3H, singoletto, CH₃ della timidina).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): 163.66 (C-4), 150.39 (C-2), 138.94 (C-6), 157.38, 146.23, 137.74, 129.60, 128.26, 127.92, 127.68, 113.04 (C aromatici gruppo Mmtr), 109.74 (C-5), 85.75 (C-4'), 83.41 (C-1'), 71.12 (C-3'), 69.74 (C quaternario gruppo Mmtr), 54.93 (OCH₃), 46.09 (C-2'), 38.80 (C-5'), 12.12 (CH₃ della timidina).

Massa calcolata per C₃₀H₃₁N₃O₅: 513.58.

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 514.35.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 536.34.

ESI-MS [M+K]⁺: m/z 552.26.

5'-N-(4-monometossitriifenilmetil)-3'-O-metansolfonil-timidina

1.0 g (1.9 mmol) di **12**, sono stati sciolti in 10 mL di piridina anidra e alla miscela risultante sono stati aggiunti 200 µL (2.0 mmol) di cloruro di mesile e 650 µL (3.7 mmol) di DIPEA. La miscela è stata tenuta alla temperatura di 5° C per 1 ora e la reazione monitorata mediante cromatografia su strato sottile. La reazione è stata interrotta per aggiunta di CH₃OH e la miscela seccata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice eluita con CHCl₃ e lo 0.5% di piridina. Sono stati recuperati 1.0 g (1.7 mmol) del prodotto desiderato (resa=89%), puro da controllo TLC ed NMR.

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

¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): 8.62 (1H, singoletto, NH della timidina), 7.59-6.88 (14H, segnali complessi, protoni aromatici gruppo Mmtr), 6.19 (1H, tripletto, H-1', J_{1,2'}=65 Hz) 5.44 (1H, singoletto, H-3'), 4.19 (1H, singoletto, H-4'), 3.76 (3H, singoletto, OCH₃ gruppo Mmtr), 3.30 (3H, singoletto, CH₃ del mesile), 3.00 (1H, singoletto, NH), 2.58-2.34 (4H, segnali sovrapposti, H₂-5' e H₂-2'), 1.71 (3H, singoletto, CH₃ della timidina).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): 163.63 (C-4), 157.43, 146.13, 136.22, 129.62, 128.27, 127.71, 127.44, 113.05 (C aromatici gruppo Mmtr), 150.38 (C-2), 136.09 (C-6), 109.77 (C-5), 83.64 (C-4'), 83.01 (C-1'), 80.89 (C-3') 69.83 (C quaternario gruppo Mmtr), 54.95 (OCH₃), 45.29 (C-2'), 37.80 (CH₃ del mesile), 35.98 (C-5'), 12.01 (CH₃ della timidina).

Massa calcolata per C₃₁H₃₃N₃O₇S: 591.24.

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 592.29.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 614.29.

ESI-MS [M+K]⁺: m/z 630.26.

5'-N-(4-monometossitrifenilmetil)-timidina-2,3'-anidro (13)

1 g (1.7 mmol) di 5'-N-(4-monometossitrifenilmetil)-3'-O-metansolfonil-timidina sono stati sciolti in 15 mL di DMF anidra e alla miscela risultante sono stati aggiunti 252 μ L (1.7 mmol) di DBU. La miscela è stata tenuta a 100 °C per 30 minuti e la reazione monitorata mediante TLC. Un'aliquota della miscela di reazione è stata prelevata e purificata mediante cromatografia su una colonna di gel di silice fluita con un gradiente di MeOH in CHCl₃/Py (0:0.1, v/v) dallo 0 % al 5 %.

R_f = 0.2 [eluente CHCl₃/CH₃OH (95:5, v/v)]

¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): 7.61-6.62 (14H, segnali complessi, protoni aromatici gruppo Mmtr), 5.64 (1H, doppietto, H-1', J_{1':2'}=2.5 Hz), 5.12 (1H, singoletto, H-3'), 4.13 (1H, tripletto, H-4', J=5.5 Hz), 3.52 (3H, singoletto, OCH₃ gruppo Mmtr), 2.31 (2H, multipletto, H₂-2'), 2.03 (2H, multipletto, H₂-5'), 1.59 (3H, singoletto, CH₃ della timidina).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): 170.78 (C-4), 157.32, 149.58, 137.38, 129.62, 128.21, 127.64, 125.95, 112.99 (C aromatici gruppo Mmtr), 153.37 (C-2), 136.07 (C-6), 115.99 (C-5), 86.55 (C-4'), 84.34 (C-1'), 77.20 (C-3') 69.69 (C quaternario gruppo Mmtr), 54.89 (OCH₃), 43.86 (C-2'), 32.86 (C-5'), 13.03 (CH₃ della timidina).

Massa calcolata per C₃₀H₂₉N₃O₄: 495.58.

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 496.37.

5'-N-(4-monometossitrifenilmetil)-3'-deossi-3'- α azido-timidina (14)

Alla miscela di reazione contenente il derivato **13** sono stati aggiunti direttamente 550 mg (8.4 mmol) di sodio azide. La miscela è stata tenuta alla temperatura di 150°C per 2 ore e la reazione monitorata mediante cromatografia su strato sottile. Il grezzo di reazione è stato seccato a pressione ridotta, filtrato, e caricato su una colonna di gel di silice eluita con CHCl₃ contenente lo 0.5% di piridina ottenendo 490 mg (0.9 mmol) di prodotto desiderato (resa=53%), puro da controllo TLC ed NMR.

R_f = 0.6 [eluente CHCl₃/CH₃OH (95:5, v/v)];

¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): 11.4 (1H, singoletto slargato, NH della timidina), 7.56-6.89 (14H, segnali complessi, protoni aromatici gruppo Mmtr), 6.14 (1H, tripletto, H-1', J_{1':2'}=6 Hz), 4.64 (1H, multipletto, H-3'), 3.88 (1H, multipletto, H-4'), 2.84 (1H, tripletto, NH, J=8 Hz), 2.35-2.32 (4H, segnali sovrapposti, H₂-2' e H₂-5'), 1.81 (3H, singoletto, CH₃ della timidina).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): 163.65 (C-4), 157.43, 146.12, 137.60, 129.61, 128.25, 127.70, 126.08, 113.05 (C aromatici gruppo Mmtr), 150.38 (C-2), 136.23 (C-6), 109.79 (C-5), 83.13 (C-4'), 82.66 (C-1'), 60.45 (C-3'), 69.74 (C quaternario)

gruppo Mmtr), 54.94 (OCH_3), 45.17 (C-2'), 35.61 (C-5'), 12.09 (CH_3 della timidina).

Massa calcolata per $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_4$: 538.58.

ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 539.35.

ESI-MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 561.34.

ESI-MS $[\text{M}+\text{K}]^+$: m/z 577.26.

4-idrossi-benzil-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-etere (1)

Ad una soluzione di alcol 4-idrossibenzilico (500 mg, 4.0 mmol) in 8 ml di piridina anidra sono stati aggiunti 1.36 g (4.0 mmol) di DMTCl. La miscela di reazione è stata lasciata per 12 ore a 25 °C sotto agitazione e la reazione è stata monitorata mediante TLC. Dopo una notte la reazione è stata interrotta per aggiunta di MeOH, la miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta, ridisciolta in CHCl_3 e lavata per tre volte con H_2O ; la fase organica poi è stata anidrificata su MgSO_4 anidro e seccata sotto vuoto.

La fase organica è stata ridisciolta in benzene, caricata su una colonna di gel di silice eluita con un gradiente di AcOEt in benzene, dallo 0% al 10% contenente lo 0.5% di piridina, ottenendo 1.0 g (2.3 mmol, 57%) di prodotto risultato puro da controllo TLC ed NMR.

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

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 7.49-6.83 (segnali complessi, 13H, protoni aromatici, DMT); 7.24 (2H, doppietto, protoni aromatici dell'alcol benzilico, $J=8.5$ Hz), 6.80 (2H, doppietto, protoni aromatici dell'alcol benzilico, $J=8.5$ Hz), 4.72 (1H, singoletto, OH), 4.07 (2H, singoletto, $\text{OCH}_2\text{-Ar}$), 3.79 (6H, singoletto, 2 OCH_3 DMT).

Funzionalizzazione di Tentagel-OH e Tentagel-NH₂ con il linker 1

A 0.2 g di resina Tentagel[®]-NH₂ (0.29 meq/g, 0.05 mmol) e di Tentagel[®]-OH (0.28 meq/g, 0.05 mmol) sospesa in 500 μL di piridina anidra, sono stati aggiunti 403 mg (4.0 mmol) di anidride succinica e 61 mg (0.5 mmol) di DMAP, precedentemente anidrificati mediante ripetute coevaporate con piridina anidra e ridisciolti in 2.0 mL di piridina anidra. La miscela è stata lasciata sotto agitazione a 25 °C per 24 ore. La resina è stata poi lavata con piridina e DCM.

La resina succinilata è stata sospesa in 500 μL di piridina anidra e ad essa sono stati aggiunti 213 mg (0.5 mmol) di **1** precedentemente anidrificato per ripetute coevaporazioni con piridina anidra e DMAP (61 mg, 0.5 mmol) e ridisciolti in 500 μL di Py anidra, 76 mg (0.5 mmol) di HOBt precedentemente anidrificato per ripetute coevaporazioni con piridina anidra e risolto in 500 μL di Py anidra, 77 μL (0.5 mmol) di DIC e 43 μL (0.25 mmol) di DIEA. La miscela è stata tenuta sotto agitazione per circa 48 ore a 25°C. Il supporto risultante, dopo ripetuti lavaggi con piridina e DCM, è stato seccato a pressione ridotta per circa 2 ore. La funzionalizzazione, valutata spettroscopicamente mediante misure di assorbanza a $\lambda=498$ nm del catione DMT ($\epsilon=71700$ $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) rilasciato per trattamento acido

(HClO₄/EtOH 6:4 v/v) di campioni seccati e pesati del supporto, è risultata essere di 0.25 meq/g, corrispondenti a una resa media del 89 %, per la Tentagel-OH, e di 0.13 meq, corrispondenti ad una resa del 45%, per la Tentagel-NH₂.

Il supporto ottenuto, sospeso in 500 µL di piridina anidra, è stato trattato per 15 ore a 25 °C con 132 mg (0.5 mmol) di pentaclorofenolo precedentemente anidrificato per ripetute coevaporazioni con piridina anidra e DMAP (61 mg, 0.5 mmol) e ridisciolti in 500 µL di Py anidra, 76 mg (0.5 mmol) di HOBT precedentemente anidrificato per ripetute coevaporazioni con piridina anidra, e ridisciolti in 500 µL di Py anidra, 77 µL (0.5 mmol) di DIC e 43 µL (0.25 mmol) di DIEA. Il supporto risultante, dopo ripetuti lavaggi con piridina e DCM, è stato trattato per 5 minuti con una miscela piperidina/piridina (1:2, v/v) e poi nuovamente lavato e seccato a pressione ridotta ed infine deprotetto dal gruppo DMT per trattamento acido, lavando ripetutamente con una soluzione all'1% di DCA in DCM fino a scomparsa del colore arancione tipico del catione DMT. Il supporto deprotetto è stato poi lavato ripetutamente con Py e DCM e quindi seccato a pressione ridotta.

Funzionalizzazione della resina polistirenica con il linker 1

A 0.2 g di resina polistirenica (3.74 meq/g, 0.75 mmol) sospesa in 1.5 mL di piridina anidra, sono stati aggiunti 479 mg (1.1 mmol) di linker 1 precedentemente anidrificato per ripetute coevaporazioni con piridina anidra e DMAP (183 mg, 1.5 mmol) e ridisciolti in 1 mL di Py anidra, 580 µL (3.7 mmol) di DIC e 130 µL (0.75 mmol) di DIEA. La miscela è stata tenuta sotto agitazione per circa 48 ore a 25 °C. Il supporto risultante, dopo ripetuti lavaggi con piridina e DCM, è stato seccato a pressione ridotta per circa 2 ore. La funzionalizzazione, valutata spettroscopicamente mediante misure di assorbanza a $\lambda=498$ nm del catione DMT ($\epsilon=71700$ cm⁻¹M⁻¹) rilasciato per trattamento acido prolungato di 4 ore (HClO₄/EtOH 6:4 v/v) di campioni seccati e pesati del supporto, è risultata essere di 0.93 meq/g, corrispondenti a una incorporazione del linker in media del 25 %.

Il supporto ottenuto e sospeso in 1.5 mL di piridina anidra è stato trattato per 15 ore a 25 °C con 396 mg (1.5 mmol) di pentaclorofenolo, precedentemente anidrificato per ripetute coevaporazioni con piridina anidra e DMAP (183 mg, 1.5 mmol) e ridisciolti in 1.0 mL di Py anidra, 580 µL (3.7 mmol) di DIC e 137 µL (0.75 mmol) di DIEA. Il supporto risultante, dopo ripetuti lavaggi con piridina e DCM, è stato trattato per 5 minuti con una miscela piperidina/piridina (1:2, v/v) e poi nuovamente lavato e seccato a pressione ridotta ed infine deprotetto dal gruppo DMT per trattamento acido, lavando ripetutamente con una soluzione all'1% di DCA in DCM fino a scomparsa del colore arancione tipico del catione DMT. Il supporto deprotetto è stato poi lavato ripetutamente con Py e DCM e quindi seccato a pressione ridotta.

Funzionalizzazione del supporto Tentagel 3 con analoghi nucleosidici mediante reazione di Mitsunobu

A 0.2 g (0.05 mmol) del supporto 3 sono stati aggiunti 0.40 mmol dei nucleosidi 5, 6 e 7 sciolti in 300 µL di solvente anidro (THF, DCM, benzene) e il complesso azacomposto/fosfina, preparato a parte sciogliendo 1.75 mmol di fosfina in 300 µL di

solvente anidro e aggiungendo 1.75 mmol di azacomposto, mantenendo la miscela a 0°C per 20 min e poi a 25 °C per altri 10 min. La miscela è lasciata sotto agitazione per circa 5 ore alle temperature di 0°C, 25°C, e 80°C. Il supporto risultante, dopo ripetuti lavaggi con DCM, è stato seccato a pressione ridotta e trattato per 30 minuti a 25 °C con la miscela Py/Ac₂O (8:2, v/v), quindi è stato poi lavato ripetutamente con DCM e seccato a pressione ridotta.

La funzionalizzazione è stata valutata spettroscopicamente mediante misure di assorbanza a $\lambda=472$ nm del catione Mmtr ($\epsilon=46773$ cm⁻¹M⁻¹) rilasciato per trattamento acido prolungato per 4 ore (HClO₄/EtOH, 6:4, v/v) di campioni seccati e pesati di supporti **8**, **9** e **10** (Figura 16-18).

Funzionalizzazione del supporto polistirenico (4) con analoghi nucleosidici mediante reazione di Mitsunobu

A 0.2 g (0.19 mmol) del supporto **4** sono stati aggiunti 0.56 mmol di nucleoside **14** sciolti in 600 μ L di solvente anidro (THF, DCM, benzene) e il complesso azacomposto/fosfina, preparato a parte sciogliendo 1.90 mmol di fosfina in 600 μ L di solvente anidro e aggiungendo 1.90 mmol di azacomposto, mantenendo la miscela a 0°C per 20 min. e poi a 25 °C per altri 10 min. La miscela è stata tenuta sotto agitazione per circa 5 ore alle temperature di 0°C, 25°C, e 80°C. Il supporto risultante, dopo ripetuti lavaggi con DCM, è stato seccato a pressione ridotta e trattato per 30 minuti a 25 °C con la miscela Py/Ac₂O (8:2, v/v). Il supporto è stato poi lavato ripetutamente con DCM e seccato a pressione ridotta.

La funzionalizzazione è stata valutata spettroscopicamente mediante misure di assorbanza a $\lambda=472$ nm del catione Mmtr ($\epsilon=46773$ cm⁻¹M⁻¹) rilasciato per trattamento acido prolungato di 4 ore (HClO₄/EtOH, 6:4, v/v) di campioni seccati e pesati di supporto **16** (Figura 19) ed è risultata in media di 0.32 meq/g.

Accoppiamento con Fmoc-Tyr-OH

35 mg (0.11 mmol) del supporto solido **16** sono stati deprotetti dal gruppo Mmtr per trattamento con una soluzione all'1% di DCA in DCM. Il supporto è stato poi lavato ripetutamente con DCM e seccato a pressione ridotta. Alla resina, sospesa in 50 μ L di DMF sono stati dunque aggiunti 17 mg (1.0 mmol) di HOBt, precedentemente anidrificato, sciolto in 100 μ L di DMF anidra, 44 mg (1.0 mmol) di Fmoc-Tyr-OH, 38 mg (1.0 mmol) di HATU e 26 μ L (1.5 mmol) di DIPEA. La miscela è stata tenuta sotto agitazione per circa 12 ore a 25 °C. Il supporto ottenuto, dopo ripetuti lavaggi con DCM, è stato seccato a pressione ridotta.

La funzionalizzazione media, valutata spettroscopicamente mediante misure di assorbanza a $\lambda=301$ nm del fluorenile ($\epsilon=7800$ cm⁻¹M⁻¹) rilasciato per ripetuti trattamenti basici da 5 minuti ciascuno (piperidina/DMF al 20%) di campioni seccati e pesati del supporto, è risultata essere di 0.31 meq/g, corrispondenti a una resa media del 98 %. Sul supporto sono stati effettuati ripetuti trattamenti da 5 minuti ciascuno con una soluzione al 20% di piperidina in DMF fino a completa rimozione dell'Fmoc. Il supporto è stato successivamente trattato per 30 minuti a 25 °C con la miscela piridina/Ac₂O (8:2, v/v) ed infine lavato ripetutamente con DCM e seccato a pressione ridotta.

Successivamente, la resina è stata trattata con una soluzione di NH_4OH 17 M per 18 ore a 65°C . Il distaccato è stato seccato a pressione ridotta, ridisciolti in CH_3OH , e purificato su lastra semipreparativa usando come eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2, v/v). Il prodotto purificato è stato caratterizzato mediante dati ^1H NMR ed ESI-MS.

^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): 7.38 (1H, singoletto, H-6), 6.70-6.62 (4H, multipletto, protoni aromatici della tirosina), 5.95 (1H, tripletto, H-1', $J_{1',2'}=6.4$ Hz), 4.50 (1H, multipletto, H-4'), 3.85-3.75 (2H, multipletto, H-3' e H- α della tirosina), 3.40 (2H, multipletto, CH_2 della tirosina), 2.94 (2H, multipletto, H₂-5'), 2.23 (2H, multipletto, H₂-2'), 1.92 (3H, singoletto, CH_3 dell'acetile), 1.90 (3H, singoletto, CH_3 della timidina).

Massa calcolata per $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}_6$: 471.47.

ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 472.62.

ESI-MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 494.60.

ESI-MS $[\text{M}+\text{K}]^+$: m/z 510.55.

Accoppiamento con Fmoc-Lys(Fmoc)-OH

35 mg (0.1 mmol) del supporto solido **16** sono stati deprotetti dal gruppo Mmtr per trattamento con una soluzione all'1% di DCA in DCM. Il supporto è stato poi lavato ripetutamente con DCM e seccato a pressione ridotta. Alla resina, sospesa in 50 μL di DMF, sono stati dunque aggiunti 17 mg (1.0 mmol) di HOBt, precedentemente anidrificato, sciolto in 100 μL di DMF anidra, 65 mg (1.0 mmol) di Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, 38 mg (1.0 mmol) di HATU e 26 μL (1.5 mmol) di DIPEA. La miscela è stata tenuta sotto agitazione per circa 12 ore a 25°C . Il supporto ottenuto, dopo ripetuti lavaggi con DCM, è stato seccato a pressione ridotta.

La funzionalizzazione media, valutata spettroscopicamente mediante misure di assorbanza a $\lambda=301$ nm del fluorenilico ($\epsilon=7800\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) rilasciato per ripetuti trattamenti basici da 5 minuti ciascuno (piperidina/DMF al 20%) di campioni seccati e pesati del supporto, è risultata essere di 0.28 meq/g, corrispondenti a una resa media dell'88 %. Sul supporto sono stati effettuati ripetuti trattamenti da 5 minuti ciascuno con una soluzione al 20% di piperidina in DMF fino a completa rimozione dell'Fmoc.

Dopo ripetuti lavaggi con CH_2Cl_2 , la resina è stata trattata con una soluzione di NH_4OH 17 M per 18 ore a 65°C . Il distaccato è stato seccato a pressione ridotta, ridisciolti in H_2O con lo 0.1% di TFA, filtrato e purificato per HPLC su colonna a fase inversa NUCLEOSIL 100-5-C8. Per l'eluizione del grezzo è stato usato un gradiente lineare da 0% al 100% di CH_3CN in H_2O contenente lo 0.1% di TFA in 60 minuti con flusso 0.8 ml/min e rivelazione a $\lambda=260$ nm. Il prodotto purificato è stato caratterizzato mediante dati ^1H NMR ed ESI-MS.

^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): 7.40 (1H, singoletto, H-6), 5.97 (1H, tripletto, H-1') 4.45 (1H, multipletto, H-4'), 3.56 (1H, tripletto, CH α della lisina), 3.73 (1H, multipletto, H-3'), 2.77 (2H, multipletto, CH_2 ϵ della lisina), 2.95 (2H, multipletto, H₂-5'), 2.23 (2H, multipletto, H₂-2'), 1.90 (3H, singoletto, CH_3 della timidina), 1.73-1.43 (6H, multipletto, CH_2 β,γ,δ della lisina).

Massa calcolata per C₁₆H₂₆N₈O₄: 394.43.

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 395.40.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 417.38.

ESI-MS [M+K]⁺: m/z 433.31.

Accoppiamento con acido Ferrocenecarbossilico

35 mg (0.1 mmol) del supporto solido **16** sono stati deprotetti dal gruppo Mmtr per trattamento con una soluzione all'1% di DCA in DCM. Il supporto è stato poi lavato ripetutamente con DCM e seccato a pressione ridotta. Alla resina, sospesa in 50 μ L di DMF, sono stati dunque aggiunti 17 mg (1.0 mmol) di HOBt, precedentemente anidrificato, sciolto in 100 μ L di DMF anidra, 25 mg (1.0 mmol) di Fmoc-acido-ferracene-carbossilico, 38 mg (1.0 mmol) di HATU e 26 μ L (1.5 mmol) di DIPEA. La miscela è stata tenuta sotto agitazione per circa 12 ore a 25 °C. Il supporto ottenuto, dopo ripetuti lavaggi con DCM, è stato seccato a pressione ridotta.

La resina è stata trattata con una soluzione di NH₃ in MeOH 7 M per 12 ore a 65° C. Il distaccato è stato seccato a pressione ridotta ed è stato trattato con una soluzione di NH₄OH 17 M per 48 ore a 65°C. Il distaccato è stato seccato a pressione ridotta, risciolto in CHCl₃, filtrato e purificato per HPLC su colonna a fase diretta NUCLEOSIL 50-7. L'eluizione del grezzo è stata effettuata in isocratica con il 2% di CH₃OH in CHCl₃ con un flusso di 1 mL/min e rivelazione a λ =260 nm. Il prodotto purificato è stato caratterizzato mediante ¹H NMR e ESI-MS.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 7.03 (1H, singoletto, H-6), 5.88 (1H, tripletto, H-1', J_{1',2'}=6.4 Hz), 5.09 (1H, doppietto, H-3', J=4.2 Hz), 4.82 (1H, singoletto, H ciclopentadienile del ferrocene), 4.72 (1H, singoletto, H ciclopentadienile del ferrocene), 4.59 (2H, singoletto, H ciclopentadienile del ferrocene), 4.35 (5H, singoletto, H ciclopentadienile del ferrocene), 3.99-3.70 (3H, segnali sovrapposti, H-4' e H₂-5'), 2.75-2.15 (2H, multipletto, H₂-2'), 1.90 (3H, singoletto, CH₃ della timidina).

¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 188.60 (C carbonilico ferrocene), 163.19 (C-4), 150.85 (C-2), 135.42 (C-6), 111.00 (C-5), 88.72 (C-4'), 82.82 (C-1'), 70.74, 69.75, 68.56, 60.91 (C ferrocene) 68.05 (C-3'), 40.71 (C-2'), 36.34 (C-5'), 13.16 (CH₃ della timidina).

Massa calcolata per C₂₁H₂₂FeN₆O₄: 478.29.

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 479.30.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 501.27.

ESI-MS [M+K]⁺: m/z 517.22.

Accoppiamento con acido metil- α -2,3,4-tri-O-acetilglucuronico

35 mg (0.1 mmol) del supporto solido **16** sono stati deprotetti dal gruppo Mmtr per trattamento con una soluzione all'1% di DCA in DCM. Il supporto è stato poi lavato ripetutamente con DCM e seccato a pressione ridotta. Alla resina, sospesa in 50 μ L di DMF, sono stati dunque aggiunti 17 mg (1.0 mmol) di HOBt, precedentemente anidrificato, sciolto in 100 μ L di DMF anidra, 38 mg (1.0 mmol) di acido metil- α -2,3,4-tri-O-acetilglucuronico, 38 mg (1.0 mmol) di HATU e 26 μ L (1.5 mmol) di DIPEA. La miscela è stata tenuta sotto agitazione per circa 12 ore a 25 °C. Il supporto ottenuto, dopo ripetuti lavaggi con DCM, è stato seccato a pressione ridotta.

La resina è stata trattata con una soluzione di NH_4OH 17 M per 18 ore a 65°C. Il distaccato è stato seccato a pressione ridotta risolto in CH_3OH ed è stato purificato su lastra semipreparativa usando come eluente 85:15 (v/v) $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$. Il prodotto purificato è stato caratterizzato mediante ^1H NMR e ESI-MS.

^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): 7.52 (1H, singoletto, H-6), 6.14 (1H, tripletto, H-1'), 6.14 (1H, tripletto, H-1', $J_{1'-2'}=6.6$ Hz), 4.72 (1H, doppietto, H-1 residuo di acido glucuronico, $J=3.6$ Hz), 4.24 (1H, quadrupletto, H-3', $J=6.8$ Hz), 3.39 (3H, singoletto, OCH_3 glucuronico), 3.89 (1H, quadrupletto, H-4', $J=5.0$ Hz), 3.79-3.41 (6H, segnali sovrapposti, H₂-5' e H-2, H-3, H-4 del residuo di acido glucuronico), 2.37 (2H, multipletto, H-2'), 1.92 (3H, singoletto, CH_3 della timidina);

^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz): 173.08 (C carbonilico glucuronico), 166.39 (C-4), 152.26 (C-2), 134.36 (C-6), 112.08 (C-5), 109.89 (C-1 del residuo di acido glucuronico), 86.05 (C-4'), 83.69 (C-1'), 74.77, 73.75, 73.02, 72.66 (C-2, C-3, C-4, C-5 del residuo di acido glucuronico), 62.29 (C-3'), 56.17 (OCH_3 del glucuronico), 41.28 (C-2'), 37.39 (C-5'), 12.35 (CH_3 della timidina).

Massa calcolata per $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_9$: 453.41.

ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 454.42.

ESI-MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 476.35.

PARTE SPERIMENTALE PGR 2.7

Funzionalizzazione del supporto con l'acido 3-cloro-4-idrossifenilacetico (2)

500.0 mg di resina Tentagel[®]- NH_2 HL (0.41 meq/g, 0.20 mmol) sono fatti reagire con una miscela di 382.0 mg (2.0 mmol) di acido 3-cloro-4-idrossifenilacetico, 317 μ L (2.0 mmol) di DIC, 352 μ L di DIEA e 313.6 mg (2.0 mmol) di N-idrossibenzotriazolo ($\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$), sciolti in 4 mL di piridina anidra per 18 ore a t.a. Successivamente il supporto è stato lavato ripetutamente con DCM, CH_3OH e Et_2O e seccato a pressione ridotta. Il test di Kaiser, eseguito su quantità seccate e pesate del supporto ha consentito di determinare che l'incorporazione del linker, è risultata pressochè quantitativa. Dopo acetilazione con Ac_2O in piridina a t.a. per 30 minuti,

il supporto è stato trattato con ammoniaca acquosa concentrata (28%) a 50° C per 1 ora.

Incorporazione della 5'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropil-fosforamidato-3'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)- timidina

A 500 mg (0.41 meq/g, 0.20 mmol) di supporto **2** sono stati aggiunti 4.5 mL (2.03 mmol) della soluzione attivante del sintetizzatore (0.45 M tetrazolo in CH₃CN) e 224 mg (0.31 mmol) di 5'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropil-fosforamidato-3'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-timidina. Dopo 1 ora il supporto è stato lavato con CH₃CN e trattato con 5 mL della soluzione ossidante del sintetizzatore (I₂/piridina/H₂O/THF) per 5 min. Dopo ripetuti lavaggi con CH₃CN, DCM e Et₂O, il supporto **3** risultante è stato seccato a pressione ridotta.

La completa ossidazione del fosfito triestere a fosfato triestere del supporto **3** è stata monitorata mediante analisi ³¹P NMR della resina sospesa in CDCl₃: è stata osservata la scomparsa del segnale a 135 ppm e la comparsa di un segnale a 4 ppm. Le rese di incorporazione del nucleotide nel supporto **2**, sono state valutate mediante test spettrofotometrico del catione DMT su quantità pesate di supporto secco **3**, e sono risultate sempre comprese tra 70-80% (0.28-0.32 meq/g).

Il supporto **3** è stato trattato con una soluzione all'1% di DCA in DCM per rimuovere il gruppo DMT e acetilato per trattamento con Ac₂O in piridina 1:1 (v/v). Successivamente il supporto è stato trattato con una soluzione di Et₃N/piridina 1:1 (v/v) per 1 ora a 50° C per rimuovere il cianoetile dal fosfato. La completa deprotezione è stata confermata mediante analisi ³¹P NMR del supporto sospeso in CDCl₃ dalla coalescenza dei due segnali del P(V) chinale, in un segnale a circa -3 ppm.

Procedura generale per la sintesi in fase solida di nucleosidi 5'fosfodiesteri 5-8

30 mg (0.28 meq/g, 0.0084 mmol) di supporto **4** secco sono stati lavati con piridina anidra e poi trattati con una miscela di 0.084 mmol dell'alcol prescelto e 25 mg (0.084 mmol) di 1-mesitilenesulfonil-3-nitro-1,2,4-triazolo (MSNT) in 300 µL di piridina anidra per 12 ore a t.a. Dopo ripetuti lavaggi con piridina, CH₃OH, DCM e Et₂O, gli analoghi sintetizzati sono stati distaccati dal supporto mediante trattamento con ammoniaca acquosa concentrata a 50 °C per 5 ore.

Procedura generale per la sintesi in fase solida di nucleosidi 5'fosforamidato (9-12)

30 mg (0.28 meq/g, 0.0084 mmol) di supporto **4** secco sono stati lavati con piridina anidra. Il supporto è stato, poi, trattato con 1 mL di una soluzione di *p*-tosil cloruro (0.2 M *p*-TsCl, 0.4 M *N*-metil imidazolo in piridina) per 15 min a t.a. per generare l'estere attivato e, in seguito ad opportuni lavaggi con piridina anidra, trattato con 1 mL di una soluzione dell'ammina prescelta (0.45 M in piridina). Dopo lavaggi con piridina, CH₃OH, DCM e Et₂O, gli analoghi desiderati sono stati distaccati dal supporto mediante trattamento con ammoniaca acquosa concentrata a 50 °C per 5 ore.

I grezzi distaccati sono stati analizzati mediante HPLC con una colonna in fase inversa. In tutti i casi, i profili HPLC degli analoghi distaccati hanno evidenziato la presenza di un unico picco che integra per il 90 % dell'area totale dello spettro. Tipicamente, in un esperimento, a partire da 30 mg di supporto **4** è stato possibile ottenere 2-4 mg degli analoghi desiderati puliti. Le rese di recupero degli analoghi **5 - 12**, valutate mediante analisi UV quantitativa a 260 nm, sono sempre state comprese tra il 70-80%, riferite alla funzionalizzazione iniziale del supporto.

Timidina 5'-HEG (5)

¹H NMR (D₂O, 400 MHz): 7.78 (1H, singoletto, H-6 T), 6.39 (1H, doppio doppietto, H-1' T, J = 7.2 e 7.2 Hz), 4.63 (1H, multipletto, H-3' T), 4.21 (1H, multipletto, H-4' T), 4.13 (2H, multipletto, H₂-5' T), 4.05 (2H, multipletto, CH₂OPO₃), 3.87-3.67 (22H, segnali sovrapposti, OCH₂ residuo dell'esaetilenglicole), 2.42 (2H, multipletto, H₂-2' T), 1.97 (3H, singoletto, CH₃ T).

³¹P NMR (D₂O, 161.98 MHz): 3.3.

Massa calcolata per C₂₂H₃₉N₂O₁₄P : 586.21.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 585.50.

Timidina 5'-cicloesano (6)

¹H NMR (D₂O, 400 MHz): 7.79 (1H, singoletto, H-6 T), 6.41 (1H, doppio doppietto, J = 6.8 e 6.8 Hz, H-1' T), 4.66 (1H, multipletto, H-3' T), 4.22 (1H, multipletto, H-4' T), 4.11 (3H, segnali sovrapposti, CH cicloesano e H₂-5' T), 2.46 (2H, multipletto, H₂-2' T), 1.99 (3H, singoletto, CH₃ T), 1.73 (4H, m, 2CH₂-CH-O), 1.44-1.24 (6H, segnali sovrapposti, altri 3 CH₂ del cicloesano).

³¹P NMR (D₂O, 161.98 MHz): 2.7.

Massa calcolata per C₁₆H₂₅N₂O₈P : 404.13.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 403.42.

Timidina 5'-mannosio (7a e 7b)

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) **7a e 7b** come miscela: 7.84 e 7.82 (due singoletti, H-6 T), 6.41 (doppio doppietto, H-1' T, J = 6.8 e 6.8 Hz), 5.06 e 5.03 (due singoletti, H-1 mannosio), 4.65 (multipletto, H-3' T), 4.31 – 3.74 (segnali sovrapposti, H-4' e H₂-5' T e H-2, H-3, H-4, H-5 e H₂-6 mannosio), 3.49 e 3.46 (due singoletti, 1-OCH₃ mannosio), 2.43 (multipletto, H₂-2' T), 1.99 e 1.98 (due singoletti, CH₃ T), 1.58, 1.55, 1.45 e 1.42 (due singoletti, CH₃ acetone).

³¹P NMR (D₂O, 161.98 MHz): 3.5, 2.7.

Massa calcolata per C₂₀H₃₁N₂O₁₃P: 538.16.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 537.39.

Timidina 5'-colesterolo (8)

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): 7.79 (1H, singoletto, H-6 T), 6.35 (1H, doppio doppietto, H-1' T, J = 6.4 e 6.4 Hz), 5.32 (1H, multipletto, H-6 colesterolo), 4.50 (1H, multipletto, H-3' T), 4.04-3.90 (3H, segnali sovrapposti, H-4' e H₂-5' T), 3.65 (1H, singoletto, H-3 colesterolo), 2.30 (2H, multipletto, H₂-2' T), 2.20-0.65 (segnali complessi del colesterolo), 1.94 (3H, singoletto, CH₃ T).

³¹P NMR (CD₃OD, 161.98 MHz): 2.6.

Massa calcolata per C₃₇H₅₉N₂O₈P: 690.40.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 689.78.

Timidina 5'-butilammina (9)

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): 7.89 (1H, singoletto, H-6 T), 6.35 (1H, doppio doppietto, H-1' T, J = 6.4 e 6.4 Hz), 4.52 (1H, multipletto, H-3' T), 4.03 (1H, segnale slargato, H-4' T), 3.96 (2H, segnale slargato, H₂-5' T), 2.86 (2H, multipletto, CH₂-NH), 2.33-2.18 (2H, multipletto, H₂-2' T), 1.95 (3H, singoletto, CH₃ T), 1.46 (2H, multipletto, CH₃-CH₂-CH₂-CH₂-NH), 1.32 (2H, multipletto, CH₃-CH₂-CH₂-CH₂-NH), 0.89 (3H, tripletto, J = 7.2 Hz, CH₃ del butile).

³¹P NMR (CD₃OD, 161.98 MHz): 11.5.

Massa calcolata per C₁₄H₂₄N₃O₇P: 377.14.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 376.34.

Timidina 5'-geranilammina (10)

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): 7.89 (1H, doppietto, H-6 T, J=1.2 Hz), 6.35 (1H, doppio doppietto, H-1' T, J = 8.0 e 6.0 Hz), 5.29 (1H, tripletto, CH-CH₂NH olefinico, J = 7.6 Hz), 5.08 (1H, tripletto apparente, CH-CH₂CH₂ olefinico, J = 1.2 e 1.6 Hz), 4.51 (1H, multipletto, H-3' T), 4.02 (1H, multipletto, H-4' T), 3.97 (2H, tripletto apparente, H₂-5' T, J = 4.4 e 2.8 Hz), 3.48 (2H, tripletto, CH₂-NH, J = 8.0 Hz), 2.33-2.15 (2H, multipletto, H₂-2' T), 2.06 (2H, tripletto, CH₂-CH₂, J = 7.6 Hz), 1.98-1.93 (5H, segnali sovrapposti, CH₃ T e CH₂-CH₂), 1.65, 1.61, 1.58 (3H ciascuno, singoletto, 3 x CH₃).

³¹P NMR (CD₃OD, 161.98 MHz): 11.2.

Massa calcolata per C₂₀H₃₂N₃O₇P: 457.20.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 456.35.

Timidina 5'-fenilalanina (11)

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): 7.85 (1H, singoletto, H-6 T), 7.36-7.24 (5H, multipletto, protoni aromatici Phe), 6.33 (1H, doppio doppietto, H-1' T, J = 6.0 e 6.0

Hz), 4.60 (1H, multipletto, H-3' T), 4.05 (1H, multipletto, CH α Phe), 3.95 (1H, multipletto, H-4' T), 3.93 (2H, multipletto, H₂-5' T), 3.63 (2H, CH₂ Phe), 3.10 (2H, multipletto, CH₂-NH), 2.65 (2H, multipletto, CH₂-CH₂NH), 2.30-2.15 (2H, multipletto, H₂-2' T), 1.91 (3H, singoletto, CH₃ T), 1.60 (2H, multipletto, CH₂-CH₃), 0.90 (3H, tripetto, J = 7.2 Hz, CH₃).

³¹P NMR (CD₃OD, 161.98 MHz): 6.6.

Massa calcolata per C₂₃H₃₃N₄O₈P: 524.20.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 523.47.

Timidina 5'-benzilammia (12)

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): 7.84 (1H, singoletto, H-6 T), 7.36-7.17 (5H, multipletto, protoni aromatici), 6.32 (1H, doppio doppietto, H-1' T, J = 8.0 e 6.0 Hz), 4.65 (2H, sistema AB, CH₂-Ph) 4.41 (1H, multipletto, H-3' T), 3.98 (1H, multipletto, H-4'T), 3.93 (2H, multipletto, H₂-5' T), 2.25-2.13 (2H, multipletto, H₂-2' T), 1.93 (3H, singoletto, CH₃ T).

³¹P NMR (CD₃OD, 161.98 MHz): 10.8.

Massa calcolata per C₁₇H₂₂N₃O₇P: 411.12.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 410.26.

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 2

Procedure generali

Le misure UV e gli esperimenti di denaturazione termica sono state effettuate su uno spettrofotometro JASCO V-530, munito di un programmatore di temperatura ETC-505T.

Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR sono stati registrati su spettrometri Bruker WM 400, Varian-Gemini 200 e 300 e INOVA 500; tutti i chemical shift sono espressi in ppm utilizzando come riferimento il segnale residuo del solvente; le costanti di accoppiamento (J) sono espresse in Hz.

Gli spettri ^{31}P -NMR, sono stati registrati a 161.98 MHz su uno spettrometro Bruker WM-400 utilizzando H_3PO_4 all'85% come standard esterno.

Gli spettri di massa sono stati determinati con uno spettrometro Waters Micromass ZQ equipaggiato con una sorgente elettrospray. Gli spettri di massa MALDI-TOF sono stati determinati con uno spettrometro Voyager PerSeptive MALDI DE-PRO in modalità lineare utilizzando come matrice una miscela di acido picolinico e 3-idrossipicolinico.

Le TLC sono state eseguite su lastre analitiche di silice Merk (Kieselgel 40 F254) ed i prodotti sono stati visualizzati mediante luce UV a $\lambda = 254$ nm. Per le cromatografie su colonna è stata utilizzata silice Merk (Kieselgel 60, 0.063-0.200 mm).

L'1,3-propanditiolo è stato distillato prima dell'uso; il supporto solido Tentagel[®] (TG-NH₂, 0.29 meq/g) è un prodotto acquistato alla Novabiochem; il supporto solido LCAA-CPG-NH₂ è un prodotto acquistato alla Sigma.

La funzionalizzazione dei supporti è stata condotta in una piccola colonna di vetro di 7 cm di lunghezza e 1 cm di diametro interno, munita ad un'estremità di filtro di vetro e rubinetto e all'altra di tappo.

Gli ODN sono stati sintetizzati su un sintetizzatore Expedite PerSeptive Biosystems, utilizzando come unità di accrescimento 2'-deossinucleosidi-3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropil-fosforoammidato acquistati dalla Applied Biosystems.

Le analisi HPLC degli analoghi sintetizzati sono state condotte su un apparecchio Beckman System Gold munito di rivelatore UV Beckman mod. 166 e di un integratore Shimadzu Chromatopac C-R6A.

PARTE SPERIMENTALE PGR 2.1-2.6

β -1-azido-4,6-benziliden-D-glucopiranosio (2)

1.0 g (2.40 mmol) di α -bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucosio, sciolti in 7 mL di DMF anidra, è stato trattato con 470 mg (7.3 mmol) di sodio azide a 50 °C per 2 ore.

Dopo 2 ore la miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice sospesa in acetone ed eluita con CH₂Cl₂ dallo 0 % al 3 %. Sono stati recuperati 857 mg di β-1-azido-2,3,4,6-tetra-O-acetil D-glucosio (2.3 mmol, 95 %).

Il prodotto ottenuto (857 mg, 2.3 mmol) è stato trattato con 2 mL di NH₃/MeOH 7 N a 50 °C per 18 ore. La miscela è stata seccata sotto vuoto e poi ridisciolta in 7 mL di DMF anidra, trattata con 20 mg (0.11 mmol) di PTSA e 570 μL (4.6 mmol) di α,α-dimetossitoluene a 50 °C per 6 ore. La miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su una colonna di gel di silice eluita con acetone in CH₂Cl₂ dal 5 % al 10 %. Sono stati recuperati 685 mg (1.84 mmol, 80 %) del composto **2**.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.50-7.33 (5H, segnali complessi, protoni aromatici), 5.57 (1H, singoletto, PhCH), 4.64 (1H, doppietto, H-1, J = 9.0 Hz), 4.30 (1H, multipletto, H-5), 3.79 (1H, tripletto, H-6_a, J = 10.5 e 10.0 Hz), 3.67 (1H, tripletto, H-4, J = 8.5 e 9.5 Hz), 3.55 (1H, multipletto, H-6_b), 3.49 (1H, tripletto, H-2, J = 9.0 e 9.5 Hz), 3.31 (1H, tripletto, H-3, J = 9.0 e 9.5 Hz).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 139.49, 130.45, 129.91, 129.53 e 128.00 (carboni aromatici), 103.41 (PhCH), 92.96 (C-1β), 82.33 (C-2), 76.03 (C-3), 75.17 (C-4), 70.17 (C-5), 69.89 (C-6).

Massa calcolata per C₁₃H₁₅N₃O₅: 293.27.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 316.40.

[M+K]⁺: m/z 332.51.

β-1-azido-2,3-di-O-acetil-D-glucopiranosio (3)

Il composto **2** (685 mg, 1.84 mmol) è stato trattato con 2 mL di Ac₂O in 3 mL di piridina anidra a t.a. Dopo 1 ora, la miscela di reazione è stata seccata a pressione ridotta e il grezzo è stato trattato con 5 mL di TFA/H₂O/DCM (1:0.5:10 v/v/v) a 0 °C per 3 ore. La reazione è stata bloccata con piridina, seccata a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su una colonna di gel di silice eluita con CH₃OH in CHCl₃ dall'1 % al 5 %. Sono stati recuperati 477 mg (1.65 mmol, 90 %) di prodotto **3**.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 5.09 (1H, tripletto, H-3, J = 9.5 e 9.0 Hz), 4.81 (1H, doppietto, H-1, J = 5.5 Hz), 4.75 (1H, tripletto, H-2, J = 9.5 e 9.0 Hz), 3.92-3.72 (2H, multipletto, H₂-6), 3.61 (1H, tripletto, H-4, J = 9.5 e 9.5 Hz), 3.53 (1H, multipletto, H-5), 2.04 e 2.03 (3H ciascuno, singoletto, COCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 172.54 e 171.68 (2 CO), 89.46 (C-1β), 80.50 (C-5), 77.22 (C-3), 73.19 (C-2), 69.51 (C-4), 62.48 (C-6), 21.28 e 21.05 (COCH₃).

Massa calcolata per C₁₀H₁₅N₃O₇: 289.24.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 312.16.

[M+K]⁺: m/z 328.16.

β -1-azido-2,3-di-O-acetil-6-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-D-glucopiranosio (4)

477 mg (1.64 mmol) di prodotto **3**, sciolti in 4 mL di piridina anidra, sono stati trattati con 670 mg (1.98 mmol) di DMTCl e 10 mg (0.08 mmol) di DMAP a 25 °C per 18 ore. La reazione è stata bloccata per aggiunta di metanolo e la miscela risultante concentrata sotto vuoto e purificata mediante una cromatografia su una colonna di gel di silice eluita con acetato di etile in benzene /Py (1:0.5 v/v) dal 5% al 15%. Sono stati recuperati 827 mg (1.40 mmol, 85 %) di prodotto **4**.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.45-6.84 (13H, segnali complessi, protoni aromatici), 5.06 (1H, tripletto, H-3, $J = 9.0$ e 10.0 Hz), 4.91 (1H, tripletto, H-2, $J = 9.0$ e 9.5 Hz), 4.60 (1H, doppietto, H-1, $J = 8.5$ Hz), 3.84 (1H, tripletto, H-4, $J = 10.0$ e 9.0 Hz), 3.82 (6H, singoletto, OCH_3), 3.56 (1H, multipletto, H-5), 3.45 (2H, multipletto, H₂-6), 2.09 e 2.08 (3H ciascuno, singoletti, COCH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 170.83 e 169.44 (2 CO), 158.50, 144.19, 135.29, 129.90, 129.86, 127.87, 126.86 e 113.17 (carboni aromatici), 87.47 (C-1 β), 86.68 (carbonio quaternario del gruppo DMT), 76.22 (C-5), 74.98 (C-3), 70.75 (C-2), 70.17 (C-4), 63.21 (C-6), 55.08 (OCH_3), 20.66 e 20.51 (COCH_3).

Massa calcolata per $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_7$: 591.61.

ESI-MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 614.15.

$[\text{M}+\text{K}]^+$: m/z 530.31.

β -1-azido-2,3-di-O-acetil-6-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-4-O-succinil-D-glucopiranosio (5)

827 mg (1.40 mmol) di composto **4**, disciolti in 4 mL di piridina anidra, sono stati trattati con 630 mg (6.21 mmol) di anidride succinica e 10 mg (0.074 mmol) di DMAP a 25 °C per 18 ore. La reazione è stata bloccata per aggiunta di acqua, concentrata a pressione ridotta e lavata per tre volte con CHCl_3 . La fase organica è stata recuperata e caricata su una colonna di gel di silice eluita con CH_3OH in CHCl_3/Py (1:0.05, v/v) dal 2 % al 10 %. Sono stati recuperati 870 mg del composto **5** (1.26 mmol, 90 %).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.45-6.82 (13H, segnali complessi, protoni aromatici), 5.30 (1H, tripletto, H-4, $J = 10.0$ e 10.0 Hz), 5.19 (1H, tripletto, H-3, $J = 10.0$ e 10.0 Hz), 5.01 (1H, tripletto, H-2, $J = 9.0$ e 9.0 Hz), 4.65 (1H, doppietto, H-1, $J = 8.5$ Hz), 3.77 (6H, singoletto, OCH_3), 3.69 (1H, multipletto, H-5), 3.33-3.09 (2H, multipletto, H₂-6), 2.49-2.38 (4H, m, CH_2 gruppo succinico), 2.07 e 1.97 (3H ciascuno, singoletti, COCH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 170.27 e 170.23 (2 CO), 158.39, 144.34, 135.64, 129.25, 128.21, 127.75, 126.72 e 113.03 (carboni aromatici), 87.36 (C-1 β), 86.02 (carbonio quaternario del gruppo DMT), 75.51 (C-5), 72.57 (C-3), 70.94 (C-2), 68.18

(C-4), 61.42 (C-6), 55.05 (OCH₃), 28.69 e 28.61 (CH₂ gruppo succinico), 20.44 e 20.38 (COCH₃).

Massa calcolata per C₃₅H₃₇N₃O₁₂: 691.68.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 690.38.

β-1-azido-2,3,4-tri-O-acetil-6-O-tert-butildimetilsilil-D-glucopiranosio (7)

390 mg (1.9 mmol) di β-1-azido-glucosio, disciolti in 5 mL di DMF anidra, sono stati trattati con 420 mg (2.8 mmol) di TBDMSCl e 258 mg (3.8 mmol) di imidazolo a t.a. per 18 ore. La reazione è stata bloccata per aggiunta di acqua a 0 °C e la miscela risultante, ripresa in 100 mL di CHCl₃, è stata lavata per due volte con 5% NaHCO₃ e poi con acqua. La fase organica è stata recuperata e purificata su una colonna di gel di silice eluita con il di 5 % CH₃OH in CHCl₃. Sono stati recuperati 488 mg (1.6 mmol, 85 %) di prodotto pulito. Il composto è stato trattato direttamente con 2 mL di Ac₂O in 3 mL di piridina anidra a t.a. per 3 ore. La reazione è stata bloccata per aggiunta di CH₃OH, seccata a pressione ridotta e purificata su una colonna di gel di silice eluita con CHCl₃. Sono stati ottenuti 690 mg (1.60 mmol) di prodotto **7** pulito.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.17 (1H, tripletto, H-3, J = 9.6 e 9.6 Hz), 5.06 (1H, tripletto, H-4, J = 9.6 e 9.6 Hz), 4.89 (1H, tripletto, H-2, J = 9.2 e 9.2 Hz), 4.55 (1H, doppietto, H-1, J = 8.8 Hz), 3.76-3.66 (2H, multipletto, H-6), 3.60 (1H, multipletto, H-5), 2.03, 1.99 e 1.97 (3H ciascuno, singoletti, COCH₃), 0.86 {9H, singoletto, [(CH₃)₃C]Si}, 0.04 e 0.028 [3H ciascuno, singoletti, Si(CH₃)₂].

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 170.07, 169.07 e 169.00 (3 CO), 87.55 (C-1β), 76.78 (C-5), 72.87 (C-3), 70.71 (C-2), 68.20 (C-4), 61.93 (C-6), 25.63 {[(CH₃)₃C]Si}, 20.42 (3 x COCH₃), 18.17 [(CH₃)₃C], -5.54 [Si(CH₃)₂].

Massa calcolata per C₁₈H₃₁N₃O₈Si: 445.54.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 468.15.

[M+K]⁺: m/z 484.25.

Acido β-1-azido-2,3,4-tri-O-acetil-β-D-glucuronico (8)

690 mg (1.60 mmol) di composto **7** sono stati trattati con 3 mL di reattivo di Jones (5 g CrO₃/15 mL H₂O/5 mL H₂SO₄) a -15 °C per 15 min, poi portati lentamente a t.a. e lasciati per altre 3 ore. La reazione è stata bloccata per aggiunta di etanolo, neutralizzata per aggiunta di una soluzione al 5 % di NaHCO₃ e poi lavata con CHCl₃. La fase acquosa è stata portata a pH = 2 con HCl 3 M e lavata due volte con CHCl₃. Le frazioni organiche sono state riunite e seccate a pressione ridotta. Sono stati recuperati 497 mg (1.44 mmol, 90 %) di prodotto **8**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.30-5.25 (2H, segnali sovrapposti, H-3 e H-4), 4.97 (1H, tripletto, H-2, J = 8.6 e 9.4 Hz), 4.75 (1H, doppietto, H-1, J = 8.8 Hz), 4.17 (1H, multipletto, H-5), 2.08, 2.05 e 2.03 (3H ciascuno, singoletti, 3 x COCH₃).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 170.25, 169.74, 169.34 e 169.12 (3 CO e COOH), 87.63 (C-1 β), 73.25 (C-5), 71.76 (C-2), 70.16 (C-3), 68.63 (C-4), 20.29 (3 x COCH_3).

Massa calcolata per $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_9$: 345.26.

ESI-MS $[\text{M}-\text{H}]^-$: m/z 344.18.

β -1-azido-lattosio peracetilato (10)

1.0 g (1.47 mmol) di lattosio peracetilato sono stati trattati con 86 μL (0.73 mmol) di SnCl_4 e 485 μL (3.67 mmol) di trimetilsililazide in 20 mL di CH_2Cl_2 anidro e 1 mL di setacci molecolari 4 \AA sotto atmosfera di azoto per 18 ore a t.a. La miscela di reazione è stata lavata due volte con 1 M KHSO_4 e poi con acqua. Le frazioni organiche sono state riunite e seccate con MgSO_4 anidro. Sono stati ottenuti 879 mg (1.32 mmol, 90 %) di composto **10**.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 5.33 (1H, multipletto, H-4 Gal), 5.19 (1H, tripletto, H-3 Glc, $J = 9.0$ e 9.0 Hz), 5.08 (1H, tripletto, H-2 Gal, $J = 8.5$ e 9.5 Hz), 4.94 (1H, doppio doppietto, H-3 Gal, $J = 3.5$ e 10.5 Hz), 4.84 (1H, tripletto, H-2 Glc, $J = 9.5$ e 9.5 Hz), 4.61 (1H, doppietto, H-1 Glc, $J = 9.0$ Hz), 4.47 (1H, doppietto, H-1 Gal, $J = 7.5$ Hz), 4.12-4.04 (4H, segnali sovrapposti, H₂-6 Glc e H₂-6 Gal), 3.86 (1H, tripletto, H-5 Gal, $J = 7.0$ e 7.0 Hz), 3.80 (1H, tripletto, H-4 Glc, $J = 9.5$ e 9.5 Hz), 3.69 (1H, multipletto, H-5 Glc), 2.08, 2.05, 2.04, 1.98, 1.97, 1.96 e 1.87 (3 H ciascuno, singoletti, 7 x COCH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 170.13, 169.44, 169.86, 169.45, 169.31 e 168.89 (CO), 100.93 (C-1 β Gal), 87.53 (C-1 β Glc), 75.61 (C-4 Glc), 74.63 (C-5 Glc), 72.36 (C-3 Glc), 70.82 (C-5 Gal), 70.75 (C-3 Gal), 70.58 (C-2 Glc), 68.89 (C-2 Gal), 66.43 (C-4 Gal), 61.56 (C-6 Gal), 60.62 (C-6 Glc), 20.62, 20.55, 20.44 e 20.32 (COCH_3).

Massa calcolata per $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_{17}$: 661.57.

ESI-MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 684.17.

$[\text{M}+\text{K}]^+$: m/z 700.14.

4,6-benziliden-2,3-di-O-acetil- β -D-Galp(1 \rightarrow 4)- β -1-azido-2,3,6-tri-O-acetil-D-Glcp (11)

879 mg (1.32 mmol) di prodotto **10**, sono stati trattati con 6 mL di $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 7 N per 18 ore a 50 $^\circ\text{C}$. La miscela è stata seccata a pressione ridotta, ridisciolta in 7 mL di DMF anidra e trattati con 12 mg (0.06 mmol) di PTSA e 237 μL (1.58 mmol) di α,α -dimetossitoluene a 50 $^\circ\text{C}$ per 6 ore. La miscela di reazione è stata diluita con AcOEt e lavata due volte con acqua. La fase organica è stata seccata e poi acetilata per trattamento con Py/anidride acetica 3:2 (v/v) per 1 ora a t.a. La miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta e purificata su una colonna di gel di silice eluita con CH_2Cl_2 in acetone dall'1 % al 10 %. Sono stati recuperati 612 mg (0.92 mmol, 70 %) del prodotto **11**.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.44-7.37 (5H, segnali complessi, protoni aromatici), 5.46 (1H, singoletto, PhCH), 5.25-5.20 (2H, segnali sovrapposti, H-2 Gal e H-3 Glc), 4.90-4.87 (2H, segnali sovrapposti, H-3 Gal e H-2 Glc), 4.61 (1H, doppietto, H-1 Glc, J = 9.0 Hz), 4.53 (1H, doppietto, H-6_a Glc, J = 12.0 Hz), 4.48 (1H, doppietto, H-1 Gal, J = 8.5 Hz), 4.33 (1H, doppietto, H-4 Gal, J = 3.5 Hz), 4.29 (1H, doppietto, H-6_a Gal, J = 11.0 Hz), 4.13 (1H, doppio doppietto, H-6_b Glc, J = 5.0 Hz e 12.5 Hz), 4.05 (1H, doppietto, H-6_b Gal, J = 13.0 Hz), 3.81 (1H, tripletto, H-4 Glc, J = 9.5 and 9.5 Hz), 3.71 (1H, multipletto, H-5 Glc), 3.46 (1H, singoletto slargato, H-5 Gal), 2.12, 2.10, 2.06, 2.05 e 2.03 (3H ciascuno, singoletti, 5 x COCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.59, 170.14, 169.42, 168.77 e 160.85 (CO), 137.26, 129.12, 128.14 e 126.34 (carboni aromatici), 101.23 (PhCH), 100.94 (C-1β Gal), 87.74 (C-1β Glc), 75.33 (C-4 Glc e C-5 Glc), 74.93 (C-4 Gal), 72.97 (C-3 Glc), 71.91 (C-2 Glc), 70.74 (C-3 Gal), 68.83 (C-2 Gal), 68.30 (C-6 Glc), 66.41 (C-5 Gal), 61.60 (C-6 Gal), 20.69 e 20.47 (COCH₃).

Massa calcolata per C₂₉H₃₅N₃O₁₅: 665.60.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 688.28.

[M+K]⁺: m/z 704.21.

2,3-di-O-acetil-β-D-Galp(1→4)-β-1-azido-2,3,6-tri-O-acetil-D-Glcp (12)

612 mg (0.92 mmol) di composto **11** sono stati trattati con 5 mL di TFA/H₂O/DCM (1:0.5:10, v/v/v) a 0 °C per 3 ore. La reazione è stata bloccata per aggiunta di piridina, seccata a pressione ridotta e il residuo purificato su una colonna di gel di silice eluita con CH₃OH in CHCl₃ dall'1 % al 10 %. Sono stati recuperati 480 mg (0.83 mmol, 90 %) del composto **12**.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 5.21 (1H, tripletto, H-3 Glc, J = 9.5 e 9.5 Hz), 5.14 (1H, multipletto, H-2 Gal), 4.87-4.81 (3H, segnali sovrapposti, H-3 Gal, H-2 Glc e H-1 Glc), 4.56 (1H, doppietto, H-1 Gal, J = 7.5 Hz), 4.54-4.18 (2H, sistema ABX, H₂-6 Glc), 4.06 (1H, doppietto, H-4 Gal, J = 2.5 Hz), 3.92 (1H, tripletto, H-4 Glc, J = 9.0 e 9.0 Hz), 3.86 (1H, multipletto, H-5 Glc), 3.74 (2H, multipletto, H₂-6 Gal), 3.62 (1H, tripletto, H-5 Gal, J = 6.5 e 6.5 Hz), 2.12, 2.09, 2.08, 2.07 e 2.04 (3H ciascuno, singoletti COCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 172.83 e 171.81 (CO), 102.98 (C-1β Gal), 89.15 (C-1β Glc), 77.56 (C-4 Glc), 76.97 (C-5 Gal), 76.68 (C-5 Glc), 75.96 (C-3 Gal), 74.72 (C-3 Glc), 72.92 (C-2 Glc), 71.69 (C-2 Gal), 68.01 (C-4Gal), 63.99 (C-6 Glc), 62.17 (C-6 Gal), 21.60, 21.29, 21.16 e 20.99 (COCH₃).

Massa calcolata per C₂₂H₃₁N₃O₁₅: 577.49.

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z 600.15.

[M+K]⁺: m/z 616.31.

2,3-di-O-acetil-6-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-4-O-succinil-β-D-Galp(1→4)-β-1-azido-2,3,6-tri-O-acetil-D-Glcp (13)

480 mg (0.83 mmol) di composto **12**, disciolti in 4 mL di piridina anidra, sono stati trattati con 337 mg (0.99 mmol) di DMTCl e 5 mg (0.04 mmol) di DMAP a 25 °C per 18 ore. La reazione è stata bloccata per aggiunta di metanolo e concentrata a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante una cromatografia su colonna di gel di silice eluita con CHCl₃/Py 1:0.05 (v/v). Sono stati recuperati 624 mg (0.71 mmol, 85 %) di prodotto che è stato, poi, disciolto in 4 mL di piridina anidra e trattato con 320 mg (3.18 mmol) di anidride succinica e 5 mg (0.035 mmol) di DMAP a 25 °C per 18 ore. la reazione è stata bloccata per aggiunta di acqua e seccata a pressione ridotta. Il residuo, ripreso in 100 mL di CHCl₃, è stato lavato per due volte con acqua, concentrato a pressione ridotta e purificato su una colonna di gel di silice eluita con CH₃OH in CHCl₃/Py 1:0.05 (v/v) dal 2 % al 10 %. Sono stati recuperati 617 mg di composto **13** (0.60 mmol, 89 %).

¹H NMR (500 MHz, C₆D₆): δ 7.69-6.74 (13H, segnali complessi, protoni aromatici), 6.17 (1H, doppietto, H-4 Gal, J = 3.5 Hz), 5.62 (1H, multipletto, H-2 Gal), 5.41 (1H, doppio doppietto, H-3 Gal, J = 3.0 Hz e 10.5 Hz), 5.33 (1H, tripletto, H-3 Glc, J = 9.0 e 9.5 Hz), 5.12 (1H, tripletto, H-2 Glc, J = 9.5 e 9.0 Hz), 4.50 (1H, doppietto, H-6_a Glc, J = 10.5 Hz), 4.40 (1H, doppietto, H-1 Gal, J = 8.0 Hz), 4.14 (1H, segnali parzialmente sovrapposti, H-6_b Glc), 4.12 (1H, doppietto, H-1 Glc, J = 8.5 Hz), 3.78 (1H, multipletto, H-6_a Gal), 3.69 (1 H, multipletto, H-5 Gal), 3.48 (1H, multipletto, H-6_b Gal), 3.44 (4H, segnali sovrapposti, OCH₃ gruppo DMT e H-4 Glc), 3.27 (1H, multipletto, H-5 Glc), 2.64-2.21 (4H, multipletto, CH₂ gruppo succinico), 2.06, 1.98, 1.91, 1.81 e 1.78 (3H ciascuno, singoletti, COCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 174.23 (COOH), 171.66, 170.13, 170.05 e 169.10 (CO), 159.35, 149.46, 144.70, 135.91, 130.72, 130.62, 130.41, 113.65, 128.75, 127.34 e 123.69 (carboni aromatici), 101.71 (C-1β Gal), 87.66 (C-1β Glc), 87.09 (carbonio quaternario del gruppo DMT), 76.57 (C-4 Glc), 75.02 (C-5 Glc), 73.11 (C-3 Glc), 72.44 (C-5 Gal), 71.80 (C-3 Gal), 71.18 (C-2 Glc), 70.01 (C-2 Gal), 67.46 (C-4 Gal), 62.40 (C-6 Glc), 60.93 (C-6 Gal), 54.80 (OCH₃ gruppo DMT), 29.24 e 29.20 (CH₂ gruppo succinico), 20.85, 20.47, 20.36, 20.20 e 20.10 (COCH₃).

Massa calcolata per C₄₇H₅₃N₃O₂₀: 979.93.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 978.50.

2,3,4-tri-O-acetil-6-O-tert-butildimetilsilil-β-D-Galp(1→4)-β-1-azido-2,3,6-tri-O-acetil-D-Glcp (15)

381 mg (0.66 mmol) di composto **12**, disciolti in 5 mL DMF, sono stati trattati con 149 mg (0.99 mmol) di TBDMSCl e 90 mg (1.32 mmol) di imidazolo a t.a. per 18 ore. La reazione è stata bloccata per aggiunta di acqua a 0 °C e seccata a pressione ridotta. Il residuo è stato ridisciolto in 100 mL di CHCl₃, lavato due volte con 5 % NaHCO₃ e poi con acqua. Il grezzo è stato purificato su una colonna di gel di silice eluita con il 2 % di CH₃OH in CHCl₃. Sono stati recuperati 366 mg (0.52 mmol, 80

%) di un prodotto pulito che sono stati direttamente acetilati per trattamento con Py/anidride acetica 3:2 (v/v) a t.a. per 3 ore. La miscela di reazione è stata diluita con CHCl_3 e lavata due volte con acqua. Le frazioni organiche riunite sono state seccate a pressione ridotta. Sono stati recuperati 388 mg (0.52 mmol) del prodotto **15**.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 5.41 (1H, doppietto, H-4 Gal, $J = 3.0$ Hz), 5.17 (1H, tripletto, H-3 Glc, $J = 9.5$ e 9.0 Hz), 5.05 (1H, multipletto, H-2 Gal), 4.95 (1H, doppio doppietto, H-3 Gal, $J = 3.5$ Hz e 10.0 Hz), 4.82 (1H, tripletto, H-2 Glc, $J = 9.5$ e 9.0 Hz), 4.59 (1H, doppietto, H-1 Glc, $J = 8.5$ Hz), 4.49 (1H, doppietto, H-6_a Glc, $J = 12.0$ Hz), 4.43 (1H, doppietto, H-1 Gal, $J = 8.0$ Hz), 4.07 (1H, doppio doppietto, H-6_b Glc, $J = 4.5$ Hz e 12.0 Hz), 3.80 (1H, tripletto, H-4 Glc, $J = 10.0$ e 9.0 Hz), 3.69-3.61 (3H, segnali sovrapposti, H-5 Glc, H-6_a Gal e H-5 Gal), 3.52 (1H, tripletto, H-6_b Gal, $J = 7.5$ e 8.0 Hz), 2.10, 2.09, 2.04, 2.01, 2.00 e 1.93 (3H ciascuno, singoletti, 6 x COCH_3), 0.83 {9H, singoletto, $[(\text{CH}_3)_3\text{C}]\text{Si}$ }, -0.004 e -0.02 [3H ciascuno, singoletti, $(\text{CH}_3)\text{Si}$].

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 170.08, 169.86, 169.66, 169.30 e 168.97 (CO), 100.82 (C-1 β Gal), 87.50 (C-1 β Glc), 75.21 (C-4 Glc), 74.57 e 73.41 (C-5 Glc e C-5 Gal), 72.42 (C-3 Glc), 71.06 (C-3 Gal), 70.79 (C-2 Glc), 69.26 (C-2 Gal), 66.35 (C-4 Glc), 61.53 (C-6 Gal), 59.88 (C-6 Gal), 25.47 { $[(\text{CH}_3)_3\text{C}]\text{Si}$ }, 20.59, 20.45, 20.40 e 20.34 (COCH_3), 17.88 (carbonio quaternario del gruppo TBDMS), -5.86 e -5.91 [$(\text{CH}_3)_2\text{Si}$].

Massa calcolata per $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{16}\text{Si}$: 733.79.

ESI-MS [$\text{M}+\text{Na}^+$]: m/z 756.36.

[$\text{M}+\text{K}^+$]: m/z 772.32.

Acido- β -1-azido-2,2',3,3',4',6-esa-O-acetil-latturonico (16)

388 mg (0.52 mmol) di composto **15** sono stati trattati con 3 mL del reattivo di Jones (5 g $\text{CrO}_3/15$ mL $\text{H}_2\text{O}/5$ mL H_2SO_4) a -15 °C per 15 min, poi portati lentamente a t.a. e lasciati per altre 3 ore. La reazione è stata bloccata per aggiunta di etanolo e neutralizzata per aggiunta di una soluzione al 5 % di NaHCO_3 e lavata con CHCl_3 . La fase acquosa è stata portata a $\text{pH} = 2$ con HCl 3 M e lavata due volte con CHCl_3 . Le frazioni organiche sono state riunite e seccate a pressione ridotta. Sono stati recuperati 298 mg (0.47 mmol, 90 %) del prodotto **16**.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 5.68 (1H, doppietto, H-4 Gal, $J = 1.5$ Hz), 5.26 (1H, tripletto, H-3 Glc, $J = 9.5$ e 9.0 Hz), 5.12-5.05 (2H, segnali sovrapposti, H-2 Gal e H-3 Gal), 4.84 (1H, tripletto, H-2 Glc, $J = 8.5$ e 10.0 Hz), 4.68 (1H, doppietto, H-1 Glc, $J = 9.0$ e 9.0 Hz), 4.58 (1H, doppietto, H-1 Gal, $J = 8.0$ Hz), 4.50-4.47 (2H, segnali sovrapposti, H-6_a Glc e H-5 Gal), 4.16 (1H, multipletto, H-6_b Glc), 3.85-3.73 (2H, segnali sovrapposti, H-4 Glc e H-5 Glc), 2.12, 2.11, 2.09, 2.08, 2.07 e 2.06 (3H ciascuno, singoletti, 6 x COCH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ 172.72, 172.39, 171.92, 171.48, 171.30 e 171.12 (CO e COOH), 101.89 (C-1 β Gal), 88.67 (C-1 β Glc), 77.21 (C-5 Glc), 76.04 (C-5

Gal), 74.48 (C-2 Glc e C-3 Gal), 72.73 e 72.55 (C-2 Gal e C-3 Glc), 70.77 e 70.66 (C-4 Gal e C-4 Glc), 20.64, 20.57 e 20.48 (COCH₃).

Massa calcolata per C₂₄H₃₁N₃O₁₇: 633.51.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 632.18.

Acido-6-(4,4'-dimetossitrifenilmetossi)esanoico

500 µl (3.0 mmol) di etil 6-idrossiesanoato, disciolti in 4 mL di piridina anidra, sono stati trattati con 1.0 g (3.0 mmol) di DMTCl e 190 mg (1.5 mmol) di DMAP per 4 ore a t.a. La reazione è stata bloccata per aggiunta di CH₃OH e concentrata a pressione ridotta. Il residuo è stato ripreso in 100 mL di CHCl₃ e lavato per due volte con acqua. Il residuo è stato disciolto in 4 mL di etanolo e trattato con 25 mL di NaOH 6 M per 6 ore a t.a. La miscela di reazione è stata diluita con CHCl₃ e lavata due volte con acqua. Dopo purificazione su una colonna di gel di silice eluita con acetone in CH₂Cl₂/Py 1:0.05 (v/v) è stato ottenuto 1.0 g (2.25 mmol, 75 %) del prodotto desiderato.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.42-6.88 (13H, segnali complessi, protoni aromatici), 3.86 (3H, singoletto, OCH₃), 3.12 (2H, tripletto, CH₂ ε, J = 4.4 Hz e 4.2 Hz), 2.42 (2H, tripletto, CH₂ α, J = 4.8 Hz e 5.2 Hz), 1.69 (4H, segnali sovrapposti, CH₂ β e CH₂ δ), 1.50 (2H, multipletto, CH₂ γ).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 179.79 (COOH), 158.20, 145.28, 136.55, 129.92, 128.07, 127.67, 126.54 e 112.89 (carboni aromatici), 85.59 (carbonio quaternario del gruppo DMT), 63.02 (CH₂ ε), 55.12 (OCH₃), 34.01 (CH₂ α), 29.68 (CH₂ β), 25.79 (CH₂ γ), 24.55 (CH₂ δ).

Massa calcolata per C₂₇H₃₀O₅: 434.52.

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 433.18.

Funzionalizzazione del supporto solido: sintesi di 18, 20 e 22

In un esperimento tipico, 300 mg di Tentagel[®]-NH₂ (0.29 meq/g, 0.09 mmol) sono fatti reagire con 0.90 mmol di **5** o **13**, 130 µL (0.90 mmol) di DIC, 117 mg (0.90 mmol) di HOBt e 150 µL (0.90 mmol) di DIEA in 500 µL di DMF anidra a t.a. per 12 ore. Dopo lavaggi con DCM, CH₃OH e Et₂O, il supporto è stato seccato a pressione ridotta. Le rese di incorporazione delle specie **5** o **13** sono risultate del 74% in media (0.20-0.23 meq/g), come determinato dal test del DMT condotto su campioni seccati e pesati dei supporti **6** o **14**. Il gruppo DMT è stato rimosso per trattamento con 1 % DCA in DCM seguito da un trattamento standard con anidride acetica in piridina (2:3, v/v) per bloccare le funzioni 6-OH liberate. 50 mg (0.0095 mmol) del supporto risultante sono stati trattati con 24 µL (0.24 mmol) di 1,3-propanditiolo e 33 µL (0.24 mmol) di trietilammina in 300 µL DMF sotto atmosfera di azoto per 2 ore a t.a. Dopo 2 ore, il supporto è stato lavato più volte con DMF anidra e accoppiato con l'acido carbossilico **8** o **16** (0.095 mmol), 16 µL (0.095 mmol) di DIEA, 37 mg (0.095 mmol) di HATU e 35 mg (0.095 mmol) di HOBt in

300 μ L di DMF per 1.5 ore a t.a. Successivamente è stato effettuato il trattamento dei supporti ottenuti **17**, **19** o **21** con 24 μ L (0.24 mmol) di 1,3-propanditiolo e 33 μ L (0.24 mmol) di trietilammina in 300 μ L di DMF sotto atmosfera di azoto per 2 ore a t.a. Dopo 2 ore, il supporto è stato lavato numerose volte con DMF anidra e accoppiato con il linker acido-6-(4,4'-dimetossitriifenilmetossi)esanoico (0.095 mmol), 16 μ L (0.095 mmol) di DIEA, 37 mg (0.095 mmol) di HATU e 35 mg (0.095 mmol) di HOBt in 300 μ L di DMF per 1.5 ore a t.a. La funzionalizzazione dei supporti ottenuti **18**, **20** e **22** è risultata sempre compresa tra 0.12-0.14 meq/g, come determinato dal test del DMT.

Sintesi dei 3'-glicoconiugati I, II e III

La sintesi dell'ODN è stata condotta su 50 mg (6.5 μ mol) dei supporti **18**, **20** o **22** su un sintetizzatore automatico di DNA sfruttando un protocollo standard di chimica del fosforamidito, con rimozione finale del gruppo DMT. La sequenza d(5'GCGTGCCTCCTCACTGGC3') è stata assemblata con rese, per singolo accoppiamento, sempre superiori al 98%, come valutato dal test del DMT per ogni accoppiamento. Gli oligomeri sono stati distaccati dal supporto e deprotetti mediante un trattamento con ammoniaca acquosa concentrata per 18 ore a 55°C. Il supernatante è stato filtrato e seccato a pressione ridotta. Una volta ridisciolti in acqua, è stato analizzato e purificato mediante HPLC su una colonna Nucleogel SAX (Macherey-Nagel, 1000-8/46) e utilizzando, come fasi mobili il sistema A, costituito da una soluzione acquosa 20 mM di KH₂PO₄ a pH=7 contenente il 20% di acetonitrile e il sistema B, costituito da una soluzione 1M di KCl, 20mM di KH₂PO₄ a pH=7 contenente il 20% di acetonitrile, con un gradiente lineare dallo 0% al 100% di B in 30 minuti. Gli oligomeri isolati a tempi di ritenzione : 21.37 min per **I**; 20.90 min per **II** e 17.13 min. per **III**, sono stati raccolti e desalificati mediante cromatografia ad esclusione molecolare su una colonna Sephadex G25 eluita con acqua. Dall'analisi HPLC su una colonna a fase inversa Nucleosil 100-5 C18 dei prodotti isolati è risultata, per ciascuno, una purezza maggiore del 98%.

Composto **I** Massa calcolata per C₁₉₀H₂₅₁N₆₄O₁₂₃P₁₈: 5954.06.
MALDI TOF-MS: m/z [M-H]⁻: 5952.57.

Composto **II** Massa calcolata per C₁₉₆H₂₆₁N₆₄O₁₂₈P₁₈: 6116.11.
MALDI TOF-MS: m/z [M-H]⁻: 6113.62.

Composto **III** Massa calcolata per C₂₀₂H₂₇₁N₆₄O₁₃₃P₁₈: 6278.17.
MALDI TOF-MS: m/z [M-H]⁻: 6276.56.

Esperimenti di degradazione enzimatica

5.0 OD del coniugato **III** sono stati incubati con 1.0 mL di siero fetale bovino a 37° C. Piccole aliquote della miscela sono state prelevate a determinati intervalli di tempo, tenuti a 85°C per 5 min, equilibrati a t.a. e analizzati mediante HPLC su una colonna a scambio anionico analitica. Un esperimento analogo, condotto su 5.0 OD di oligonucleotide non modificato di sequenza d(5'GCGTGCCTCCTCACTGGC3'),

ha dimostrato che l'ODN naturale viene degradato dopo 3 ore ad una miscela complessa di 3'- e 5'- mononucleotidi. Al contrario, l'oligomero **III** viene degradato in 6 ore.

Studi di denaturazione termica

La concentrazione degli ODN sintetizzati è stata determinata spettrofotometricamente a $\lambda=260$ nm e a 85°C, utilizzando come coefficiente di estinzione molare quello calcolato con i seguenti coefficienti: 15400 (A), 11700 (G), 7300 (C), 8800 (T) $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. In tutti i casi il contributo del residuo saccaridico a $\lambda=260$ nm è trascurabile. Una soluzione acquosa 100 mM di NaCl, 10 mM di NaH_2PO_4 a pH=7 è stata utilizzata per gli esperimenti di denaturazione termica. Le curve di fusione sono state registrate utilizzando una concentrazione di 1 μM per ogni filamento in 1 mL della soluzione in cuvettes con tappo di teflon e cammino ottico di 1 cm. Le soluzioni risultanti sono state riscaldate a 80 °C per 15 min e lentamente raffreddate e tenute a 5 °C per 30 min. Dopo equilibratura termica a 10 °C è stata monitorata l'assorbanza a 260 nm in funzione della temperatura variata di 0.5 °C/min nell'intervallo 20-80°C. Le temperature di fusione, determinate in corrispondenza del punto di flesso, sono la media dei valori ottenuti da tre differenti esperimenti di fusione. In tutti i casi studiati, sia la duplex naturale sia quella modificata hanno una temperatura di fusione pari a 60°C, nei limiti dell'errore sperimentale.

PARTE SPERIMENTALE PGR 2.7-2.9

Funzionalizzazione del supporto TG-NH₂ (1)

500 mg di TentaGel[®]-NH₂ LL (0.29 meq/g, 0.15 mmol) sono stati fatti reagire con una miscela di 280 mg (1.5 mmol) di acido-3-cloro-4-idrossifenilacetico, 230 μL (1.5 mmol) di DIC, 255 μL di DIEA e 227 mg (1.5 mmol) di N-idrossibenzotriazolo (HOBt·H₂O) disciolti in 6 mL di piridina anidra, per 18 ore a t.a. Dopo lavaggi con DCM, CH₃OH e Et₂O, il supporto è stato seccato a pressione ridotta. Il test di Kaiser, condotto su campioni seccati e pesati di supporto, ha evidenziato che l'incorporazione del linker è stata pressochè quantitativa. Dopo capping delle funzioni amminiche eventualmente non reagite con Ac₂O/Py (1:1, v/v) per 1 ora a t.a., il supporto è stato trattato con ammoniaca acquosa concentrata a 50 °C per 1 ora. Dopo lavaggi con CH₃OH, DCM e Et₂O, il supporto risultante **1** è stato seccato a pressione ridotta.

Funzionalizzazione del supporto LCAA-CPG-NH₂ (2)

500 mg di LCAA-CPG-NH₂ (0.10 meq/g, 0.05 mmol) sono stati fatti reagire con una miscela di 93 mg (0.5 mmol) di acido-3-cloro-4-idrossifenilacetico, 77 μL (0.5 mmol) di DIC, 85 μL di DIEA e 76 mg (0.5 mmol) di HOBt·H₂O disciolti in 4 mL di piridina anidra. Dopo lavaggi con DCM, CH₃OH e Et₂O, il supporto è stato seccato a pressione ridotta. Il test di Kaiser, condotto su campioni seccati e pesati di supporto,

ha evidenziato che l'incorporazione del linker è stata pressochè quantitativa. Dopo capping delle funzioni amminiche eventualmente non reagite con Ac₂O/Py (1:1, v/v) per 1 ora a t.a., il supporto è stato trattato con ammoniaca acquosa concentrata a 50°C per 1 ora. Dopo lavaggi con CH₃OH, DCM e Et₂O, il supporto risultante **2** è stato seccato a pressione ridotta.

Procedura generale per la preparazione dei supporti 4(a-d)

4.9 mL (2.2 mmol) della 'activator solution' del sintetizzatore (0.45 M tetrazolo in CH₃CN) sono stati aggiunti a 35 mmol di 2'-deossiribonucleoside-5'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforammidito-3'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetile) e 500 mg (0.29 meq/g, 0.14 mmol) di supporto **1**. Dopo 1 ora il supporto è stato lavato con CH₃CN e trattato per 3 volte con 5 mL della 'oxidizer' solution del sintetizzatore (I₂/piridina/H₂O/THF) per 5 min. Dopo lavaggi con CH₃CN, DCM e Et₂O, il supporto è stato seccato a pressione ridotta. La totale ossidazione del fosfito triestere a fosfato triestere è stata monitorata attraverso analisi ³¹P NMR della resina sospesa in CDCl₃ e confermata dalla scomparsa del segnale a 135 ppm e dalla comparsa di due segnali a -7 ppm. Le rese di incorporazione dei nucleotidi sono state sempre comprese tra 65-80% (0.19-0.22 meq/g), come determinato dal test del DMT eseguito su quantità seccate e pesate dei supporti **3(a-d)**. Dopo il capping con Ac₂O/piridina 1:1 (v/v), è stato rimosso il gruppo 2-cianoetile per trattamento con Et₃N/piridina (1:1, v/v) per 1 ora a 50 °C. La totale deprotezione del fosfato è stata confermata dalla presenza di un segnale a $\delta = ca. -6$ ppm nello spettro ³¹P NMR della resina sospesa in CDCl₃.

Procedura generale per la preparazione dei supporti 4e e 6e

1.1 mL (0.5 mmol) della 'activator solution' del sintetizzatore (0.45 M tetrazolo in CH₃CN) sono stati aggiunti a 0.08 mmol di 5'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforammidito-3'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-timidina o 5'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforammidito-2'-deossicitidina e 500 mg (0.10 meq/g, 0.05 mmol) di supporto **2**. Dopo 1 ora il supporto è stato lavato con CH₃CN e trattato per 3 volte con 5 mL della 'oxidizer' solution del sintetizzatore (I₂/piridina/H₂O/THF) per 5 min. Dopo lavaggi con CH₃CN, DCM e Et₂O, i supporti **3e** o **5e** sono stati seccati a pressione ridotta. Le rese di incorporazione dei nucleotidi sono state sempre comprese tra 80-99% (0.08-0.10 meq/g), come determinato dal test del DMT eseguito su quantità seccate e pesate dei supporti **3e** e **5e**. Dopo il capping con Ac₂O/piridina 1:1 (v/v), è stato rimosso il gruppo 2-cianoetile per trattamento con Et₃N/piridina (1:1, v/v) per 1 ora a 50 °C.

Approccio di coniugazione *pre-sintesi*: procedura generale per la preparazione degli oligomeri 11-14.

50 mg (0.20 meq/g, 0.01 mmol) di supporto secco **4(a-d)**, lavati con piridina anidra, sono fatti reagire con una miscela di 0.1 mmol dell'alcol prescelto e 30 mg (0.10 mmol) di 1-mesitilenesulfonil-3-nitro-1,2,4-triazolo (MSNT) in 500 μ L di piridina anidra per 12 ore a t.a. Dopo opportuni lavaggi con piridina, CH₃OH, DCM

e Et₂O, il supporto risultante è stato seccato a pressione ridotta. Le rese di coniugazione, valutate mediante test del DMT su quantità pesate e seccate del supporto dopo trattamento con ammoniaca (28% NH₄OH, 50 ° C, 5 ore), sono risultate comprese tra il 75 – 80 %.

Dopo reazione con il coniugante, sul supporto è stato assemblato l'ODN di sequenza prescelta su sintetizzatore automatico di DNA, utilizzando monomeri di accrescimento 3'-fosforammidito commercialmente disponibili. Il distacco dell'oligomero è stato realizzato per trattamento con una soluzione di ammoniaca acquosa (28%, 6 ore, 55 °C) e il grezzo distaccato è stato purificato mediante cromatografia ad esclusione molecolare su una colonna Sephadex G25 eluita con H₂O/EtOH 4:1 (v/v). La purezza dei composti isolati è stata verificata tramite analisi HPLC su una colonna a scambio ionico e la loro struttura è stata determinata mediante analisi di massa MALDI-TOF.

Approccio di coniugazione *pre*-sintesi: procedura generale per la preparazione degli oligomeri 15 e 16.

50 mg (0.10 meq/g, 0.005 mmol) di supporto **4e** (o **6e**) sono stati lavati con piridina anidra e trattati con 1 mL di una soluzione di *p*-tosil cloruro (0.2 M *p*-TsCl, 0.4 M *N*-metilimidazolo in piridina) per 15 min a t.a. per generare l'estere attivato, seguito dall'aggiunta di 1 mL della soluzione di ammina (0.45 M in piridina), intervallati da opportuni trattamenti di lavaggio del supporto.¹ La procedura sintetica descritta è stata ripetuta tre volte. Dopo lavaggi con piridina, CH₃OH, DCM e Et₂O, i supporti risultanti **8e** (o **9e**) sono stati seccati a pressione ridotta. Le rese di coniugazione, valutate dal test DMT su quantità seccate e pesate dei supporti, dopo trattamento con ammoniaca (28% NH₄OH, 50 °C, 5 ore), sono sempre risultate comprese tra il 65 – 80 %.

Dopo reazione con il coniugante, sul supporto è stato assemblato l'ODN di sequenza prescelta su sintetizzatore automatico di DNA, utilizzando monomeri di accrescimento 3'-(o 5'-)fosforammidito commercialmente disponibili. Il distacco dell'oligomero è stato realizzato per trattamento con una soluzione di ammoniaca acquosa (28%, 6 ore, 55 °C) e il grezzo distaccato è stato purificato mediante cromatografia ad esclusione molecolare su una colonna Sephadex G25 eluita con H₂O/EtOH 4:1 (v/v). La purezza dei composti isolati è stata verificata tramite analisi HPLC su una colonna a scambio ionico e la loro struttura è stata determinata mediante analisi di massa MALDI-TOF.

Approccio di coniugazione *post*-sintesi: procedura generale per la preparazione degli oligomeri 17-19.

A partire dal supporto **4b**, è stato assemblato il decametro di sequenza (CT)₅ su sintetizzatore automatico di DNA, secondo il protocollo del fosforammidito² con finale deprotezione dal gruppo DMT. L'estremità 5'-OH dell'ODN è stata acetilata per trattamento con anidride acetica in piridina (1:1, v/v) per 30 min. a t.a.

¹ Davis, P. W.; Osgood, S. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2691.

² Eckstein, F. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, U.K., 1991.

Successivamente, 50 mg di supporto secco, sono stati lavati con piridina anidra e trattati con una miscela contenente 10 meq dell'alcol prescelto e 10 meq di 1-mesitilenesulfonil-3-nitro-1,2,4-triazolo (MSNT) in 300-500 μ L di piridina anidra per 12 ore a t.a. Dopo lavaggi con piridina, CH₃OH e DCM, il supporto risultante è stato seccato a pressione ridotta. Il distacco dell'oligomero è stato realizzato per trattamento con una soluzione di ammoniaca acquosa (28%, 6 ore, 55 °C) e il grezzo distaccato è stato purificato mediante cromatografia ad esclusione molecolare su una colonna Sephadex G25 eluita con H₂O/EtOH 4:1 (v/v). La purezza dei composti isolati è stata verificata tramite analisi HPLC su una colonna a scambio ionico e la loro struttura è stata determinata mediante analisi di massa MALDI-TOF.

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 3

Procedure generali

Le misure UV sono state effettuate su uno spettrofotometro Jasco V530.

Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR sono stati registrati su spettrometri Bruker WM 400, Varian-Gemini 200 e 300 e INOVA 500; tutti i chemical shift sono espressi in ppm utilizzando come riferimento il segnale residuo del solvente; le costanti di accoppiamento (J) sono espresse in Hz.

Gli spettri ^{31}P NMR, sono stati registrati a 161.98 MHz su uno spettrometro Bruker WM-400 utilizzando H_3PO_4 all'85% come standard esterno.

Gli spettri di massa sono stati determinati con uno spettrometro Waters Micromass ZQ equipaggiato con una sorgente electrospray. Gli spettri di massa MALDI-TOF sono stati determinati con uno spettrometro Voyager PerSeptive MALDI DE-PRO in modalità lineare utilizzando come matrice una miscela di acido picolinico e 3-idrossipicolinico.

Le TLC sono state eseguite su lastre analitiche di silice Merk (Kieselgel 40 F254) ed i prodotti sono stati visualizzati mediante luce UV a $\lambda = 254$ nm. Per le cromatografie su colonna è stata utilizzata silice Merk (Kieselgel 60, 0.063-0.200 mm).

Il supporto solido CPG-dG (0.1 meq/g) è stato acquistato alla Glen Research.

Gli ODN sono stati sintetizzati su un sintetizzatore Expedite PerSeptive Biosystems, utilizzando come unità di accrescimento 2'-deossinucleosidi-3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropil-fosforoammidito acquistati dalla Applied Biosystems.

Le analisi HPLC degli analoghi sintetizzati sono state condotte su un apparecchio Beckman System Gold munito di rivelatore UV Beckman mod. 166 e di un integratore Shimadzu Chromatopac C-R6A.

5'-O-tert-butildifenilsilil-timidina

1.0 g (4.13 mmol) di timidina sono stati disciolti in 20 mL di DMF anidra e trattati con 1.5 g (5.37 mmol) di TBDPhSiCl e con 844 mg (12.39 mmol) di imidazolo a 0°C per 2 ore. La reazione è stata bloccata per aggiunta di acqua, la miscela ripresa in 100 mL di CHCl_3 e lavata per tre volte con una soluzione al 5% di NaHCO_3 . Le frazioni organiche sono state raccolte e seccate a pressione ridotta. Il grezzo è stato purificato su una colonna di gel di silice eluita con CHCl_3 . Sono stati recuperati 1.8 g (3.72 mmol, 90%) di prodotto pulito.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): 7.67-7.26 (10H, segnale complesso, protoni aromatici), 6.41 (1H, doppio doppietto, H-1', J=5.6 e 8.2 Hz), 4.55 (1H, segnale slargato, H-4), 4.03 (1H, segnale slargato, H-3), 3.94 (2H, multipletto, H₂-5), 2.40

(1H, multipletto, H_{2a}-2), 2.20 (1H, multipletto, H_{2b}-2), 1.62 (3H, singoletto, CH₃), 1.08 {9H, singoletto, [(CH₃)₃C]Si}.

Timidina-5'-*tert*-butildifenilsilile-3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforammidito (4)

1g (2.08 mmol) di 5'-O-*tert*-butildifenilsilil-timidina sono stati sciolti in 15 mL di DCM e alla miscela sono stati aggiunti 2 mL di setacci molecolari 4Å, 780 µL (3.33 mmol) di (2-cianoetil)-N,N-diisopropilclorofosforoammidito e 1 mL (6.24 mmol) di DIPEA. La reazione è stata lasciata a t.a. per 30 min, la miscela di reazione è stata quindi diluita con DCM, lavata per due volte con una soluzione al 5% di NaHCO₃, seccata su MgSO₄ e concentrata a pressione ridotta. Il grezzo è stato purificato su una colonna di gel di silice eluita con 30% di AcOEt in esano con l'1% di Et₃N. Sono stati recuperati 1 g (1.6 mmol, 77 %) di prodotto pulito.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) come miscela di diastereoisomeri: 7.68-7.26 (20H, segnali complessi, protoni aromatici), 6.37 (2H, tripletto, H-1', J=7.2 e 6.4 Hz), 4.66 (2H, segnale slargato, H-4'), 4.15-3.57 (10H, segnali sovrapposti, H₂-5, CH(CH₃)₂, OCH₂CH₂CN), 2.63 (2H, tripletto, CH₂CN, J=6.4 e 6.4 Hz), 2.52 (2H, multipletto, H₂-2'_a), 2.47 (2H, tripletto, CHCN, J=6.4 e 6.4 Hz), 2.04 (2H, multipletto, H₂-2'_b), 1.60 (6H, singoletto, CH₃), 1.28 e 1.18 (9H ciascuno, singoletto, (CH₃)₃C), 1.14, 1.12, 1.10, 1.09 (6H ciascuno, singoletti, 4x(NCH(CH₃)₂).

³¹P NMR (CDCl₃, 161.98 MHz): 151.9 e 151.7

5'-O-*tert*-butildimetilsilil-timidina

1.0 g (4.13 mmol) di timidina sono stati disciolti in 20 mL di DMF anidra e trattati con 750 mg (4.90 mmol) di TBDMSCl e con 844 mg (12.39 mmol) di imidazolo a 0°C per 2 ore. La reazione è stata bloccata per aggiunta di acqua, la miscela ripresa in 100 mL di CHCl₃ e lavata per tre volte con una soluzione al 5% di NaHCO₃. Le frazioni organiche sono state raccolte e seccate a pressione ridotta. Il grezzo è stato purificato su una colonna di gel di silice eluita con CH₃OH in CHCl₃ dall'1% al 10%. Sono stati recuperati 1.3 g (3.71 mmol, 90%) di prodotto pulito.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 7.52 (1H, singoletto, H-6), 6.38 (1H, tripletto, H-1', J=8.0 e 8.0 Hz), 4.44 (1H, singoletto, H-3), 4.05 (1H, singoletto, H-4), 3.90 (2H, sistema ABX, H₂-5), 3.01 (1H, singoletto slargato, OH), 2.39 e 2.08 (2H, sistema ABX, H₂-2), 1.90 (3H, singoletto, CH₃), 0.91 {9H, singoletto, [(CH₃)₃C]Si}, 0.11 e 0.10 [3H ciascuno, singoletti, Si(CH₃)₂]

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 163.81 (C-2), 150.45 (C-4), 135.36 (C-6), 110.85 (C-5), 87.21 (C-1'), 84.93 (C-4'), 72.44 (C-3'), 63.49 (C-5'), 41.00 (C-2'), 25.80 {[(CH₃)₃C]Si}; 18.23 [(CH₃)₃C]; 12.39 (CH₃ T), -5.49 e -5.59 [Si(CH₃)₂].

Massa calcolata per C₁₆H₂₈N₂O₅Si: 356.24.

ESI-MS [M+H⁺]: m/z 357.32.

[M+Na⁺]: m/z 379.30.

[M+K⁺]: m/z 395.23.

5'-O-*tert*-butildimetilsilil-3'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-timidina (9)

1.0 g (1.52 mmol) di 5'-O-*tert*-butildimetilsilil-timidina, sciolti in 10 mL di piridina anidra, sono stati trattati con 1.0 g (3.04 mmol) di DMTCl e 19 mg (0.15 mmol) di DMAP. La reazione è stata lasciata a t.a. per 18 ore, bloccata per aggiunta di CH₃OH e seccata a pressione ridotta. Il grezzo, ripreso in 100 mL di CHCl₃, è stato lavato per due volte con acqua e poi purificato su una colonna di gel di silice eluita con 1% di acetone in CHCl₃/Py (1:0.05, v/v). Sono stati recuperati 980 mg (1.49 mmol, 98%) di prodotto **9** pulito.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 7.54-6.81 (13H, segnali complessi, protoni aromatici DMT), 6.39 (1H, doppio doppietto, H-1', J= 5.1 e 9.3 Hz), 4.27 (1H, doppietto, H-3', J=6.0 Hz), 4.02 (1H, singoletto, H-4'), 3.79 (3H, singoletto, OCH₃), 3.69 (1H, doppietto, H-5'_a, J=11.0 Hz), 3.30 (1H, doppietto, H-5'_b, J=11.4 e 2.1 Hz), 1.85 (3H, singoletto, CH₃), 1.71-1.51, 2H, multipletto, H₂-2'), 0.80 {9H, singoletto, [(CH₃)₃C]Si}, -0.05 e -0.10 [3H ciascuno, singoletti, Si(CH₃)₂].

¹³C NMR (CDCl₃): 163.48 (C-4), 150.12 (C-2), 135.49 (C-6), 158.65, 145.06, 136.30, 130.2, 128.24, 127.94, 127.04, 113.25 (carboni aromatici), 110.81 (C-5), 87.25 (C-1'), 86.66 (C quaternario gruppo DMT), 84.92 (C-4'), 74.98 (C-3'), 63.58 (C-5'), 55.24 (OCH₃), 39.96 (C-2'), 25.78 {[(CH₃)₃C]Si}; 18.23 [(CH₃)₃C]; 12.42 (CH₃ T), -5.39 e -5.72 [Si(CH₃)₂].

Massa calcolata per C₃₇H₄₆N₂O₇: 658.02.

ESI-MS [M+Na⁺]: m/z 681.43.

[M+K⁺]: m/z 697.38.

N-3-(2-feniltioetil)-5'-O-*tert*-butildimetilsilil-3'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)timidina (10)

900 mg (1.36 mmol) di 5'-O-*tert*-butildimetilsilil-3'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-timidina sono stati sciolti in 10 mL di benzene a 0°C e trattati con 138 μL (1.02 mmol) di 2-feniltio-etanolo e 419 μL (1.70 mmol) di tributilfosfina. Dopo 10 min, la miscela è stata portata a t.a. e sono stati aggiunti 428 mg (1.70 mmol) di ADDP e la miscela lasciata a t.a. per 18 ore. Il grezzo è stato poi seccato a pressione ridotta, ripreso in 100 mL di AcOEt e lavato una volta con acqua. La fase organica è stata seccata a pressione ridotta e purificata su una colonna di gel di silice eluita con il 2% di acetone in CHCl₃/Py (1:0.05, v/v). Sono stati recuperati 1.07 g (1.09 mmol, 80%) di prodotto **10** puro.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 7.47-6.85 (18H, segnali complessi, protoni aromatici), 6.48 (1H, doppio doppietto, H-1', J= 5.6 e 9.6 Hz), 4.27 (1H, doppietto, H-3', J=12.0 Hz), 4.22 (2H, multipletto, CH₂-N), 4.01 (1H, singoletto, H-4'), 3.82 (3H, singoletto, OCH₃), 3.67 (1H, doppio doppietto, H-5'_a, J=4.0 e 12.0 Hz), 3.28

(1H, doppio doppietto, H-5'_b, J=4.0 e 12.0 Hz), 3.19 (2H, tripletto, CH₂-S, J=8.0 e 8.0 Hz), 1.87 (3H, singoletto, CH₃), 1.76 (1H, doppio doppietto, H-2'_a, J=4.0 e 12.0 Hz), 1.57 (1H, segnale complesso, H-2'_b), 0.83 {9H, singoletto, [(CH₃)₃C]Si}, -0.02 e -0.08 [3H ciascuno, singoletti, Si(CH₃)₂].

¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 162.83 (C-4), 150.37 (C-2), 135.86 (C-6), 158.29, 150.37, 144.70, 135.95, 135.28, 135.27, 128.87, 128.75, 128.51, 127.99, 127.86, 127.51, 126.63, 125.35, 112.83 (carboni aromatici), 109.62 (C-5), 86.81 (C quaternario gruppo DMT), 86.16 (C1'), 85.12 (C-4'), 74.55 (C-3'), 63.12 (C-5'), 54.80 (OCH₃), 40.59 (CH₂-N), 39.55 (C-2'), 29.22 (CH₂-S), 25.34 {[(CH₃)₃C]Si}, 17.77 [(CH₃)₃C], 12.68 (CH₃ T), -5.86 e -6.18 [Si(CH₃)₂].

Massa calcolata per C₄₅H₅₄N₂O₇SSi: 794.34.

ESI-MS [M+K⁺]: m/z 833.75.

N-3-(2-feniltioetil)-3'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-timidina

1.0 g (1.02 mmol) di prodotto **10** sono stati trattati con 1.5 mL di una soluzione 1 M di TBAF in THF. Dopo 30 min il grezzo è stato diluito con AcOEt e lavato due volte con acqua. Le frazioni organiche raccolte sono state seccate a pressione ridotta e il grezzo purificato su una colonna di gel di silice eluita con CHCl₃/Py (1:0.05, v/v). Sono stati recuperati 680 mg (1.00 mmol, 98%) di prodotto puro.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 7.49-6.85 (18H, segnali complessi, protoni aromatici), 6.16 (1H, doppio doppietto, H-1', J=6.0 e 8.8 Hz), 4.41 (1H, doppietto, H-3', J=6.4 Hz), 4.19 (2H, tripletto, CH₂-N, J=5.6 e 7.2 Hz), 4.00 (1H, singoletto, H-4'), 3.82 (3H, singoletto, OCH₃), 3.70 (1H, doppietto, H-5'_a, J=11.6 Hz), 3.34 (1H, multipletto, H-5'_b), 3.16 (2H, tripletto, CH₂-S, J=7.6 e 7.6 Hz), 2.61 (1H, tripletto slargato, OH), 1.97 (1H, multipletto, H-2'_a), 1.88 (3H, singoletto, CH₃), 1.74 (1H, multipletto, H-2'_b).

¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 162.99 (C-4), 150.68 (C-2), 136.18 (C-6), 158.62, 150.68, 149.65, 144.98, 135.89, 135.50, 135.24, 130.13, 128.83, 128.28, 128.15, 127.87, 126.99, 125.69, 123.64, 113.19 (carboni aromatici), 109.62 (C-5), 88.30 (C-1'), 87.09 (C quaternario gruppo DMT), 86.45 (C-4'), 74.18 (C-3'), 62.54 (C-5'), 55.14 (OCH₃), 40.84 (CH₂-N), 38.49 (C-2'), 29.46 (CH₂-S), 13.09 (CH₃ T).

Massa calcolata per C₃₉H₄₀N₂O₇S: 680.26.

ESI-MS [M+H⁺]: m/z 681.57.

[M+Na⁺]: m/z 703.61.

[M+K⁺]: m/z 719.62.

N-3-(2-feniltioetil)-5'-O-dibenzilossibenil-3'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-timidina (11)

600 mg (0.88 mmol) di 3'-O-(4,4'-dimetossitriifenilmetil)-N-3-(2-feniltioetil)-timidina sono stati sciolti in 5 mL di DMF anidra e trattati con 100 mg (2.6 mmol) di

NaH (60% in olio minerale) e lasciati a t.a. per 20 min. Alla miscela di reazione sono stati quindi aggiunti 1.5 g (4.41 mmol) di DBBNCl e 66 mg (0.44 mmol) di NaI. La miscela è stata lasciata a t.a. per 18 ore. La reazione è stata bloccata per aggiunta di acqua e AcOEt, diluita con AcOEt e lavata due volte con acqua. Le frazioni organiche sono state seccate a pressione ridotta e purificate su una colonna di gel di silice eluita con 40% di AcOEt in esano/Py (1:0.05, v/v). Sono stati recuperati 605 mg (0.61 mmol, 69%) di prodotto **11**.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 7.45-6.76 (32H, segnali complessi, protoni aromatici, H-6), 6.49 (1H, doppio doppietto, H-1', J=5.6 e 8.8 Hz), 5.17 (4H, multipletto, Ph-O-CH₂), 4.5 (2H, doppietto, Ph-CH₂-O, J=5.6 Hz), 4.29 (1H, multipletto, H-3'), 4.17 (2H, multipletto, CH₂-N), 3.82 (1H, singoletto, H-4'), 3.76 (3H, singoletto, OCH₃), 3.390 (1H, doppio doppietto, H-5'_a, J=2.0 e 10.4 Hz), 3.15 (2H, tripletto, CH₂-S, J=8.0 e 11.6 Hz), 2.96 (1H, doppio doppietto, H-5'_b, J=2.4 e 8.0 Hz), 1.96 (1H, doppio doppietto, H-2'_a, J=6.0 e 13.6 Hz), 1.69 (1H, multipletto, H-2'_b), 1.53 (3H, singoletto, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 163.09 (C-4), 150.77 (C-2), 136.93 (C-6), 158.60, 148.83, 148.64, 144.98, 137.09, 136.19, 135.61, 134.26, 134.03, 130.67, 130.11, 128.66, 128.37, 128.27, 128.90, 127.86, 127.77, 127.69, 127.22, 127.16, 127.09, 127.10, 126.98, 125.68, 120.53, 120.07, 115.03, 114.66, 114.29, 113.95 (carboni aromatici), 109.95 (C-5), 87.11 (C quaternario gruppo DMT), 85.59 (C-1'), 85.21 (C-4'), 74.95 (C-3'), 71.28 e 71.05 (2 x O-CH₂-Ph), 69.91 (CH₂OPh), 65.10 (C-5'), 55.12 (OCH₃), 40.79 (CH₂-N), 39.66 (C-2'), 29.51 (CH₂-S), 12.77 (CH₃ T).

Massa calcolata per C₆₀H₅₈N₂O₉S: 982.39.

ESI-MS [M+Na⁺]: m/z 1005.93.

[M+K⁺]: m/z 1021.88.

N-3-(2-fenilsolfonilettil)-5'-O-dibenzilossibenzil-3'-O-(4,4'-dimetossitrifetilmetil)- timidina

600 mg (0.61 mmol) di prodotto **11** sono stati sciolti in 5 mL di DCM e trattati con 309 mg (1.8 mmol) di *m*-CPBA a t.a. per 1 ora. Il grezzo è stato diluito con DCM e lavato due volte con una soluzione al 5% di NaHCO₃. Le frazioni organiche sono state raccolte e purificate su una colonna di gel di silice eluita con CH₃OH in CHCl₃/Py (1:0.05, v/v) dallo 0% al 5%. Sono stati recuperati 612 mg (0.60 mmol, 98%) di prodotto pulito, puro per TLC ed NMR.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 7.96-6.75 (32H, segnali complessi, protoni aromatici, H-6), 6.42 (1H, doppio doppietto, H-1', J=5.6 e 8.8 Hz), 5.17 (2H, singoletto, Ph-O-CH₂), 5.16 (2H, singoletto, Ph-O-CH₂), 5.04 (2H, singoletto, Ph-CH₂-O), 4.28 (3H, segnali sovrapposti, H-3' e CH₂-N), 3.80 (1H, singoletto, H-4'), 3.74 (3H, singoletto, OCH₃), 3.46 (2H, tripletto, CH₂-S, J=7.2 e 7.6 Hz), 3.38 (1H, doppio doppietto, H-5'_a, J=1.6 e 10.4 Hz), 2.97 (1H, doppio doppietto, H-5'_b, J=2.0 e 10.4 Hz), 1.96 (1H, doppio doppietto, H-2'_a, J=5.6 e 13.2 Hz), 1.68 (1H, multipletto, H-2'_b), 1.58 (3H, singoletto, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 162.74 (C-4), 150.38 (C-2), 136.17 (C-6), 158.63, 149.72, 148.88, 148.71, 144.97, 138.87, 137.22, 136.95, 136.94, 135.85, 134.30, 133.73, 130.65, 130.11, 129.19, 128.37, 128.20, 128.00, 127.86, 127.70, 127.18, 127.10, 127.03, 123.62, 120.58, 120.09, 115.12, 114.74, 114.43, 114.03, 113.19, (carboni aromatici), 109.76 (C-5), 87.14 (C quaternario gruppo DMT), 85.73 (C-4'), 85.29 (C-1'), 74.90 e 72.90 (2 x O-CH₂-Ph), 71.33 (CH₂OPh), 69.84 (C-3'), 65.09 (C-5'), 55.12 (OCH₃), 52.44 (CH₂-S), 39.71 (C-2'), 35.09 (CH₂-N), 12.64 (CH₃ T).

Massa calcolata per C₆₀H₅₈N₂O₁₁S: 1014.38.

ESI-MS [M+Na⁺]: m/z 1037.93.

[M+K⁺]: m/z 1053.86.

N-3-(2-fenilsolfoniletil)-5'-O-dibenzilossibenzil- timidina (12)

600 mg (0.59 mmol) di 5'-O-dibenzilossibenzil-3'-O-(4,4'-dimetossitritifenilmetil)-N-3-(2-fenilsolfoniletil)-timidina, sono stati sciolti in 10 mL di DCM e trattati con 1 mL di una soluzione al 3% di TFA in DCM. Dopo 30 min, il grezzo è stato diluito per aggiunta di DCM e lavato per due volte con una soluzione al 5% di NaHCO₃. I residui organici, seccati a pressione ridotta, sono stati purificati su una colonna di gel di silice eluita con CH₃OH in CHCl₃/Py (1:0.05, v/v) dallo 0% al 5%. Sono stati recuperati 378 mg (0.53 mmol, 90%) di prodotto **12** puro.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 7.85-6.88 (18H, segnali complessi, protoni aromatici), 6.32 (1H, tripletto, H-1', J=6.5 e 6.5 Hz), 5.16 (2H, singoletto, Ph-O-CH₂), 5.15 (2H, singoletto, Ph-O-CH₂), 4.54 (2H, multipletto, Ph-CH₂-O), 4.38 (1H, multipletto, H-3'), 4.27 (2H, multipletto, CH₂-N), 4.02 (1H, singoletto, H-4'), 3.69 (1H, doppio doppietto, H-5'_a, J=2.5 e 13.0 Hz), 2.97 (1H, doppietto, H-5'_b, J=10.0 Hz), 3.47 3.46 (2H, tripletto, CH₂-S, J=7.5 e 7.5 Hz), 2.29 (1H, multipletto, H-2'_a), 2.25 (1H, tripletto slargato, OH), 2.18 (1H, multipletto, H-2'_b), 1.60 (3H, singoletto, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 162.79 (C-4), 150.28 (C-2), 136.96 (C-6), 148.86, 148.81, 138.76, 137.05, 134.20, 133.77, 130.51, 129.20, 128.38, 127.98, 127.76, 127.65, 127.12, 127.03, 120.92, 114.73 (carboni aromatici), 109.70 (C-5), 85.63 (C-4'), 85.48 (C-1'), 73.17 e 72.05 (2 x O-CH₂-Ph), 71.19 (CH₂OPh), 70.09 (C-3'), 69.54 (C-5'), 52.41 (CH₂-S), 40.84 (C-2'), 35.02 (CH₂-N), 12.73 (CH₃ T).

Massa calcolata per C₃₉H₄₀N₂O₉S: 711.25.

ESI-MS [M+H⁺]: m/z 712.00.

[M+Na⁺]: m/z 735.57.

[M+K⁺]: m/z 751.64.

Timidina-N-3-(2-fenilsolfonileti)-5'-O-dibenzilossibenzil-3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropil-fosforoammidito (13)

350 mg (0.49 mmol) di prodotto **12**, sono stati sciolti in 5 mL di DCM. Alla miscela sono stati aggiunti, sotto atmosfera di azoto, 2 mL di setacci molecolari 4Å, 257 µL (1.47 mmol) di DIPEA e 183 µL (0.78 mmol) di (2-cianoetil)-N,N-diisopropilclorofosforoammidito. La miscela è stata lasciata a t.a. per 30 min, poi è stata diluita con DCM e lavata una volta con una soluzione al 5% di NaHCO₃. La frazione organica è stata seccata su MgSO₄ e purificata su una colonna di gel di silice eluita con AcOEt/*n*-esano 1:1 (v/v) contenente l'1% di Et₃N. Sono stati recuperati 357 mg (0.39 mmol, 79 %) di prodotto (**13**) puro.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) come miscela di diastereoisomeri: 7.85-6.89 (36H, segnali complessi, protoni aromatici), 6.33 (2H, tripletto, H-1', J=7.2 e 6.4 Hz), 5.14 (4H, singoletto, Ph-O-CH₂), 5.13 (4H, singoletto, Ph-O-CH₂), 4.56 (2H, multipletto, H-3'), 4.46 (4H, multipletto, Ph-CH₂-O), 4.25 (4H, multipletto, CH₂-N), 4.27 e 4.26 (1H ciascuno, singoletto, H-4'), 3.84-3.45 (14H, segnali sovrapposti, H₂-5', CH(CH₃)₂, OCH₂CH₂CN, CH₂-S), 2.61 (2H, tripletto, CHCN, J=6.0 e 6.0 Hz), 2.55 (2H, tripletto, CHCN, J=6.0 e 6.4 Hz), 2.45 (2H, multipletto, H₂-2'_a), 2.09 (2H, multipletto, H₂-2'_b), 1.55 (6H, singoletto, CH₃), 1.19, 1.17, 1.16, 1.14 [6H ciascuno, singoletti, 4x(NCH(CH₃)₂)].

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): 162.77 (C-4), 150.34 (C-2), 137.05 (C-6), 148.99, 138.94, 134.27, 133.71, 130.74, 129.18, 128.38, 128.01, 127.72, 127.14, 120.96, 114.95 (carboni aromatici), 117.45 (CN), 109.80 (C-5), 85.61 (C-4'), 85.58 (C-1'), 74.09 (C-3'), 73.24 (CH₂OPh), 71.35 e 71.28 (2 x O-CH₂-Ph), 69.67 e 69.54 (C-5'), 58.00 (OCH₂CH₂CN), 52.48 (CH₂-S), 43.31 e 43.19 (CH(CH₃)₂), 39.92 (C-2'), 35.07 (CH₂-N), 24.45 (NCH(CH₃)₂), 20.29 (CH₂CN), 12.67 (CH₃ T).

³¹P NMR (CDCl₃, 161.98): 149.3

Massa calcolata per C₄₈H₅₇N₄O₁₀PS: 912.35.

ESI-MS [M+H⁺]: m/z 912.27.

[M+Na⁺]: m/z 935.89.

[M+K⁺]: m/z 952.90.

Sintesi in fase solida degli oligomeri 1, 2 e 3

Per l'assemblaggio dell'oligomero **1**, a partire da 100 mg di supporto CPG-dG con funzionalizzazione 0.1 meq/g, è stato assemblato un oligonucleotide di sequenza 5'TG₃AG^{3'} su sintetizzatore automatico di DNA, sfruttando monomeri 3'-fosforammidito commercialmente disponibili. Per l'assemblaggio degli oligomeri **2** e **3**, a partire da 100 mg di supporto CPG-dG 0.1 meq/g, è stato assemblato un oligonucleotide di sequenza 5'TG₃AG^{3'} su sintetizzatore automatico di DNA, sfruttando monomeri 3'-fosforammidito commercialmente disponibili per i nucleotidi dG e dA e le specie **4** e **9**, precedentemente sintetizzate.

A sintesi ultimata, un trattamento basico con ammoniaca acquosa a 50 °C per 18 ore, ha consentito il distacco dal supporto degli oligomeri sintetizzati. I grezzi distaccati sono stati purificati mediante HPLC su una colonna a fase inversa NUCLEOSIL® 100-5 C8. Per l'eluizione del grezzo è stato usato un gradiente lineare dal 20% a 100 % di CH₃CN in 0.1 M TEAB in 20 min con flusso di 0.8 ml/min e rivelazione a $\lambda = 260$ nm. I prodotti purificati sono stati caratterizzati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

Oligomero 1: Massa calcolata per C₈₁H₉₂N₂₇O₃₆P₅: 2173.49
MALDI-TOF [M+H]⁺: m/z 2173.98

Oligomero 2: Massa calcolata per C₇₇H₉₄N₂₇O₃₄P₅Si: 2123.49
MALDI-TOF [M+H]⁺: m/z 2123.88

Oligomero 3: Massa calcolata per C₈₁H₉₂N₂₇O₃₆P₅: 2173.49
MALDI-TOF [M+H]⁺: m/z 2173.76

ABSTRACT

The subjects described reported in this PhD thesis are related to the general field of:

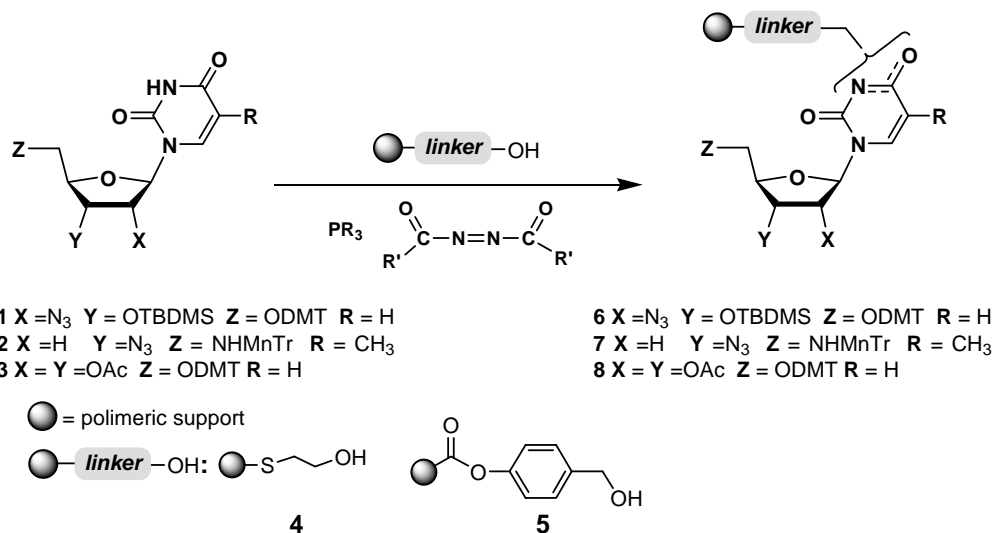
- Synthesis of modified nucleosides and nucleotides
- Synthesis of modified oligonucleotides

The development of a broad array of reactions in the solid phase¹ increase the scope and the potential of combinatorial chemistry², allowing the synthesis of libraries endowed with a series of molecular diversity motifs. Various combinatorial approaches have been successfully utilized for the generation of different oligomeric and small molecule libraries for a wide range of biological screenings. Many small molecule libraries are designed around a single core scaffold, which is typically a polyfunctional and biomedically interesting molecule³.

In this context, nucleosides can be regarded as valuable scaffolds to be incorporated into polymeric supports for combinatorial libraries, containing various functional groups that can be selectively and differently manipulated. In addition, nucleosides, either naturally occurring or not, are known since decades to be endowed with a plethora of biological properties; their use as pharmaceutical and/or diagnostic tools actively stimulates the preparation of novel, more efficient and less toxic related compounds. As a matter of fact, the chemical diversity of the usual constituents of nucleic acids is rather limited in terms of number of the starting structures, of types of accessible reactions and of number of sites which can be combinatorialized on the nucleoside skeletons. These issues intrinsically prevent the generation of a large diverse nucleoside library. In order to conspicuously expand the repertoire of topological variations on nucleoside and oligonucleotide analogues, a valid strategy is the replacement of natural monomers with modified nucleosides and non-nucleotide moieties.

Our research group recently described a simple and efficient solid phase strategy for the preparation of various 5',3'-derivatised thymidine analogues by using polymeric supports linking the thymidine residue through the nucleobase, so that all the ribosidic functions are susceptible of selective modifications in the solid phase. To this purpose, *ad hoc* selected thymidine derivatives were attached through the imino function to a TentaGel[®] resin, previously functionalised with a β -hydroxyethyl-thioether linker, by exploiting a Mitsunobu reaction. After the desired manipulations of the ribosidic functions, oxidation of the thioether function of the linker to sulfone, followed by a simple ammonia cleavage, allowed the release of various thymidine-containing compounds in a highly pure form⁴. In the course of the studies carried out during this PhD, aiming at a more general approach, we immobilized onto solid supports **4** and **5** (Scheme 1) differently functionalized, nucleoside analogues as 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'- α -azido-3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-uridine (**1**), 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2',3'-di-O-acetyl-uridine (**3**), 5'-N-(4-monomethoxytrityl)-amino-5'-deoxy-3'- α -azido-thymidine (**2**) affording supports **6**, **7** and **8**. Starting from support **6** containing 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'- α -azido-3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-uridine, we have devised a

versatile synthetic strategy to various analogues nucleoside or short oligonucleotide hybrids of uridine, following simple and well established peptide and oligonucleotide chemistry.



Scheme 1

Support **6** can be a useful entry to the synthesis of high diversity nucleic acid based libraries (NAB); in fact, not only this support contains an intact nucleoside skeleton, but also the simultaneous presence of a masked amino function (i.e. the 2'-azido group) and orthogonally removable protecting groups (DMT and TBDMS), respectively at the 5' and 3'-OH of the ribose moiety, allows a versatile tridirectional elongation and/or derivatisation of the desired hybrid biomolecules.

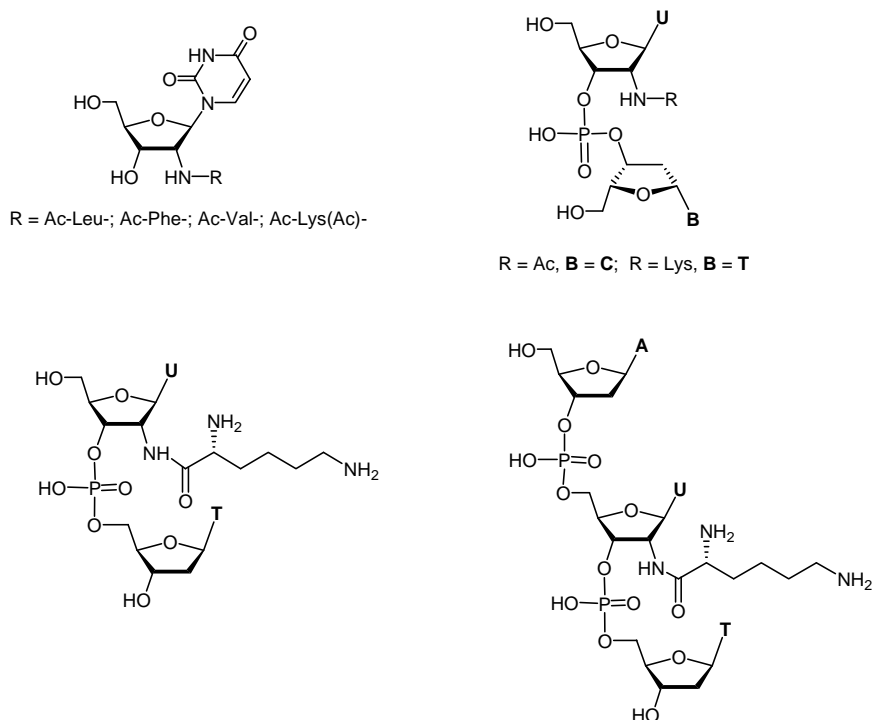
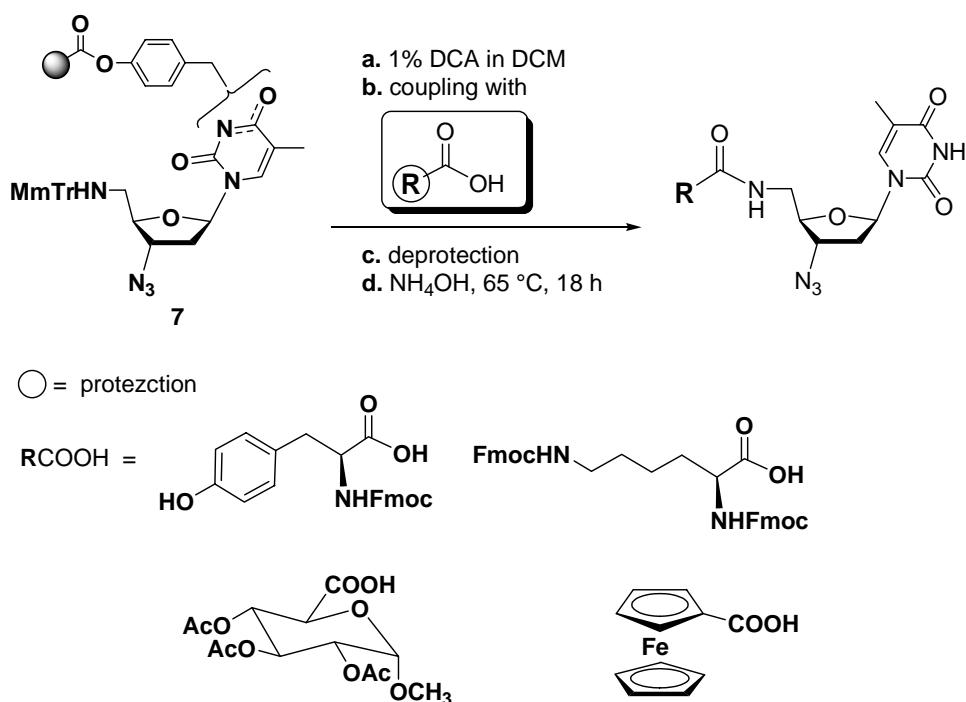


Figure 1

The synthesized hybrids depicted in Figure 1 were purified by HPLC and characterized by ^1H and ^{31}P -NMR and ESI-MS data⁵.

Starting from support **5** we have then tested different conditions for the incorporation of nucleosides **1**, **2** and **3** onto solid supports, by varying parameters like type of the solid support (Tentagel or polystyrene), solvent and temperature. Using support **7**, functionalized with 5'-N-(4-monomethoxytrityl)-ammino-5'-deoxy-3'- α -azido-thymidine, a set of new 5'-aminoacyl derivatives of AZT, molecules with interesting biological applications as anti-HIV agents (Scheme 2) could be efficiently prepared.



Scheme 2

As an alternative approach to the solid phase synthesis of modified nucleosides, we also developed an efficient synthetic procedure to obtain a large variety of 5'-phosphate diester or phosphoramidate monoester nucleoside analogues in a highly pure form. The proposed synthetic procedure, uses a polymeric support functionalized with a 3-chloro-4-hydroxyphenylacetic linker, onto which the nucleotide is attached through a phosphite triester linkage exploiting classical phosphoramidite chemistry (Scheme 3). After activation of the phosphodiester moiety, reactions with amines or alcohols (Table 1) are carried out so to produce phosphotriester or phosphoramidate linkages at the 5'-end of the nucleoside, which by a simple ammonia cleavage is released as the desired 5'-derivative in a very pure form. The so obtained molecules were characterized by ^1H and ^{31}P -NMR and ESI-MS spectra⁶.

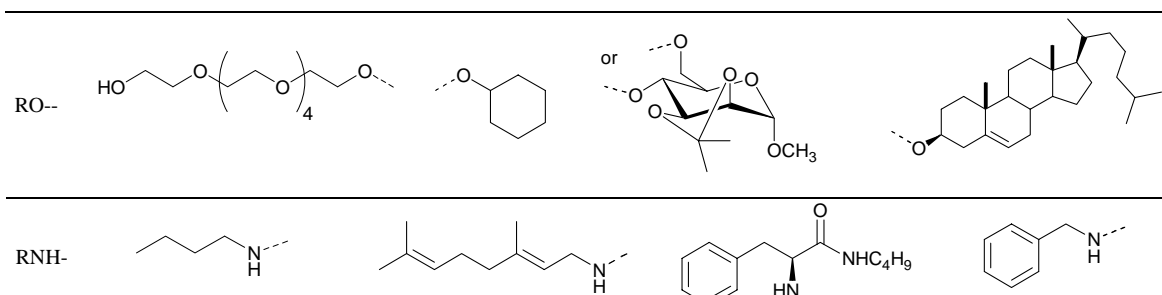
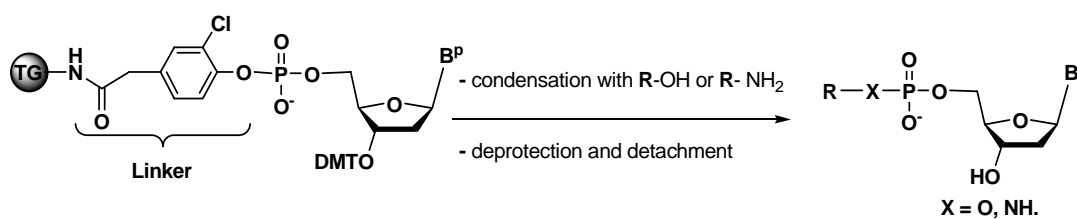
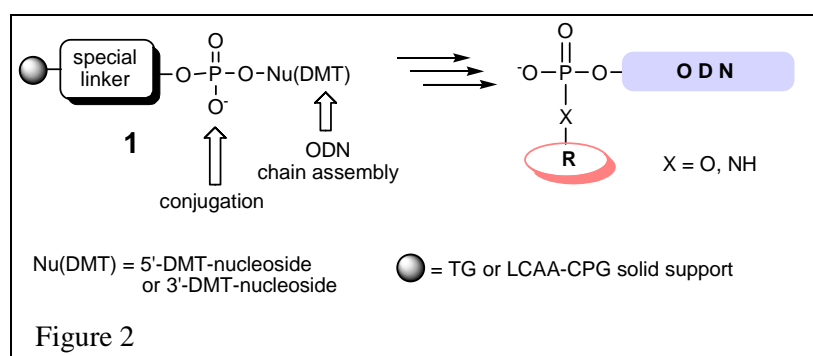


Table 1 Amines and alcohols used for the coupling at the 5'-phosphate moiety of thymidine, chosen as model nucleoside

The second research field which has been addressed in this PhD is the solid phase synthesis of modified oligonucleotides. The large interest for these molecules is motivated by their biological applications as regulators of gene expression in antisense and/or antigene strategies. In addition, modified and/or conjugated oligonucleotides find increasing applications as therapeutic candidates and as mechanistic and diagnostic probes in molecular biology experiments, in genetic analyses and in many biomedical applications. Valuable tools for *in vitro* and *in vivo* experiments are synthetic oligonucleotides covalently linked at their 5' or 3'-end with a variety of molecules, including fluorescent tags, intercalators, hydrophobic species and peptides⁷. Current methods for the conjugated oligonucleotide synthesis include the utilization of prefabricated labels in the form of phosphoramidite derivatives or of elaborate supports introducing the appropriate linkage between the solid support and the conjugating residue.

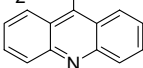
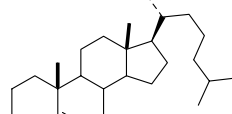
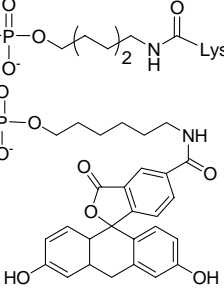
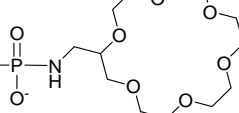
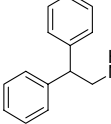


Within this research a new and easy method for the solid phase synthesis of oligonucleotides tethered at the 3' or 5'-end with a wide variety of labels has been developed⁸. In our strategy the solid supports (TG or LCAA-CPG) are derivatized with a suitable linker (Figure 2), onto which the first nucleotide is attached through a phosphate linkage.

Such a solid support contains a phosphodiester function and the 5'- or 3'-hydroxy group transiently masked as DMT-ether function on the nucleoside, which can be exploited for a pre- or post-assembly conjugation with a number of different labels and the automated DNA chain assembly respectively. The obtained oligomers, characterized by MALDI-TOF mass analysis, are reported in Table 1.

Another set of experiments were focused on the synthesis of oligonucleotides conjugated to oligosaccharide mimics. The presence of sugar moieties in biomolecules can improve their cellular uptake, increase their resistance to enzymatic degradation or, in general, favourably modulate their biological activity.

Table 1 Synthesized oligonucleotides by exploiting support 1 (Figure 2)

Oligonucleotidic sequence 5'-3'	MS obs/ calc	t_R , (min)	Yield (%)
CTC TCT CTC T-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -N-C(=O)- 	3286.96 3287.63	18.35	41
TCT CTC TCT C-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O- 	3351.32 3351.82	34.10	47
TCT CTC TCT A-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -N-C(=O)-Lys-Lys-Lys-NH ₂	3484.10 3490.87	13.81	31
TCT CTC TCT G-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O- 	3484.44 3480.63	22.21	37
TCT CTC TCT C-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O- 	3263.13 3258.64	15.20	50
 -N-C(=O)-TGG GAG	2133.22 2130.43	12.45	38
TCT CTC TCT C-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -(OCH ₂) ₄ -OH	3248.69 3247.63	18.14	25
TCT CTC TCT C-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-(CH ₂) ₆ -NH ₂	3099.42 3096.59	17.35	29

Recently, considerable efforts have been devoted to the development of efficient methodologies for the rapid assembly, both in solution and in the solid phase, of oligosaccharides and glycoconjugates in general. Indeed, the regio- and stereocontrolled sequential addition of sugar residues linked by glycosidic junctions is still a very challenging task and, as a consequence, the preparation of ODNs conjugated with oligosaccharide chains is still not optimised⁹.

In this frame we recently focused our attention on oligonucleotides conjugated with oligosaccharide mimics where the O-glycosidic junctions are replaced by chemically and enzymatically more stable linkages, the synthesis of which can be efficiently realized through easy and high fidelity solid phase reactions.

As a result of this research activity, an on-line solid phase synthesis of oligonucleotides conjugated at the 3'-end with [1-6]-linked oligosaccharide mimics, having the O-glycosidic linkages replaced by amide bonds, has been described. The assembly of the carbohydrate domain has been carried out by exploiting classical solid phase peptide synthetic protocols, starting from solid supports functionalized with 1-azido sugars (**1** and **2**, Figure 3), in association with suitably protected 1-azido uronic acids of glucose and lactose (**3** and **4**, Figure 3), chosen as model addition monomers. After the insertion of a flexible linker, elongation of the ODN chain was performed by standard automated phosphoramidite protocols. 3'-Glycoconjugated 18-mers (**a**, **b** and **c**) exhibited an increased enzymatic stability with respect to the same unmodified ODN sequence. UV thermal denaturation experiments showed that the presence of the oligosaccharide tail at the 3'-end of the oligonucleotides did not negatively interfere with their duplex formation abilities¹⁰.

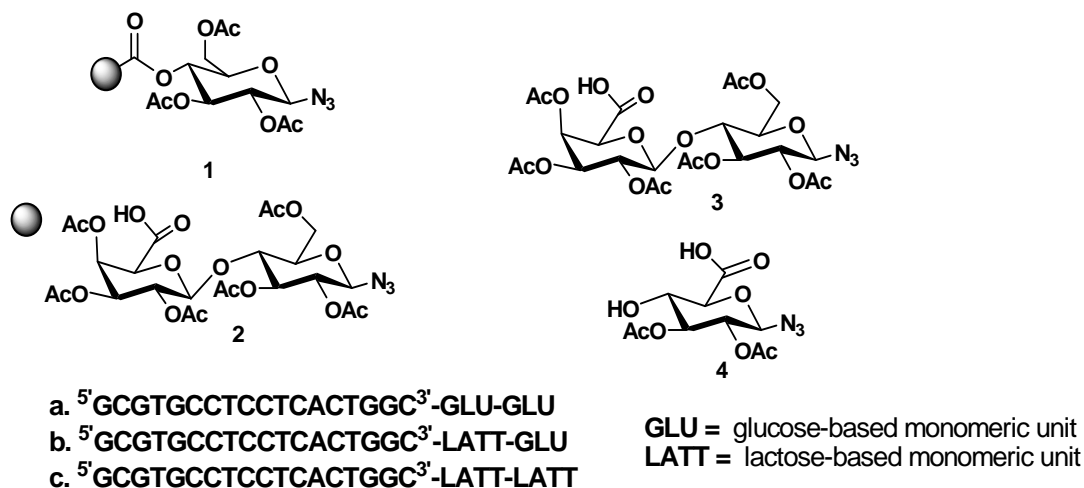


Figure 3

As a third research subject, in the course of this PhD activity studies, have been carried out the synthesis of 6-mers of sequence d(^{5'}TGGGAG^{3'}) with aromatic groups at the 5'-end. Recently, Hotoda and coworkers¹¹ demonstrated that 6-mers of sequence d(^{5'}TGGGAG^{3'}) with aromatic groups at the 5'-end exhibit potent anti-HIV-1 activity *in vitro*. Such antiviral activity was correlated with their ability to form

stable quadruplexes. However, unmodified d(5'TGGGAG3'), which under physiological conditions adopts a well defined quadruplex structure, showed no antiviral effects. Interestingly, no specific biological activity was also found when the aromatic groups were linked at the 3'-end of the same sequence. This behaviour was interpreted in terms of enhanced quadruplex stability of the 5'-conjugated oligomers, which could be induced by the aromatic groups exclusively when attached at the 5'-end of the native ODN backbone, but no explicit data were provided to substantiate this hypothesis.

A series of oligomers of sequence d(5'T*GGGAG3'), where T* is a thymidine residue bearing various aromatic residues at the 5'-position, have been synthesized and characterized by means of DSC, CD and molecular modelling studies, in order to elucidate their structure-stability-activity relationships. For the preparation of the 6-mer bearing at the 5'-end the 3, 4-dibenzyloxybenzyl (3,4-DBB) group, *i.e.* the one showing the most potent activity and the least cytotoxicity, associated with the higher stability when incubated with human plasma, an improved synthetic protocol has been developed, involving a new and explicit protection for the terminal thymine base with the base-labile 2-phenylthioethyl group.

¹ a) Booth, S.; Hermkens, P. H. H.; Ottenheijm, H. C. J.; Rees, D. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15385-15443. (b) Kobayashi, S. *Chem. Soc. Rev.* **1999**, *28*, 1-15.

² Balkenhohl, F.; von dem Bussche-Huenefeld, C.; Lansky, A.; Zechel, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2288-2337.

³ Tempest, P. A.; Armstrong, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7607-7608.

⁴ de Champdore', M.; De Napoli, L.; Di Fabio, G.; Messere, A.; Montesarchio, D.; Piccialli, G. *Chem. Commun.* **2001**, *24*, 2598-2599.

⁵ De Napoli, L., Di Fabio, G., D'Onofrio, J., Montesarchio, D. *Synlett*, **2004**, *11*, 1975-1979.

⁶ De Napoli, L., Di Fabio, G., D'Onofrio, J., Montesarchio, D. *Chem. Commun.*, **2005**, 2586-2588.

⁷ Virta, P.; Katajisto, J.; Niittymäki, T.; Lönnberg, H. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5137.

⁸ D'Onofrio, J., De Napoli, L., Montesarchio, D., Di Fabio, G. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4927-4930.

⁹ a) Davis, B.J. (2000) Recent developments in oligosaccharide synthesis. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2137-2160; b) Palmacci, E.R., Plante, O.J., Hewitt, M.C. and Seeberger, P.H. **2003**, Automated synthesis of oligosaccharides. *Helv. Chim. Acta*, *86(12)*, 3975-3990; c) Zatsepina, T.S. Oretskaya, T.S. **2004**, Synthesis and applications of oligonucleotide-carbohydrate conjugates. *Chemistry and Biodiversity*, *1*, 1401-1417.

¹⁰ D'Onofrio, J., de Champdorè, M., De Napoli, L., Montesarchio, D., Di Fabio, G. *Bioconjugate Chem.*, **2005**, *16*, 1299-1309.

¹¹ Hotoda et al., *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 3655.

ABBREVIAZIONI

AcOH	acido acetico
Ac ₂ O	anidride acetica
AcOEt	acetato di etile
ADDP	azo-bis-piperidilammide
<i>t</i> -BuOH	<i>ter</i> -butanolo
<i>m</i> -CPBA	acido <i>m</i> -cloroperbenzoico
DBB	3,4-dibenzilossibenzile
DBU	1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene
DCA	acido dicloroacetico
DCCI	N,N-dicicloesilcarbodiimmide
DCM	diclorometano
DEAD	azo-bis dietilcarbossilato
DHB	acido-2,5-diidrossibenzoico
DIAD	diisopropil-azodicarbossilato
DIC	N,N-diisopropilcarbodiimmide
DIEA	N,N-diisopropilettilammina
DMAP	N,N-dimetilamminopiridina
DMF	N,N-dimetilformammide
DMT	4,4'-dimetossitriifenilmetile
Et ₂ O	etere etilico
EtOH	etanolo
Fmoc	N-(9-fluorenilmetossicarbonile)
HATU	N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-aza-benzotriazol-1-il)uronio esafluorofosfato
HOBt	N-idrossibenzotriazolo
Leu	leucina
Lys	lisina
MeOH	metanolo
MmTr	4-monometossitriifenilmetile
MSNT	1-(2-mesitilensolfonil)-3-nitro-1,2,4, triazolo
ODN	oligodeossiribonucleotide
ON	oligonucleotide
Phe	fenilalanina

PS	polistirene
Py	piridina
Pyp	piperidina
TBAF	tetrabutylammoniofluoruro
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsilile
TBDPhSi	<i>tert</i> -butildifenilsilile
TBP	tri- <i>n</i> -butilfosfina
TCA	acido tricloroacetico
TEAB	tetrabutylammonio
TG	Tentagel
THF	tetraidrofurano
TMAD	N,N,N',N'-tetrametilazodicarbossiammide
TPP	trifenilfosfina