

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



FACOLTA' DI FARMACIA

DIPARTIMENTO DI CHIMICA DELLE SOSTANZE NATURALI

**Dottorato di ricerca in Scienze del Farmaco
XXII ciclo**

**"SINTESI E CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE
DI OLIGONUCLEOTIDI FORMANTI QUADRUPLE
ELICHE"**

Dott.ssa Teresa Coppola

Tutor: Dott.ssa Michela Varra

Coordinatore: Prof.ssa Maria Valeria D'Auria

INDICE

PREMESSA	3
<u>CAPITOLO 1</u>	4
INTRODUZIONE	4
1.1 Strutture G-quadruplex.....	4
1.2 Polimorfismo delle strutture quadruplex.....	7
1.3 Esempi di strutture quadruplex mono, bi e tetra-molecolari.....	13
1.4 Ruolo biologico.....	22
1.5 Applicazioni in campo nanotecnologico.....	25
1.6 Tecniche usate per lo studio delle strutture quadruplex.....	26
<u>CAPITOLO 2</u>	36
CARATTERISTICHE STRUTTURALI E SOVRASTRUTTURALI DI UN TRATTO POLI-G CONTENUTO ALL'INTERNO DEL PROMOTORE DEL GENE hTERT	36
2.1 Introduzione.....	36
2.2 Obiettivi	39
2.3 Risultati.....	41
2.4 Conclusioni.....	56
2.5 Procedure sperimentali.....	59
<u>CAPITOLO 3</u>	67
SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI NUOVI ANALOGHI MODIFICATI DEL TBA	67
3.1 Introduzione.....	67
3.1.1 Coagulazione e ruolo della trombina	67
3.1.2 Inibitori della trombina	72
3.1.3 Aptameri e SELEX.....	75
3.1.4 Thrombin Binding Aptamer (TBA)	78
3.2 Obiettivi: analoghi del TBA contenenti il nucleoside aciclico N1-(3-idrossi-2-idrossimetil-2-metilpropil)timidina	80
3.3 Risultati.....	81
3.4 Conclusioni	96
3.5 Procedure sperimentali.....	100
3.6 Obiettivi: analoghi del TBA contenenti il nucleoside modificato 5,6-trimetilen-2'-deossiuridina	115
3.7 Risultati.....	117
3.8 Conclusioni	131
3.9 Procedure sperimentali.....	133
3.10 Obiettivi: analoghi del TBA contenenti il nucleotide modificato 5,6-trimetilen-N1-[(2,2-diidrossimetilen)propan]-timina	146
3.11 Risultati.....	148
3.12 Conclusioni	155
3.13 Procedure sperimentali.....	158

<u>CAPITOLO 4</u>	167
SINTESI E CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DI SEQUENZE POLI- G CONIUGATE AD UN DERIVATO PERILENICO	167
<i>4.1 Introduzione</i>	<i>167</i>
<i>4.2 Obiettivi</i>	<i>169</i>
<i>4.3 Risultati</i>	<i>172</i>
<i>4.4 Conclusioni</i>	<i>194</i>
<i>4.5 Procedure sperimentali</i>	<i>201</i>
CAPITOLO 5	211
SINTESI DI MOLECOLE DI NATURA PEPTIDICA ATTE ALLA VEICOLAZIONE DI FARMACI	211
<i>5.1 Introduzione</i>	<i>211</i>
<i>5.2 Obiettivi</i>	<i>214</i>
<i>5.3 Risultati</i>	<i>219</i>
<i>5.4 Conclusioni</i>	<i>228</i>
<i>5.5 Procedure sperimentali</i>	<i>230</i>
<i>Abbreviazioni</i>	<i>242</i>
<i>Procedure generali</i>	<i>243</i>

PREMESSA

Tutte le forme di vita autonome, partendo dai procarioti fino agli esseri umani, conservano le proprie informazioni genetiche in molecole a doppia elica di DNA. Il classico arrangiamento del DNA scoperto nel 1953 da Watson e Crick è una doppia elica destrorsa, nota come B-DNA, in cui i due filamenti sono tenuti insieme da legami ad idrogeno. Gli acidi nucleici possono tuttavia, in opportune condizioni, subire delle transizioni strutturali. Sequenze oligonucleotidiche distribuite in maniera “*random*” solitamente si organizzano in strutture di B-DNA o A-DNA. Invece sequenze specifiche dotate di una particolare simmetria sono in grado di disporsi in strutture alternative come Z-DNA, strutture cruciformi, *hairpin*, strutture a tripla elica intramolecolare e strutture a quadrupla elica (quadruplex) ^{1,2,3}.

Diverse strutture non B-DNA, anche chiamate strutture inusuali o alternative, possono essere importanti ai fini dell'interazione con proteine coinvolte nei processi di replicazione, espressione genica e ricombinazione. Esse possono inoltre svolgere un ruolo importante nella formazione di nucleosomi e di altre strutture sovramolecolari.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Strutture G-quadruplex

Le strutture G-Quadruplex rappresentano un'insolita organizzazione secondaria di sequenze di acidi nucleici, che ha origine dalla sovrapposizione di un certo numero di quartetti di deossiguanosine (dG)^{4,5}. Un singolo quartetto di G è un arrangiamento ciclico e coplanare di 4 guanine nel quale ogni base è sia accettore che donatore di legami ad idrogeno. Più precisamente, tre le 4 guanine della tetrate si instaurano 8 legami ad idrogeno di tipo Hoogsteen che coinvolgono N1, N7, O6 e N2 di ciascuna base (**fig. 1.1**).

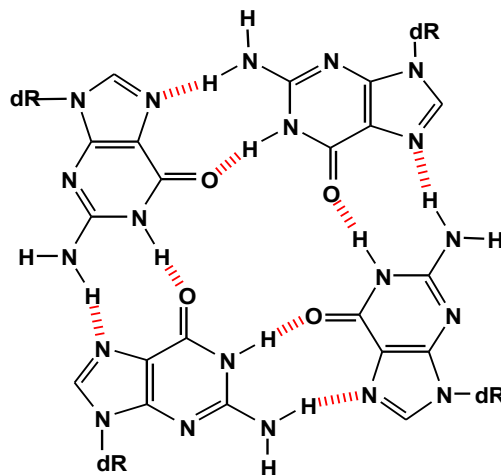


Figura 1.1: struttura planare di un quartetto di deossiguanosine

Tali tetrad di guanine si dispongono conferendo alla struttura quadruplex risultante un aspetto simile alla doppia elica di DNA caratterizzata da una torsione d'elica destrorsa.

Diversi fattori contribuiscono alla stabilizzazione delle strutture quadruplex analogamente a quanto avviene per la doppia elica di DNA: i legami ad idrogeno⁶, l'idratazione della struttura⁷, le interazioni di tipo π - π *stacking* tra le basi e le interazioni elettrostatiche. Al contrario, un importante fattore di instabilità delle quadruplex deriva dalla disposizione degli otto O6 carbonilici delle guanine rivolti verso il centro della tetrad di guanine^{8,9}. La stabilità di tali strutture è pertanto altamente dipendente dalla presenza di cationi che, localizzandosi al centro della tetrad contribuiscono a diminuire la repulsione elettrostatica generata¹⁰. La precisa localizzazione dei cationi tra le tetrad dipende dalla natura del catione stesso. Gli ioni sodio possono posizionarsi all'interno del canale in modo diversi: o esattamente al centro del quartetto o tra due tetrad successive; il potassio invece si dispone sempre equidistantemente da ogni piano di G e coordina gli 8 ossigeni con una configurazione simmetrica tetragonale bi piramidale (**fig 1.2**).

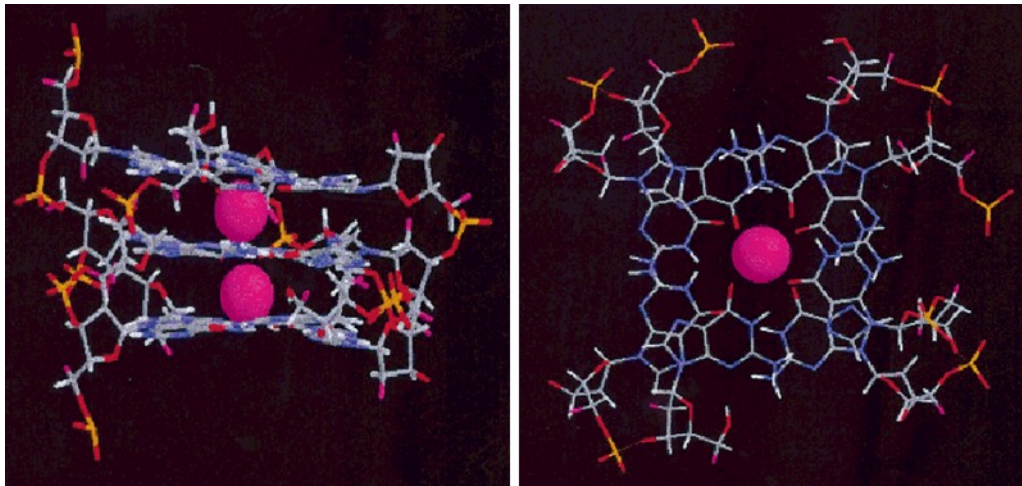


Figura 1.2: *Disposizione dello ione K^+ tra i due piani di G della quadruplex dimerica $[d(G_3T_4G_3)]_2$ e coordinazione ottaedrica con gli ossigeni in posizione 6 delle guanine.*

Altri cationi monovalenti come Tl^+ , Rb^+ e NH_4^+ sono in grado di promuovere la formazione di strutture quadruplex e la loro capacità stabilizzante è funzione del raggio atomico. Al contrario cationi bivalenti quali Mg^{++} e Ca^{++} possono avere addirittura un effetto destabilizzante sulle strutture.

Studi NMR¹¹ condotti sulla struttura quadruplex bimolecolare formata dalla sequenza $d(G_4T_4G_4)$ di *O.nova* hanno mostrato che la struttura formata in presenza di Tl^+ ha identica topologia di quella formata in K^+ o in Na^+ ; tuttavia ci sono anche molti esempi ben studiati di casi in cui la sostituzione del Na^+ con il K^+ induce profonde variazioni strutturali¹².

1.2 Polimorfismo delle strutture quadruplex

Le strutture quadruplex sono caratterizzate da un elevato polimorfismo¹³.

In particolare, in base al numero di filamenti che si associano a formare la struttura, esse possono essere distinte in quadruplex mono¹⁴, bi¹⁵ o tetra-molecolari¹⁶ (**fig. 1.3**)

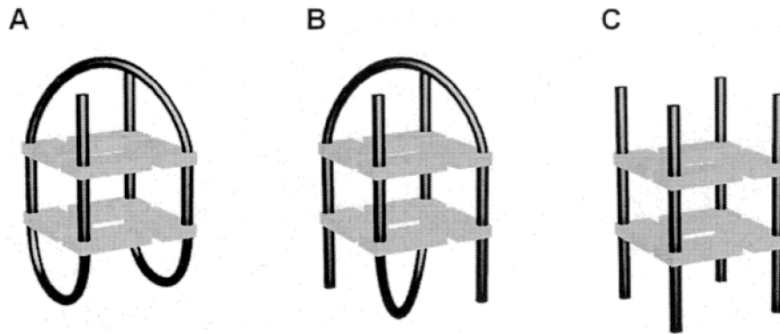
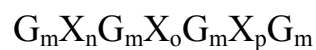


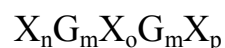
Figura 1.3: *Variazioni stechiometriche di strutture G-quadruplex. (A) Struttura G-quadruplex monomolecolare formata da un singolo filamento ripiegato; (B) Struttura G-quadruplex bimolecolare formata da due filamenti ripiegati; (C) Struttura G-quadruplex tetramolecolare formata da quattro filamenti.*

Affinchè un singolo filamento possa, ripiegandosi, originare una struttura quadruplex (monomolecolare) è necessario che abbia la seguente sequenza generale:



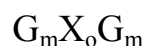
dove m è il numero di guanosine in ciascun tratto di G . Tali tratti possono essere della stessa lunghezza o meno. In quest'ultimo caso alcune guanosine dei tratti più lunghi diventeranno parte dei *loop*. X_n X_o ed X_p indicano ciascuna combinazione dei nucleotidi formanti i *loop*. Nel caso delle ripetizioni telomeriche dei vertebrati le ripetizioni di dG hanno tutte la stessa lunghezza ma ciò non è vero ad esempio nelle regioni non telomeriche o negli eucarioti più bassi nella scala evolutiva.

Quadruplex bimolecolari, o dimeriche, derivano invece dall'associazione di due filamenti aventi ciascuno almeno due tratti di guanosine:



dove n e p possono anche essere zero.

Quando nella sequenze è presente un'unica ripetizione di G , per esempio



l'unica possibilità è l'associazione di 4 filamenti con la conseguente formazione di quadruplex tetra molecolari.

Un ulteriore criterio di classificazione della strutture G-quadruplex si basa sull'orientazione relativa dei filamenti formanti la struttura: essi possono essere tutti paralleli, tre paralleli ed uno antiparallelo, paralleli adiacentemente o tutti antiparalleli (**fig. 1.4**)

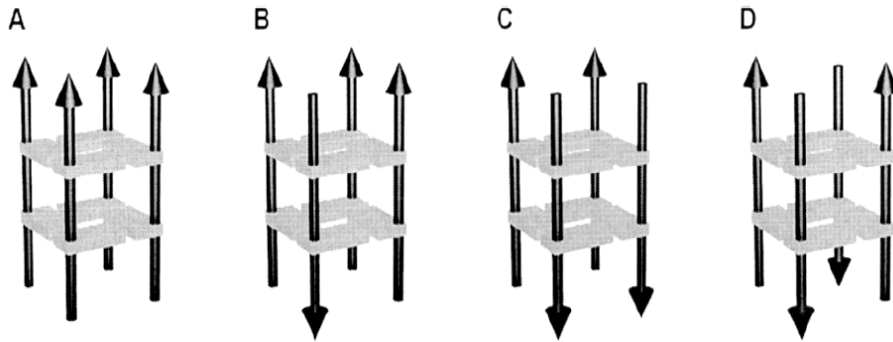


Figura 1.4: Diversa polarità dei filamenti formanti la struttura G-quadruplex. (A) Tutti i filamenti paralleli; (B) Tre filamenti paralleli e uno antiparallelo; (C) Due filamenti paralleli adiacenti; (D) Due filamenti paralleli alternati.

Studi NMR e di cristallografia a raggi X hanno dimostrato che brevi oligonucleotidi poli dG possono formare strutture quadruplex con filamenti tutti paralleli. Le sequenze delle ripetizioni telomeriche di *Oxtricha* e di *Tetrahymena* costituiscono un esempio di G-quadruplex con tre filamenti paralleli ed uno antiparallelo; ci sono infine diversi esempi di strutture quadruplex con filamenti paralleli adiacentemente o alternativamente.

Nel caso di quadruplex monomolecolari o bimolecolari, i *loop* che connettono i filamenti possono assumere diverse tipologie.

I filamenti coinvolti nella formazione di strutture bimolecolari possono infatti presentare *loop* laterali o diagonali. I *loop* diagonali tendono a disporsi all' estremità opposte rispetto al centro della tettrade (**fig. 1.5a**).

La formazione di *loop* diagonali dallo stesso lato è infatti altamente improbabile a causa sia dell' ingombro sterico, sia della repulsione elettrostatica tra le due catene negative dei legami fosfodiesteri. Invece, i *loop* laterali possono o protrarsi dallo stesso lato ed essere sia paralleli (**fig. 1.5b**) che antiparalleli (**fig. 1.5c**), o dal lato opposto ed assumere due diverse direzioni (**fig. 1.5d-e**).

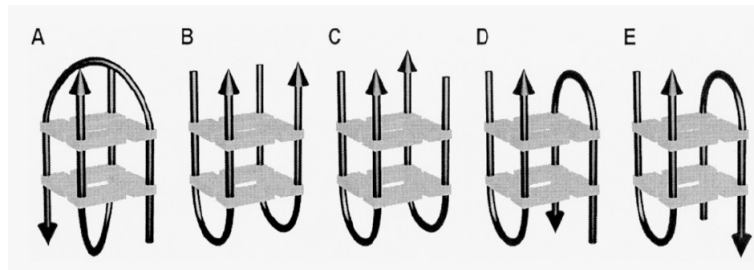


Figura 1.5: *Disposizione dei loop che tengono uniti tratti di G che partecipano alla formazione di strutture G-quadruplex bimolecolari.*

Per le quadruplex monomolecolari il numero delle possibili orientazioni dei *loop* è ridotto. I tre *loop* possono unirsi tutti e tre lateralmente (**fig. 1.6a**) oppure due laterali e uno diagonale (**fig. 1.6b**).

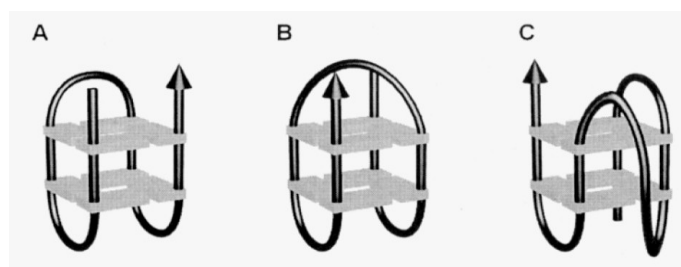


Figura 1.6: *Disposizione dei loop che tengono uniti tratti di G che partecipano alla formazione di strutture G-quadruplex monomolecolari.*

Tuttavia c'è almeno un esempio di filamenti paralleli connessi via *loop* che si estendono al di fuori del centro della tetrate di G (**fig. 1.6C**): ciò indica che lo spettro delle strutture monomolecolari può essere più complesso di quanto finora esaminato.

Infine, un ulteriore criterio di distinzione, risiede nella diversa conformazione del legame glicosidico delle guanosine. Mentre infatti nel B-DNA tutte le basi sono in conformazione *anti*, le guanine coinvolte nella formazione dei quartetti possono essere sia in conformazione *syn* che *anti* (**fig. 1.7**).

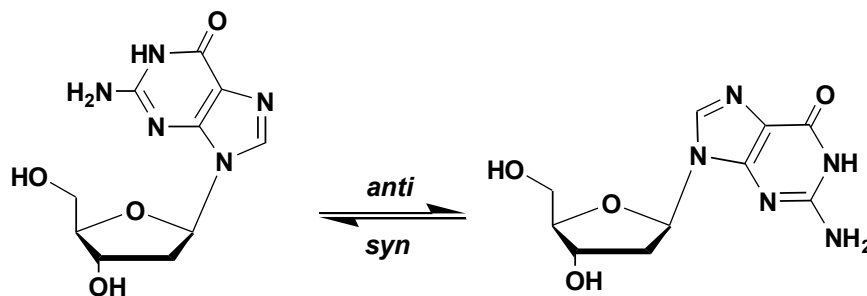


Figura 1.7: Rotazione intorno al legame N-glicosidico per l'interconversione tra le conformazioni *syn* e *anti*.

Più precisamente, le guanine formanti la tetrate e appartenenti a filamenti paralleli hanno la stessa conformazione; viceversa se appartengono a filamenti antiparalleli devono avere necessariamente diversa conformazione.

La conformazione glicosidica influenza la relativa orientazione delle basi nelle tetradi continue, l'energia di *stacking* fra di essi ed il tipo di solchi. Mentre nel B-DNA sono presenti unicamente un solco maggiore ed uno minore, lo *stacking* tra i quartetti di guanine produce 4 solchi che possono essere profondi, stretti o medi¹⁷. Se i filamenti che formano la tetrade di guanine sono tutti paralleli, i 4 solchi generati saranno tutti medi. Nel caso invece di quadruplex antiparallele per stabilire la tipologia dei solchi bisogna considerare la conformazione glicosidica delle guanosine. Le guanine di filamenti adiacenti che hanno lo stesso angolo di torsione glicosidica producono solchi medi, mentre le guanine su filamenti adiacenti ma con diversa conformazione glicosidica producono solchi stretti o profondi (**fig. 1.8**)

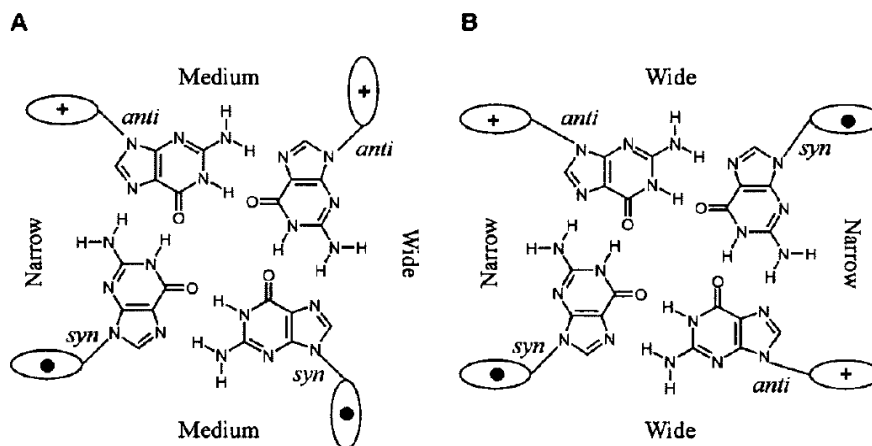


Figura 1.8: Relazione tra angoli di torsione glicosidici e polarità dei filamenti, indicate con (+) e (•) che genera solchi di diversa larghezza. (A) Solchi medi: G disposte su filamenti adiacenti e paralleli con lo stesso angolo di torsione intorno al legame N-glicosidico; (B) Un solco largo ed uno stretto: G disposte su filamenti adiacenti antiparalleli con angolo di torsione opposto attorno al legame N-glicosidico.

1.3 Esempi di strutture quadruplex mono, bi e tetra-molecolari

Tra le strutture a quadrupla elica monomolecolari possono essere identificate quattro differenti tipologie.

L'aptamero legante la trombina, $d(G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2)$ può ripiegarsi in una quadruplex contenente due quartetti di G con le basi in una orientazione del tipo *syn-anti-syn-anti* e tre *loop* laterali¹⁸ (fig. 1.9).

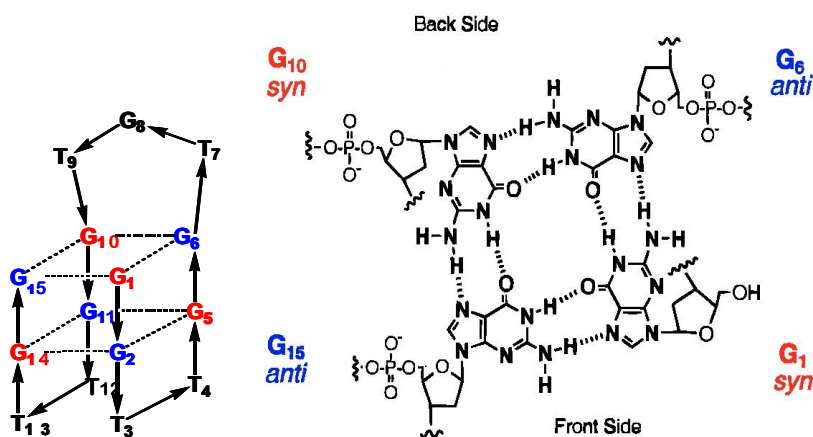


Figura 1.9: Quadruplex monomolecolare a sedia formata dall' aptamero antitrombinico $d(G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2)$.

Le quadruplex intramolecolari con tre *loop* laterali sono frequentemente definite 'strutture a sedia'. Ciascun tratto G_2 ripetuto è 5'-*syn-anti-3'* e tutte le timine sono in una conformazione *anti*. La quadrupla elica è caratterizzata da due solchi larghi e due stretti. Le timine dei *loop* corti TT (T4 e T13) sono impilate su quartetti di G vicini e formano un legame a idrogeno, mentre le timine T3 e T12 presentano una maggiore

flessibilità. La timina T7 del più lungo *loop* centrale TGT è collocata nel solco maggiore mentre le altre due basi del *loop*, G8 e T9, sono più o meno impilate sui quartetti di G.

La sequenza del telomero umano, $[AG_3(T_2AG_3)_3]$, si ripiega in una quadruplex composta da tre quartetti di G in una orientazione del tipo *syn-syn-anti-anti*, due *loop* TTA laterali e un *loop* TTA diagonale¹⁹ schematicamente illustrata in **fig. 1.10**.

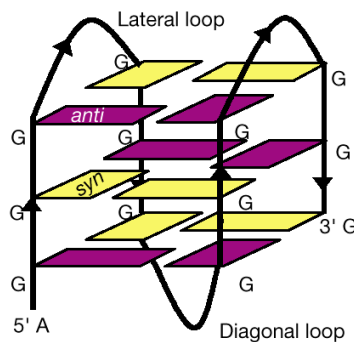


Figura 1.10: *Quadruplex monomolecolare formata dalla sequenza telomerica $d[AG_3(T_2AG_3)_3]$ in soluzione in presenza di ioni sodio.*

Diversamente dalla sequenza $[d(G_3T_4G_3)]_2$, le tre guanine consecutive a partire dal terminale 5', adottano conformazioni del tipo *anti-syn-anti* e *syn-anti-syn* alternate. Le adenine dei *loop* si ripiegano sui quartetti di guanine per dare interazioni di tipo $\pi-\pi$ *stacking*. Quadruplex intramolecolari aventi un *loop* diagonale e due *loop* laterali sono

comunemente definite come ‘strutture a cesto’ e si formano in presenza di cationi monovalenti differenti (sodio o potassio).

Tuttavia un recente studio cristallografico ha mostrato che la sequenza del telomero umano in presenza di K^+ adotta una struttura radicalmente diversa con tutti i filamenti paralleli, le guanine sono tutte in conformazione *anti* ed i risultanti *loop* diagonali d(TTA) orientati lontano dai quartetti di G¹⁹ (fig. 1.11).

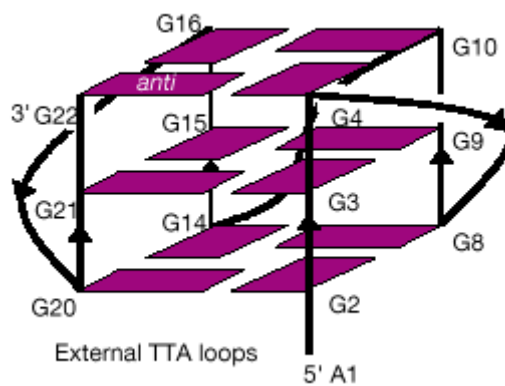


Figura 1.11: Quadruplex monomolecolare formata dalla sequenza telomerica $d[AG_3(T_2AG_3)_3]$ ottenuta mediante Raggi X in presenza di ioni potassio.

La sequenza telomerica di *Oxytricha*, $d[G_4(T_4G_4)_3]$, forma una struttura che possiede molte delle caratteristiche proprie della quadruplex dimerica a forcina²⁰ $[d(G_4T_4G_4)]_2$. Infatti, i quattro quartetti di G sono nella stessa orientazione *syn-syn-anti-anti*. Nella struttura è presente un *loop* T₄ diagonale, che possiede una conformazione simile ai *loop* diagonali osservati nelle sequenze $[d(G_4T_4G_4)]_2$ e $[d(G_3T_4G_3)]_2$ e due

loop T4 laterali. Lungo i filamenti, i tratti G_4 ripetuti presentano un'orientazione alternata del tipo *G1-syn-G2-anti-G3-syn-G4-anti* con la guanina 5' terminale sempre nella conformazione *syn* e quella 3' terminale sempre nella conformazione *anti*. Ogni sequenza G_4 ha vicino una sequenza G_4 parallela ed una antiparallela originando tre solchi di dimensioni differenti. Queste caratteristiche sono illustrate schematicamente in **fig. 1.12**.

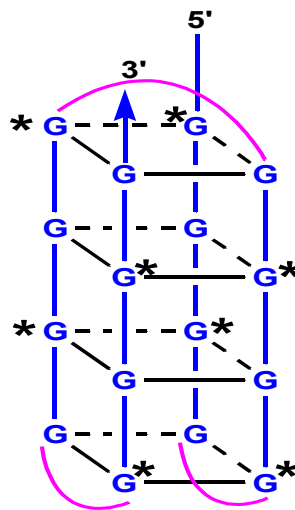


Figura 1.12: *Quadruplex monomolecolare della sequenza $d[G_4(T_4G_4)_3]$. Le linee curve indicano i loop T_4 . Le G^* sono in conformazione *syn* mentre le G sono in conformazione *anti*.*

La sequenza telomerica in *Tetrahymena*, $[d(T_2G_4)_4]$, assume una struttura quadruplex che possiede alcune caratteristiche insolite (**fig. 1.13**).

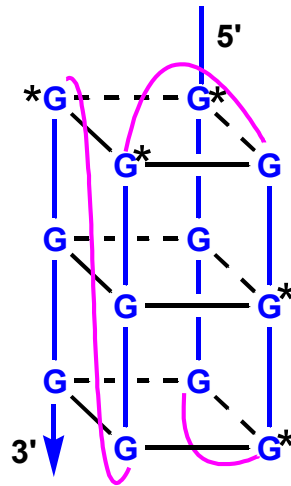


Figura 1.13: Rappresentazione schematica della struttura quadruplex monomolecolare formata dalla sequenza, $[d(T_2G_4)_4]$.

Tale struttura presenta tre quartetti²¹, in due dei quali le guanine sono in un'orientazione *syn-anti-anti-anti* e nel terzo le guanine assumono un orientazione *syn-syn-syn-anti*. Ci sono due *loop* laterali, GT_2G e T_2G , e un *loop* corto T_2 che attraversa uno dei solchi. In tre tratti G_3 , le guanine possiedono conformazioni *syn-anti-anti* ed in un solo tratto G_3 , le guanine assumono conformazioni *syn-syn-anti*. Le guanine 5' dei *loop* sono tutte in una conformazione *anti* e quelle 3' dei *loop* in conformazione *syn*.

Oligonucleotidi contenenti tratti $(dG_n)_2$, tendono ad assemblarsi in strutture dimeriche. Molte di queste strutture sono state esaminate mediante raggi X e NMR e l'elevato polimorfismo di questa famiglia di quadruplex dimostra come il tipo di struttura dipenda dal contenuto in basi e dalla sequenza stessa dell'oligonucleotide.

La **figura 1.14** mostra alcune quadruplex bimolecolari. In particolare la struttura della quadruplex $[d(G_4T_4G_4)]_2$, ottenuta mediante i Raggi X^{22} , è coordinata allo ione potassio ed ha *loop* laterali ed opposti al centro della tetrate di G. Le 4 guanine consecutive di ciascun filamento presentano una orientazione alternata del tipo *G1-syn-G2-anti-G3-syn-G4-anti* con le due guanine all'estremità 5' in conformazione *syn*. Le guanine in ciascun quartetto presentano un'orientazione del tipo *G1-syn-G4-anti-G9-syn-G12-anti*.

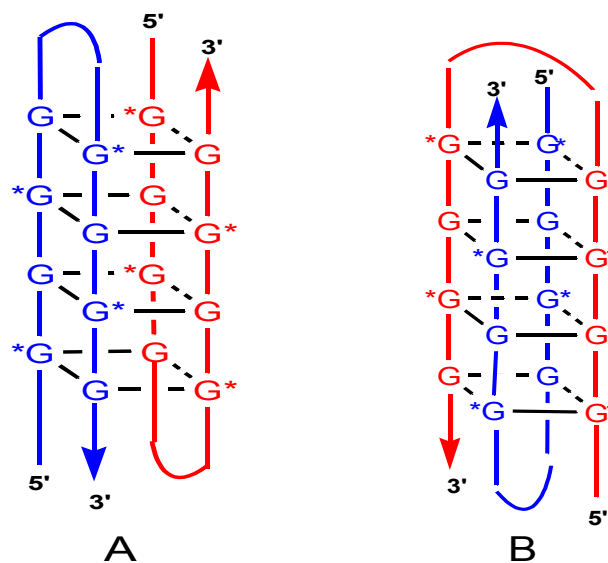


Figura 1.14: *Quadruplex bimolecolari formate dalla sequenza $[d(G_4T_4G_4)]_2$. A) struttura ottenuta mediante Raggi X; B) la struttura risolta mediante NMR. Le linee curve indicano i loop T_4 . Le G^* sono in conformazione *syn* mentre le G sono in conformazione *anti*.*

La struttura quadruplex della stessa sequenza $[d(G_4T_4G_4)]_2$ ottenuta mediante NMR in presenza di Na^+ o K^+ , piuttosto differente dalla

struttura cristallina, presenta *loop* diagonali e opposti al centro della tetrate di G. Le 4 guanine consecutive di ciascun filamento presentano ancora un'orientazione alternata del tipo *G1-syn-G2-anti-G3-syn-G4-anti* con le due guanine all'estremità 5' in conformazione *syn*, ma le guanine in ciascun quartetto presentano un'orientazione del tipo *G1-syn-G9-syn-G12-anti-G4-anti* a causa della presenza di un *loop* diagonale. In entrambe le strutture, sia quella esaminata mediante Raggi X sia quella esaminata mediante NMR, c'è un cambiamento nella direzione del legame idrogeno donatore e accettore tra i quartetti adiacenti.

La quadruplex dimerica a forcina, $[d(G_3T_4G_3)]_2$, oltre ad avere un quartetto in meno, presenta altre differenti caratteristiche²³. La struttura in soluzione, in presenza di ioni Na^+ o K^+ , ha *loop* diagonali alle estremità opposte della quadruplex come quella assunta dalla sequenza $[d(G_4T_4G_4)]_2$ e l'allineamento dei filamenti è identico. La quadruplex è asimmetrica e le prime tre guanine consecutive di un filamento presentano una orientazione del tipo *G1-syn-G2-anti-G3-anti* mentre le successive tre guanine dello stesso filamento presentano una orientazione del tipo *G8-syn-G9-syn-G10-anti* e l'orientazione sul filamento opposto è invertita. Nonostante ciò, la guanina 5' in ciascun filamento è sempre nella conformazione *syn* e la guanina 3' è nella conformazione *anti*. La somiglianza delle strutture di $[d(G_3T_4G_3)]_2$ e $[d(G_4T_4G_4)]_2$ suggerisce un comune ripiegamento che è determinato

dalla conformazione del *loop* e la sola differenza significativa tra le due strutture consiste nella delezione di uno dei quartetti interni nella sequenza $[d(G_3T_4G_3)]_2$.

Numerosi studi riportati in letteratura hanno evidenziato la possibilità di formare strutture a quadrupla elica in presenza di basi quali adenina e citosina. L'effetto della presenza della citosina, che può potenzialmente formare quartetti di basi con legami ad idrogeno di tipo Watson-Crick con la guanina, è stato visto in diverse strutture quadruplex: $[d(G_3CT_4G_3C)]_2$, $[d(GCG_2T_3GCG_2)]_2$, $[d(GCATGCT)]_2$. Il quartetto di basi G-C-G-C è mostrato in **figura 1.15**

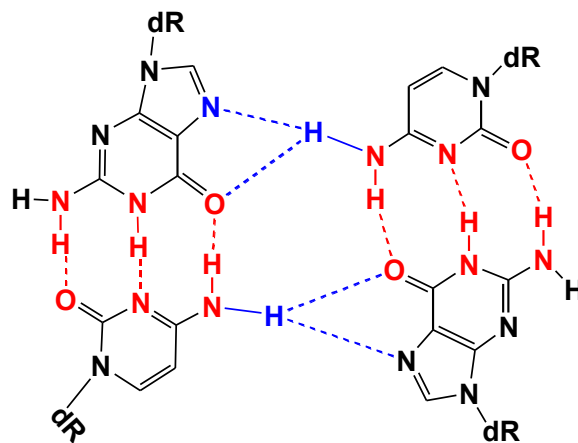


Figura 1.15: Quartetto di basi G-C-G-C presente nelle strutture quadruplex formate da $[d(G_3CT_4G_3C)]_2$ e $[d(GCG_2T_3GCG_2)]_2$. In rosso sono indicati gli accoppiamenti che avvengono secondo la direzione normale W-C.

Le quadruplex bimolecolari con *loop* diagonali sono generalmente favorite ad alte concentrazioni del filamento o dei filamenti che la

compongono. In soluzioni diluite ciascun filamento ripiega prima su se stesso per poi associarsi a un dimero con l'altro filamento ripiegato (**fig. 1.16a**). In soluzioni concentrate si possono formare preferenzialmente accoppiamenti tra due filamenti differenti i quali poi ripiegano l'uno sull'altro per formare la struttura finale (**fig. 1.16b**).

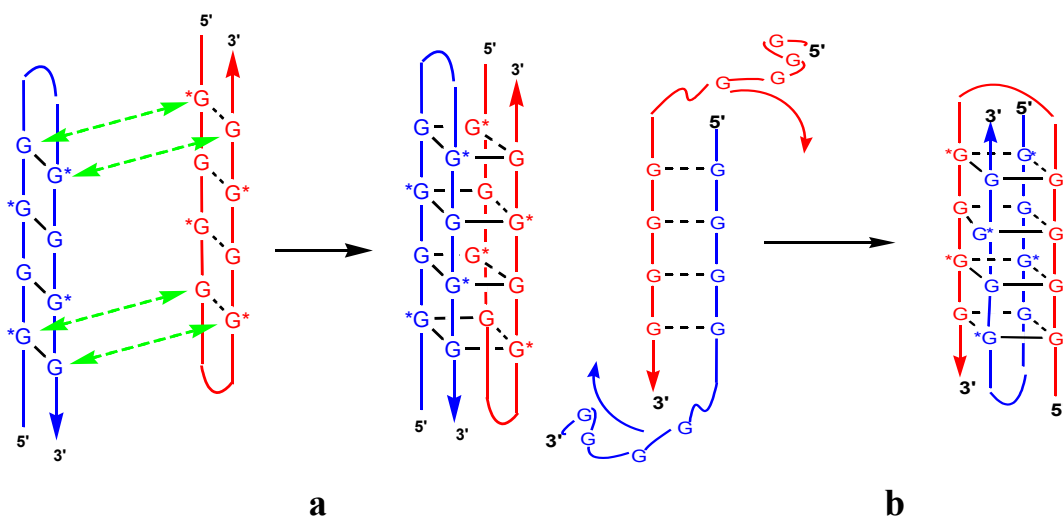


Figura 1.16: *Formazione di differenti quadruplex bimolecolari a seconda delle concentrazioni di ON in soluzione.*

In questo caso, il filamento deve necessariamente ripiegarsi in diagonale dando luogo ad un'inversione di polarità e alcune basi devono assumere una conformazione *syn* per poter formare il quartetto. L'atomo di ossigeno in posizione due della prima timina del *loop* può anche avere una debole coordinazione con lo ione Na^+ che è localizzato tra i due quartetti più vicini di guanine. Sostituendo Na^+ con K^+ si destabilizza la quadruplex dimerica a forcina: infatti, a causa dell'aumentata dimensione del K^+ quest'ultimo non può penetrare nel piano del

quartetto esterno e la sua coordinazione agli ossigeni delle timine del *loop* ne risulta indebolita. Dall'insieme di queste considerazioni è evidente che esiste un delicato bilancio tra forze steriche, legami idrogeno, impilamento di basi e ioni di coordinazione nel determinare la struttura finale della quadruplex.

Le quadruple eliche tetramolecolari si originano da singoli filamenti oligonucleotidici contenenti tratti dG_n , questi formano quasi sempre strutture parallele destrorse che contengono tutte le basi nella conformazione *anti* e i 4 filamenti orientati parallelamente generano 4 identici solchi medi. Un'eccezione è rappresentata da filamenti adenina o timina; infatti sequenze come $d(TAG_2)$ e $d(T_2AG_2)$ formano, in presenza di ioni sodio, strutture simmetriche a quattro filamenti, contenenti due quartetti di G con filamenti paralleli e antiparalleli e guanine alternate *syn-anti*²⁴.

1.4 Ruolo biologico

Mentre la formazione delle strutture quadruplex *in vitro* è nota da diversi anni²⁵, c'è ora un considerevole interesse nella possibile formazione e funzione di tali strutture *in vivo*. Il genoma sia dei procarioti che degli eucarioti è estremamente ricco di sequenze poli dG potenzialmente in grado di formare strutture G-quadruplex. Calcolando il numero delle

sequenze contenenti quattro ripetizioni di 3 o 4 guanine separate da *loop*, si è visto che oltre 376000 G-Quadruplex potrebbero formarsi simultaneamente nel genoma umano^{26,27}.

Le regioni telomeriche del DNA contengono sequenze altamente ripetute come (GGGTTA)_n nell'uomo e in molti altri eucarioti²⁸, (GGGGTT)_n in *Tetrahymena* e (GGGGTTTT)_n in *Oxtricha* e *Stylonchia*²⁹. Inoltre è stato recentemente dimostrato che la formazione delle quadruplex telomeriche *in vivo* potrebbe essere regolata dal legame con specifiche proteine in seguito a specifici eventi di fosforilazione associati al ciclo cellulare³⁰

Sequenze simili sono state ritrovate nei promotori di diversi geni tra cui quello degli oncogeni c-myc^{31,32} e Ki-RAS³³ suggerendo pertanto un possibile ruolo delle strutture quadruplex nella regolazione di processi di trascrizione³⁴ (**fig. 1.17**).

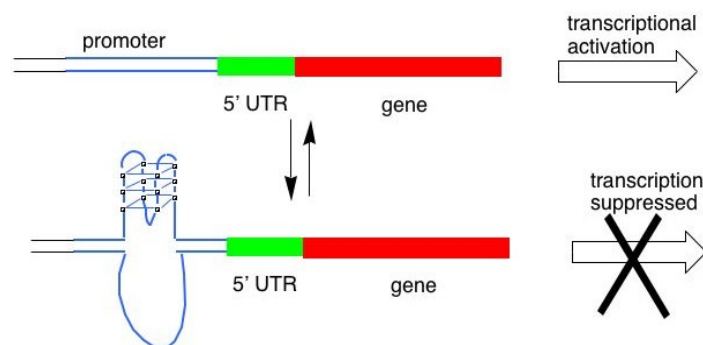


Figura 1.17: modello di regolazione della trascrizione mediante formazione di strutture quadruplex in un promotore.

Sequenze in grado di formare strutture quadruplex sono state poi ritrovate in altre importanti regioni del genoma quali regioni di *switch* delle immunoglobuline, sequenze associate alla regolazione dell'insulina³⁵ e in sequenze associate a disordini genetici³⁶.

La formazione delle strutture quadruplex *in vivo* è ulteriormente comprovata dall'identificazione di numerose proteine in grado di riconoscere specificamente strutture di questo tipo³⁷ o di promuoverne la formazione³⁸. La recente scoperta di alcune elicasi, tra cui l'elicasi della sindrome di Werner³⁹ e l'elicasi Sgs1⁴⁰ del *Saccharomyces cerevisiae*, sembra suggerire che la cellula si servi di un normale meccanismo per la rimozione di tali strutture.

Molti eventi cellulari incluso la replicazione, la ricombinazione, la trascrizione e l'allungamento del DNA telomerico implicano stadi nei quali i due filamenti del DNA possono essere separati localmente e transitoriamente, offrendo così un'opportunità al filamento ricco di G di formare strutture G-quadruplex.

Ulteriore interesse per le strutture a quadrupla elica deriva dal fatto che esse costituiscono l'impalcatura di molti aptameri⁴¹, cioè molecole di natura oligonucleotidica, selezionate mediante processo SELEX, tra cui il TBA (Thrombin Binding Aptamer)⁴² e l'aptamero inibitore dell'integrasi dell' HIV⁴³.

1.5 Applicazioni in campo nanotecnologico

Sequenze oligonucleotidiche ricche di dG possono in particolari condizioni, assemblarsi in lunghi filamenti detti *G-wires*. Marsh e coll.⁴⁴ nel 1994 dimostrarono che la sequenza 5'GGGGTTGGGG3' corrispondente alla ripetizione telomerica di *Tetrahymena Thermophila*, può assumere differenti conformazioni (**fig. 1.18**). Il filamento oligonucleotidico può ripiegarsi e dimerizzare dando luogo alla formazione di una struttura quadruplex bimolecolare (G2'-DNA) i cui *loop* possono essere laterali paralleli, laterali opposti o diagonali. L'oligomero può inoltre associarsi ad altri tre filamenti originando una quadruplex parallela (G4'-DNA) o, ancora, può strutturarsi in modo da formare un tetramero con estremità slittate. In questa condizione l'oligonucleotide può spontaneamente autoassemblarsi in strutture sopramolecolari mediante interazioni tra i quartetti di deossiguanosina posti ai terminali 5' e 3' (G-wires). La microscopia a forza atomica (AFM) e la microscopia a scansione dei *layer* (HLSTM) sono tra le tecniche più comunemente impiegate per investigare la formazione di tali polimeri.

Le *G-wire* presentano diverse proprietà che le rendono estremamente interessanti da un punto di vista nanotecnologico. Studi teorici suggeriscono infatti che esse hanno buona capacità conduttiva, basso potenziale ossidativo e sono dotate inoltre di un'alta rigidità e buona

stabilità termica e meccanica il che le rende buoni candidati nel campo delle nanotecnologie, nano elettronica e nello sviluppo di biosensori⁴⁵.

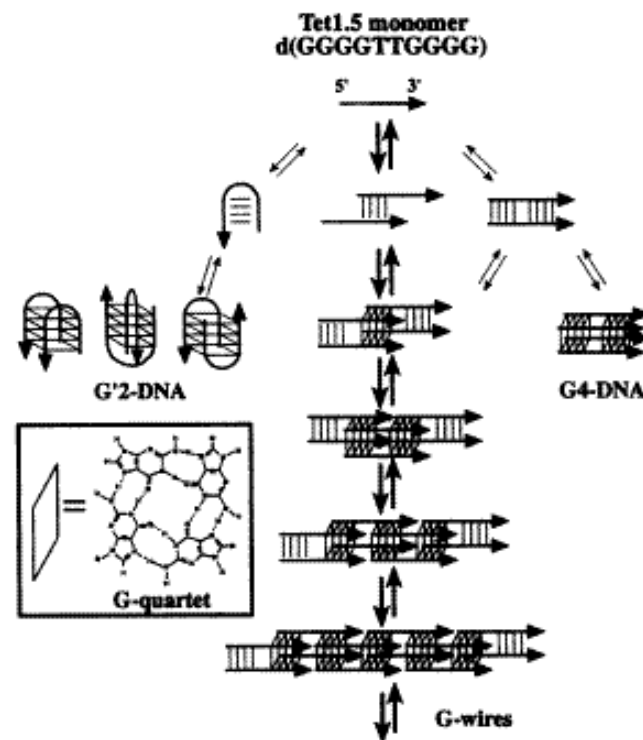


Figura 1.18: confronto delle conformazioni G-DNA che Tet1.5 può adottare. Il percorso centrale implica la formazione di una conformazione G4-DNA inusuale che, inizialmente, è poco favorita rispetto alle altre strutture

1.6 Tecniche usate per lo studio delle strutture quadruplex

Tra le tecniche più comunemente impiegate per lo studio e la caratterizzazione delle strutture quadruplex vi sono la spettroscopia

NMR⁴⁶, Raman⁴⁷ e UV⁴⁸, il dicroismo circolare⁴⁹, la calorimetria, l'elettroforesi⁵⁰ e la cristallografia⁵¹

Come descritto da Mergny e coll⁵², la formazione di strutture di tipo quadruplex può essere rapidamente monitorata mediante registrazione di spettri UV differenza i quali sono ottenuti sottraendo matematicamente lo spettro registrato a basse temperature (generalmente meno di 20°C) a cui l'ON è in forma strutturata da quello registrato a temperature alte (più di 80°C) alle quali l'ON è in forma non strutturata. Lo spettro UV differenza ha un profilo specifico per ciascuna struttura degli acidi nucleici. Tale profilo riflette le interazioni di *stacking* che si instaurano in ciascun tipo di struttura. Il tipico spettro differenza ottenuto per una struttura quadruplex (**fig. 1.19**) presenta un punto isosbastico a 280 nm circa⁵³ e la differenza tra i due spettri è massima a 295nm.

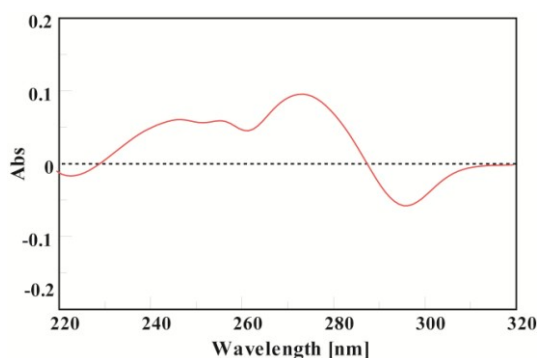


Figura 1.19 : Spettro differenza ottenuto per la sequenza telomerica umana $5'AGGG(TTAGGG)_33'$ sottraendo lo spettro registrato a 20°C da quello registrato a 90°C.

La spettroscopia UV consente inoltre di valutare la stabilità termica delle strutture quadruplex formate mediante esperimenti di denaturazione termica. Il riscaldamento di acidi nucleici produce un cambiamento nelle proprietà di assorbimento UV che riflette un cambiamento conformazionale delle molecole in soluzione e più precisamente, una distruzione delle interazioni di *stacking* tra le basi⁵⁴. Gli esperimenti di UV melting sono effettuati comunemente seguendo la variazione di intensità del massimo di assorbimento a 295nm con l'incremento della temperatura. Riportando in grafico il valore dell'assorbanza a 295nm in funzione della temperatura si ottengono per le strutture quadruplex curve sigmoidali per le quali il valore massimo della derivata prima fornisce la temperatura di fusione della struttura, comunemente indicata con T_m ⁵⁵.

Mentre per le proteine la denaturazione è generalmente un processo irreversibile, per gli acidi nucleici il raffreddamento del campione conduce ad una rinaturazione della struttura. Ulteriori informazioni di tipo cinetico possono essere pertanto ottenute osservando la presenza di fenomeni di isteresi quando il campione è sottoposto a cicli di riscaldamento (fusione) e successivamente di raffreddamento. Le strutture quadruplex monomolecolari hanno cinetiche di formazione molto veloci per cui le curve ottenute mediante riscaldamento e raffreddamento sono perfettamente sovrapponibili e non si osservano fenomeni di isteresi. Al contrario le quadruplex intermolecolari hanno

cinetiche di formazione molto lente per cui le curve di denaturazione e rinaturazione non sono più sovrapponibili e compaiono fenomeni di isteresi^{56,57}

Il dicroismo circolare è un fenomeno che origina dall'interazione tra molecole chirali con una radiazione elettromagnetica circolarmente polarizzata^{58,59}. La spettroscopia CD presenta diversi vantaggi rispetto agli altri metodi di analisi conformazionale. Prima di tutto è un metodo altamente sensibile il che consente di lavorare con quantità piccolissime (20µg/l). Questo è un grosso vantaggio nello studio di campioni a bassa solubilità (ad esempio lunghi frammenti di DNA ricchi di dG) o di quelli che tendono ad aggregare in solventi particolari. In secondo luogo la tecnica si adatta sia allo studio di piccoli frammenti (corti oligonucleotidi) che di molecole più grosse (DNA). Inoltre i campioni possono essere facilmente titolati con diversi agenti (sali, alcool o acidi) e la tecnica è veloce e relativamente economica⁶⁰.

Gli spettri delle strutture quadruplex presentano profili diversi in base alla differente conformazione *syn* o *anti* delle guanine coinvolte nella formazione della tetrate. Una banda positiva a 260-265 nm circa, accoppiata con una banda negativa a 240-245 nm è considerata tipica di un arrangiamento parallelo in cui tutti i legami N-glicosidici sono in conformazione *anti*⁶¹. Strutture a quadrupla elica che presentano una banda positiva CD a 295 nm circa accoppiata ad una banda negativa

intorno ai 260-265 nm ed una piccola banda positiva a circa 245nm, hanno generalmente una tipologia anti-parallela, caratterizzata da un'alternanza di orientazioni intorno al legame N-glicosidico del tipo *syn-anti-syn-anti*^{62,63}. Entrambi i tipi di quadruplex presentano poi un caratteristico massimo positivo a 210 nm. Lo spettro CD di una quadruplex parallela appare simile a quello dell' A-DNA il che suggerisce simili interazioni di *stacking* tra le basi. Unica differenza è che le quadruplex mostrano a 210 nm un picco positivo mentre nell'A-DNA alla stessa lunghezza d'onda compare un profondo picco negativo. Spettri CD che presentano entrambe le bande positive, 260 e 290 nm sono caratteristici di strutture quadruplex in cui le guanine hanno conformazione *syn-syn-syn-anti* o *anti-anti-anti-syn* e di conseguenza i filamenti hanno un'orientazione mista del tipo 3+1 (3 filamenti paralleli ed uno antiparallelo)⁶⁴.

Riferimenti bibliografici

- ¹ Belmont, P.; Constant, J.F.; Demeunynck. *Chem. Soc. Rev.*, **2001**, 30, 70-81
- ² Neidle, S. *Nucleic Acid Structure*. Oxford University Press Inc., New York, **1999**
- ³ Mirkin, S.M. *Front Biosci.*, **2008**, 13, 1064-1071
- ⁴ Williamson, J.R. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1994**, 23, 703-730.
- ⁵ Keniry, M.A. *Biopolymers*, **2000**, 56, 123-146.
- ⁶ Rhee, S.; Han, Z.J.; Liu, K.; Miles, H.T.; Davies, D.R. *Biochemistry*, **1999**, 38, 16810
- ⁷ Otero, R.; Schock, M.; Molina, L.M.; Laegsgaard, E.; Stensgaard, I.; Hammer, B.; Besenbacher, F. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **2005**, 44, 2270
- ⁸ Clay, E.H.; Gould, I.R. *J. Mol. Graphics Modelling*, **2005**, 24, 138-146.
- ⁹ Dingley, A.J.; Peterson, R.D.; Grzesiek, S.; Feigon, J. *J. Amer. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 14466-14472
- ¹⁰ Marathias, V.M.; Bolton, P.H. *Biochemistry*, **1999**, 38, 4355-4364
- ¹¹ Haider, S.; Parkinson, G.N.; Neidle, S. *J. Mol. Biol.*, **2002**, 320, 189-200
- ¹² Sen, D.; Gilbert, W.A. *Nature*, **1992**, 31, 8406

- ¹³ Burge, S., Parkinson, G.N.; Hazel, P.; Todd, A.K.; Neidle, S. *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 5402-5415
- ¹⁴ Wang, Y.; Patel, D.J. *J. Mol. Biol.*, **1995**, 251, 263-282
- ¹⁵ Keniry, M.A.; Strahan, G.D.; Owen, E.A.; Shafer, R.H. *Eur .J. Biochem.*, **1995**, 233, 631-643
- ¹⁶ Laughlan, G.; Murchie, A.E.; Norman, D.G.; Moore, M.H.; Moody, P.C.; Lilley, D.M.; Luisi, B. *Science*, **1994**, 265, 520-524
- ¹⁷ Wang, K.Y.; Krawczyk, S.H.; Bischoberger, N.; Swaminathan, S.; Bolton, P.H.; *Biochemistry*, **1993**, 32, 11285-92
- ¹⁸ Wang, Y.; Patel, D.J. *Structure*, **1993**, 1, 263-282
- ¹⁹ Parkinson, G.N.; Lee, M.; Neidle, S. *Nature*, **2002**, 417, 876-880
- ²⁰ Smith, F.W.; Schultze, P. ; Feigon, J. *Structure*, **1995**, 3, 997-1008
- ²¹ Wang, Y.; Patel, D.J. *Structure*, **1994**, 2, 1141-1156
- ²² Kang, C.; Zhang, X.; Ratliff, R.; Moyzis, R.; Rich, A. *Nature*, **1992**, 356, 126-131
- ²³ Strahan, G. D.; Keniry, M.A. ; Shafer, R.H.; *Biophys. J.* **1998**, 75, 968-981
- ²⁴ Kettani, A.; Bouaziz, S.; Wang, W.; Jones, R.A.;Patel, D.J.; *Nature Struct. Biol.* **1997**, 4, 382-389
- ²⁵ Gellert, M.; Lipsett, M.N.; Davies, D.R. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1962**, 48, 2013.

- ²⁶ Huppert, J.L.; Balasubramanian, S.; *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 2908-2916.
- ²⁷ Todd, A.K.; Johnston, M.; Neidle, S. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 2901-2907
- ²⁸ Blackburn, E.H. *Nature*, **1991**, 350, 569-573
- ²⁹ Schaffitzel, C.; Berger, I; Postberg, J.; Hanes, J.; Lipps, H.J.; Pluckthun, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98, 8572-8577
- ³⁰ Paeschke, K.; Simonsson, T., Postberg, J.; Rhodes, D.; Lipps, H.J. *Nature Struct. Mol. Biol.* , **2005**, 12, 847-854
- ³¹ Simonsson, T.; Pecinka.; Kubista, M. *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26, 1167-1172
- ³² Rankin, S.; Reszka, A.P.; Huppert, J.; Zloh, M.; Parkinson, G.N.; Todd, A.K.; Ladame, S.; Balasubramanian, S.; Neidle, S. *J. Am.Chem.Soc.*, **2005**, 127, 10584-10589
- ³³ Cogoi, S.; Xodo, L.E. *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, 2536-2549
- ³⁴ Huppert, J.L.; Balasubramanian, S. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35, 406-413
- ³⁵ Catasti, P.; Chen, X.; Moyziz, R.K.; Bradbury, E.M.; Gupta, G. *J. Mol. Biol.*, **1996**, 264, 534-545
- ³⁶ Darnell, J.C.; Jensen, K.B.; Jin, P.; Brown, V.; Warren, S.T.; Darnell, R.B. *Cell*, **2001**, 107, 489-499
- ³⁷ Walsh, K.; Gualberto, A. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 13714-13718

- ³⁸ Sundquist, W.I.; Heaphy, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, 90, 3393-3397
- ³⁹ Fry, M.; Loeb, L.A. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 12797-12802
- ⁴⁰ Sun, H.; Bennett, R.J.; Maizels, N. *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 1978-1984
- ⁴¹ Hermann, D. J.; Patel, A. *Science* , **2000**, 287, 820-825
- ⁴² Shultze, P.; Macaya, R.F.; Feigon, J. *J. Mol. Biol.* ,**1993**, 90, 3393-3397
- ⁴³ Jing, N.; Rando, R.F.; Pommier, Y.; Hogan,M.E. *Biochemistry*, **1997**, 36, 12498-12505
- ⁴⁴ Marsh, T.C.; Henderson, E. *Biochemistry*, **1994**, 33, 10718-10724
- ⁴⁵ Biyani, M.; Nishigaky, K. *Gene*, **2005**, 130-138
- ⁴⁶ Smith, F.W.; Feigon, J. *Nature*, **1992**, 356, 164-168
- ⁴⁷ Miura, T.; Thomas, G.J. *Biochemistry*, **1995**, 34, 9645-9654
- ⁴⁸ Mergny, J.L.; Phan, A.T.; Lacroix, L. *FEBS Letters*, **1998**, 435, 74-78
- ⁴⁹ Hardin, C.C.; Henderson, E.; Watson, T.; Prosser, J.K. *Biochemistry*, **1991**, 30, 4460-4472
- ⁵⁰ Williamson, J.R.; Raghuraman, M.K.; Cech, T.R. *Cell*, **1989**, 59, 871-880
- ⁵¹ Kang, C.H.; Zhang, X.; Ratliff, R.; Moyzis, R.; Rich, A. *Nature*, **1992**, 356, 126-131

- ⁵² Mergny, J.L.; Li, J.; Lacroix, L.; Amrane, S.; Chaires, J.B. *Nucleic Acids Res*, **2005**, 33, e138/1 –e138/6
- ⁵³ Scaria, P.V.; Shire, S.J. ; Shafer, R.H. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 10336-10340
- ⁵⁴ Mergny, J.L.; Lacroix, L. *Oligonucleotides*, **2003**, 13, 515-537
- ⁵⁵ Mergny, J.L.; Phan, A.T.; Lacroix, L. *FEBS Letters*, **1998**, 435, 74-78
- ⁵⁶ Gros, J.; Rosu, F.; Amrane, S., De Cian, A.; Gabelica, V.; Lacroix, L.; Mergny, J-L. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35, 3064-3075
- ⁵⁷ Mergny, J.L.; De Cian, A.; Ghelab, A.; Saccà, B.; LAcroix, L. *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 81-94
- ⁵⁸ Nakanishi, K.; Beroya, N., Woody, R.W. Circular Dichroism principles and Application. *VHC Publisher Inc. New York.* **1991**
- ⁵⁹ Woody, R.W. *Methods Enzymol*, **1995**, 246, 34-71
- ⁶⁰ Kypr, J.; Kejnovska, I.; Renciuik, D.; Vorlickova, M. *Nucleic Acids Res.*, **2009**, 37, 1713-1725
- ⁶¹ Jin, R.; Gaffney, B.L.; Wang, C.; Jones, R.A.; Breslauer, K.J. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1992**, 89, 8832-8836
- ⁶² Gray, D, M.; Wen, J.D.; Gray, C.W.; Repges, R.; Repges, C.; Raabe, G.; Fleishhauer, J. *Chirality*, **2008**, 20, 431-440.
- ⁶³ Paramisivan, S.; Rujan, I.; Bolton, P.H. *Methods*, **2007**, 43, 324- 331
- ⁶⁴ Zhang, Na; Phan, A.T.; Patel, D.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 17277-17285

CAPITOLO 2

CARATTERISTICHE STRUTTURALI E SOVRASTRUTTURALI DI UN TRATTO POLI-G CONTENUTO ALL'INTERNO DEL PROMOTORE DEL GENE hTERT

2.1 Introduzione

I telomeri sono complessi nucleoproteici localizzati all'estremità dei cromosomi. Essi svolgono un ruolo protettivo essenziale evitando la perdita di informazioni durante i processi di duplicazione¹ (**fig. 2.1**). Il DNA telomerico è costituito da un lungo tratto a doppia elica contenente brevi sequenze polidG (5-8bp) ripetute molte volte e da un corto singolo filamento ricco di G al 3' terminale^{2,3}.

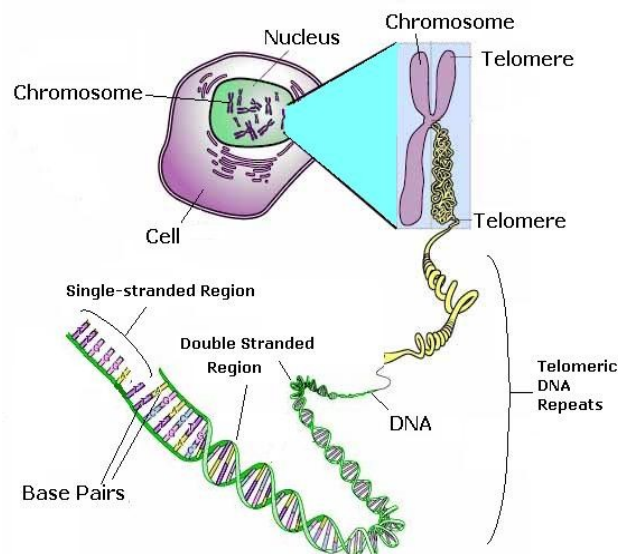


Figura 2.1: Dalla cellula ai telomeri

Tale estremità rappresenta il substrato della telomerasi, enzima ribonucleotico con attività di trascrittasi inversa (DNA polimerasi-RNA dipendente), coinvolto nel mantenimento della stabilità e dell'integrità dei telomeri^{4,5}. L'enzima consiste di una sub-unità ad RNA (hTER) che funge da stampo per l'aggiunzione di nuovi deossinucleotidi all'estremità telomerica, di una subunità proteica (127KDa) ad attività catalitica (hTERT, *Human Telomerase Reverse Transcriptase*) e di alcune proteine accessorie quali Hsp90, p23 e TP1^{6,7}. La telomerasi aggiunge piccole sequenze ripetute del tipo d(TTAGGG)_n all'estremità 3' del cromosoma usando come stampo le sequenze ricche di C contenute nella sub unità a RNA (fig. 2.2).

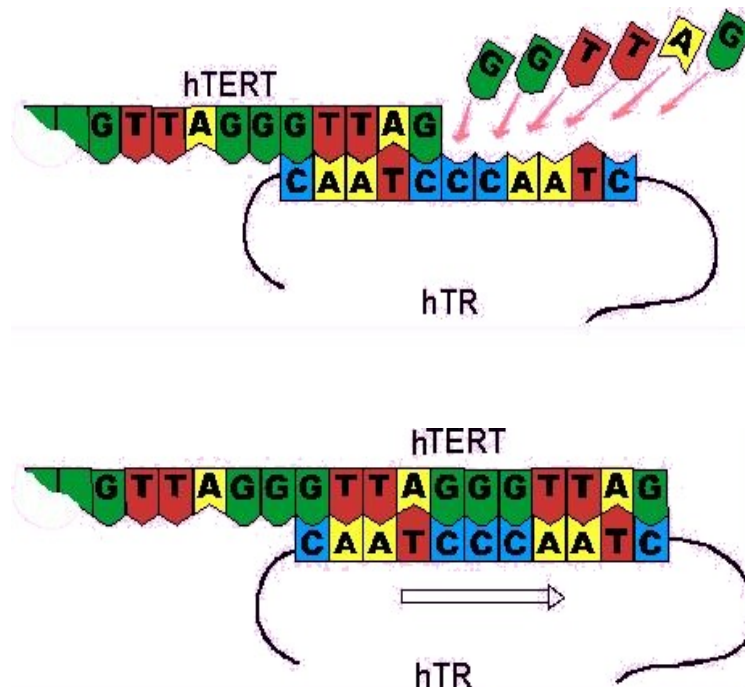


Figura 2.2: Meccanismo d'azione della telomerasi

In condizioni normali la telomerasi è attiva soltanto nelle cellule germinali e durante lo sviluppo embrionale garantendo il mantenimento della giusta lunghezza cromosomiale al momento della nascita⁸. Le cellule somatiche invece mancano dell'attività catalitica della telomerasi, in quanto hTERT non è costitutivamente espressa. Di conseguenza i telomeri sono soggetti ad un progressivo accorciamento ad ogni ciclo cellulare che termina in un evento apoptotico. Il meccanismo molecolare attraverso cui i telomeri troppo corti possono portare alla morte cellulare sembra essere legato alla perdita del loro corretto ripiegamento naturale. Secondo alcune teorie comunemente accettate, la cellula è infatti in grado di riconoscere questo diverso ripiegamento come danno al DNA, avviando il *pathway* dell'apoptosi sulla base dell'attività di molecole come il fattore di trascrizione p53⁹. La maggior parte delle cellule tumorali evadono tale destino divenendo immortali proprio grazie all'espressione di hTERT¹⁰. Una serie di fattori di regolazione quali c-myc, Sp1, e i recettori degli estrogeni regolano la trascrizione di hTERT come dimostrato dalla presenza di elementi consenso nel promotore del gene^{11,12}. Diversi oncosoppressori come TGF-B, Mad1 ed E2F-1 sono invece implicati nella sua *down* regolazione

Considerata quindi la stretta correlazione tra immortalizzazione delle cellule e progressione tumorale, le nuove frontiere della ricerca nel

campo delle strategie antitumorali mirano proprio a reprimere l'espressione di hTERT^{13,14}.

2.2 Obiettivi

In collaborazione con il gruppo di ricerca diretto dalla Prof.ssa Maria Savino dell'Università La Sapienza di Roma, abbiamo intrapreso lo studio delle caratteristiche strutturali e sovrastrutturali di un tratto ompurinico/omopirimidinico situato vicino al sito di inizio della trascrizione del gene codificante per hTERT (tra -108 e -90 bp)¹⁵. In *vivo* il DNA cromosomiale è altamente impacchettato dalle proteine istoniche all'interno dei nucleosomi¹⁶. Tuttavia studi teorici hanno evidenziato che l'energia libera per l'organizzazione cromatinica della regione compresa tra -200 bp ed il sito di inizio della trascrizione ha valori abbastanza elevati tali da supporre uno scarso grado di organizzazione cromatinica^{17,18}. I risultati ottenuti dall'analisi sistematica della posizione dei nucleosomi lungo la sequenza del promotore del gene h-TERT riportati in **figura 2.3** sono espressi in un diagramma della variazione di energia libera di legame ΔG in funzione della sequenza oligonucleotidica del promotore.

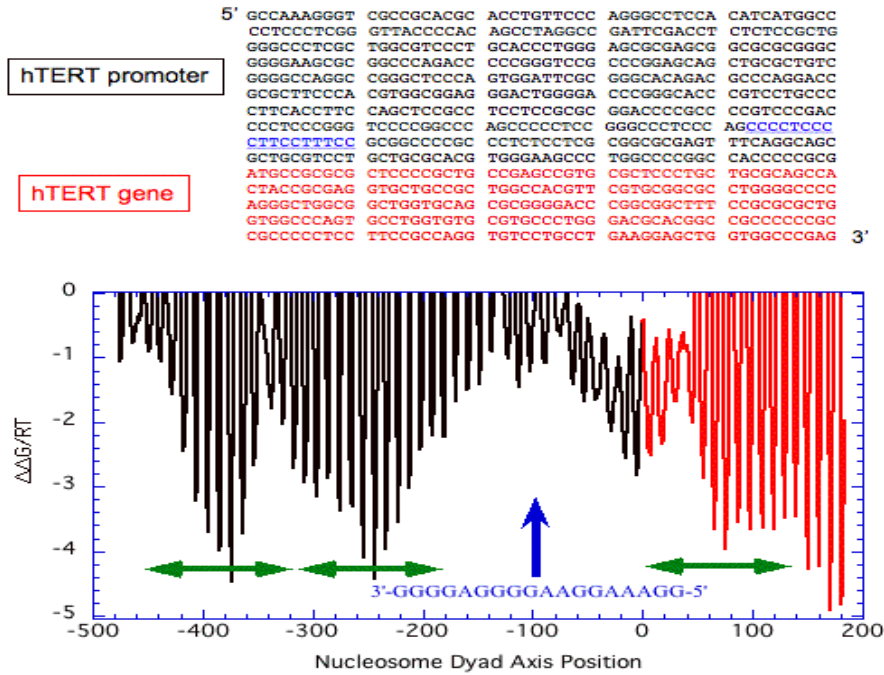


Figura 2.3: posizione teorica dei nucleosomi lungo la sequenza del promotore dell'h-TERT.

I valori più alti in energia libera, riscontrati in alcune regioni della sequenza del promotore analizzata, corrispondono a regioni di instabilità dei nucleosomi e ciò correla con i dati sperimentali presenti in letteratura secondo i quali in questa regione risiede un sito di ipersensibilità alla DNasi. Poiché il tratto vicino al sito di inizio della trascrizione (-108/-90bp) corrisponde ad una regione che è svantaggiosa energeticamente per la formazione di nucleosomi, essa può in teoria, essendo una sequenza poli-G, formare strutture G-quadruplex senza competere con la loro formazione.

Le caratteristiche strutturali dell'ON 18mer in esame avente sequenza 5'GGAAAGGAAGGGGAGGGG3' e indicato con HTP, sono state studiate mediante spettroscopia CD, microscopia a forza atomica (AFM), elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) e saggi di interferenza di metilazione. Gli esperimenti condotti hanno mostrato che esso è in grado di formare strutture G-quadruplex che al loro volta possono organizzarsi in sovrastrutture lineari.

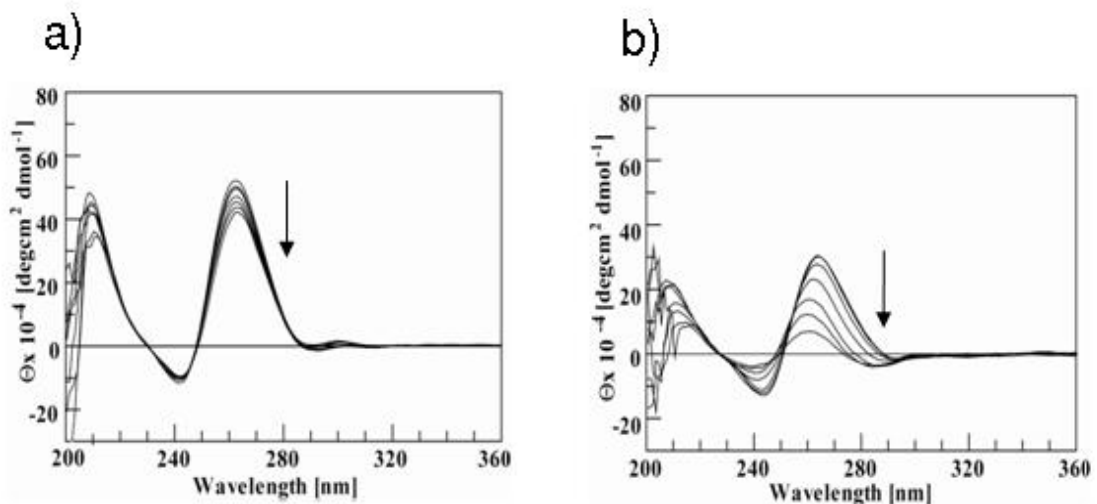
2.3 Risultati

2.3.1 Spettroscopia CD.

I campioni per gli esperimenti CD sono stati preparati ad una concentrazione finale di 20 μ M in quattro differenti buffer: tampone contenente potassio (TK: 50mM KCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.40) e tampone contenente sodio (TN: 50mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.40) con e senza magnesio (5mM MgCl₂).

Gli spettri CD registrati su campioni diversi mostrano un massimo dicroico a 262nm accompagnato da un minimo dicroico a 240nm, profilo caratteristico di una struttura quadruplex con filamenti paralleli. Al fine di valutare la stabilità termica di HTP sono stati registrati spettri CD incrementando la temperatura da 10 ad 80°C con un Δt di 10°C. Come

evidenziato dagli spettri riportati in **figura 2.4** la stabilità termica appare completamente diversa a seconda del tipo di ione presente in soluzione. In presenza di ione potassio la struttura quadruplex formata risulta essere molto stabile: infatti ad 80°C si assiste soltanto ad una lieve diminuzione della banda dicroica. Al contrario quando HTP è in tampone TN, alla temperatura di 80°C esso risulta completamente denaturato. L'aggiunta di 5mM di MgCl₂ sembra non avere effetti in presenza di tampone TK (dato non mostrato) ma contribuisce invece ad una parziale stabilizzazione in tampone TN (**fig. 2.4c**).



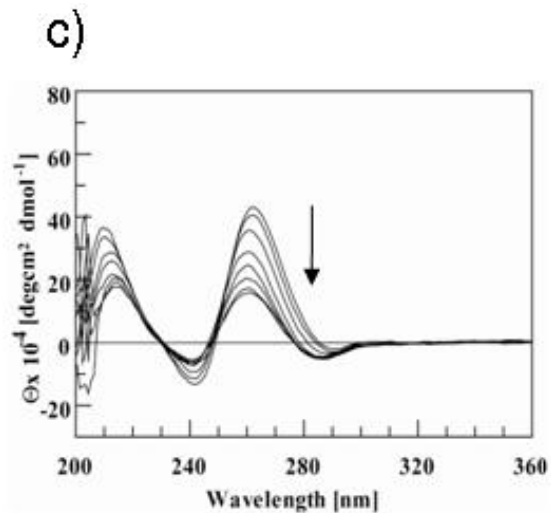


Figura 2.4: Spettri CD registrati per HTP (concentrazione finale 20mM) in diverse condizioni sperimentali: a) Tampone TK; b) tampone TN; c) tampone TN con 5mM $MgCl_2$.

2.3.2 Esperimenti elettroforetici

Per i PAGE è stato utilizzato un gel non denaturante al 20% e le corse sono state realizzate utilizzando sia tampone TK che TN con e senza magnesio (**fig. 2.5**). Come standard sono stati utilizzati due ONs con lunghezza simile a HTP, di cui $5'$ -T₄GTGATGCTCG₃- $3'$ è stato usato come riferimento per un singolo filamento non strutturato e $5'$ -G₃(T₂AG₃)₃- $3'$, come riferimento di una struttura quadruplex intramolecolare¹⁹. Quest'ultimo ON è caratterizzato da una buona mobilità elettroforetica grazie alla sua struttura compatta. Come evidente dalla figura, HTP da origine a più bande a diverso cammino elettroforetico di cui la più veloce risulta essere comunque più lenta della

banda corrispondente all'ON *'random coil'* di riferimento. Le bande corrispondenti a oligomeri a maggior peso molecolare presenti in TN sono caratteristiche di un'organizzazione di tipo polimerico. Queste ultime sono quasi totalmente assenti in presenza di TK. Il pattern elettroforetico rimane pressoché invariato quando si utilizzano tamponi TK e TN contenenti 5mM di MgCl₂.

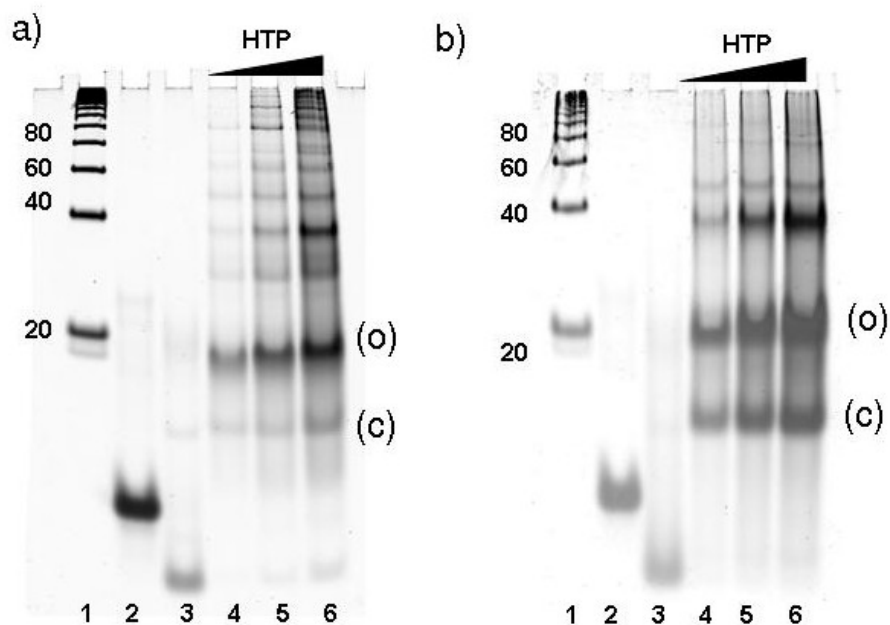


Figura 2.5 : Gel non denaturante al 20% in diverse condizioni sperimentali. a) tamponi TN; b) tamponi TK. Linea 1: filamento di dsDNA 20mer; linea 2: sequenza 5'-T₄GTGATGCTCG-3' usata come riferimento di un filamento random coil; linea 3: sequenza 5'-G₃(T₂AG₃)₃-3' formante una struttura quadruplex intramolecolare; linee 4, 5 e 6: HTP a concentrazioni rispettivamente di 10, 25 e 50 μM.

2.3.3 Microscopia a Forza Atomica (AFM)

Il differente comportamento di HTP in TK e in TN è stato confermato anche da esperimenti di microscopia a forza atomica (AFM). In **figura 2.6** sono riportate le immagini AFM di HTP depositato su un supporto anionico di MICA da campioni preparati in tampone TK e in TN. In entrambi i casi si osserva che HTP si auto-assembla in strutture lineari interrotte suggerendo la presenza di elementi ripetuti (REs).

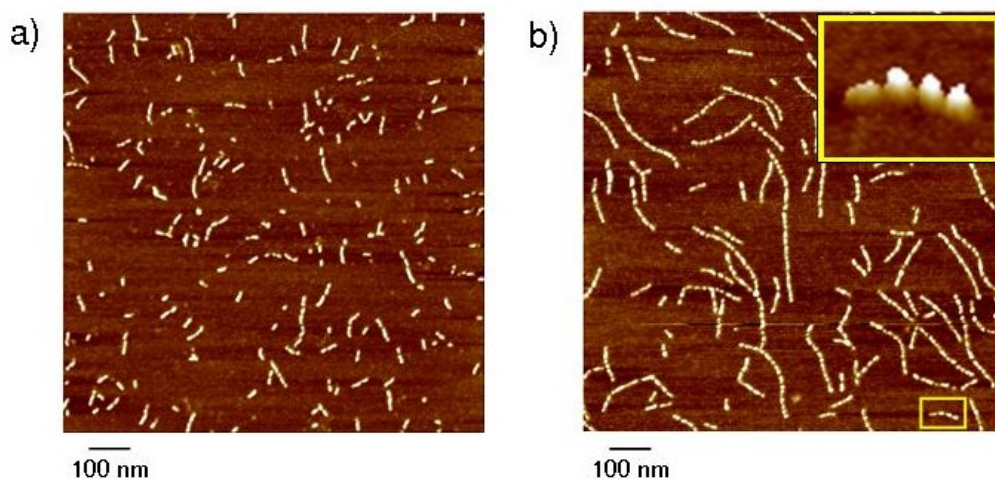


Figura 2.6: Immagine AFM delle sovrastrutture lineari formate da HTP a) TK contenente 5mM MgCl₂; b) TN contenente 5mM MgCl₂. L'inserto è un ingrandimento della struttura nel riquadro giallo.

L'organizzazione degli elementi ripetuti appare la stessa, infatti come mostrato in **figura 2.7** la distribuzione delle distanze tra gli elementi ripetute ha lo stesso *trend* sia in TK che in TN con un massimo a circa 15nm. In tampone TK, tuttavia, l'autoassemblaggio ha luogo meno efficacemente come evidente dal fatto che il numero di REs lungo

ciascuna struttura risulta più piccolo. Tale dato è in accordo con i dati ottenuti dagli esperimenti elettroforetici.

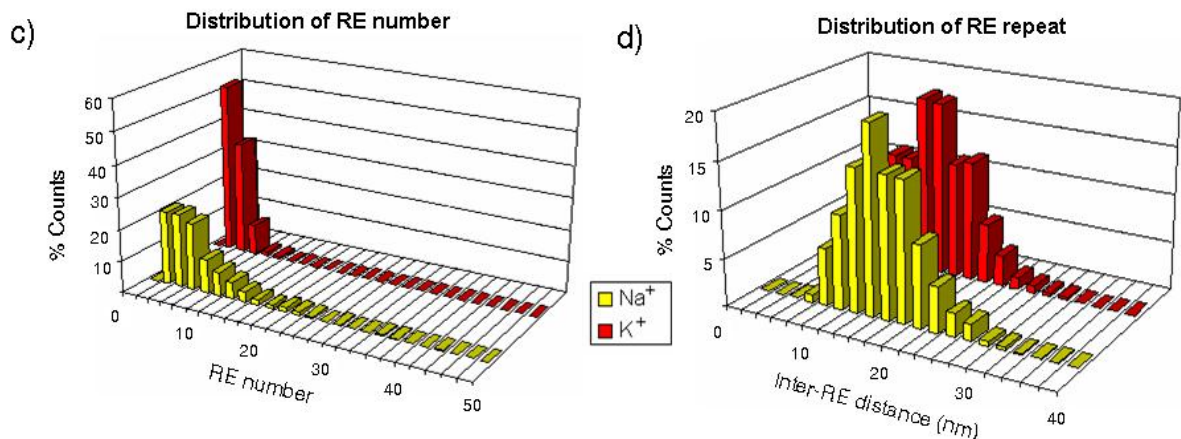


Figura 2.7: a) distribuzione degli elementi ripetuti (REs) lungo ciascuna sovrastruttura di HTP; b) istogramma della distribuzione delle distanze tra REs.

La larghezza degli RE è stata confrontata con quella di un DNA a doppia elica depositato anch'esso sulla MICA e usato come riferimento. In **figura 2.8b** è riportata una tipica sezione trasversale dalla quale si evince che l'altezza degli REs ($\sim 1.5\text{nm}$) è circa il doppio di quella del DNA ($\sim 0.6\text{nm}$). Queste dimensioni degli elementi ripetuti corrispondono a quelli di strutture quadruplex riportate in precedenti lavori^{20,21}.

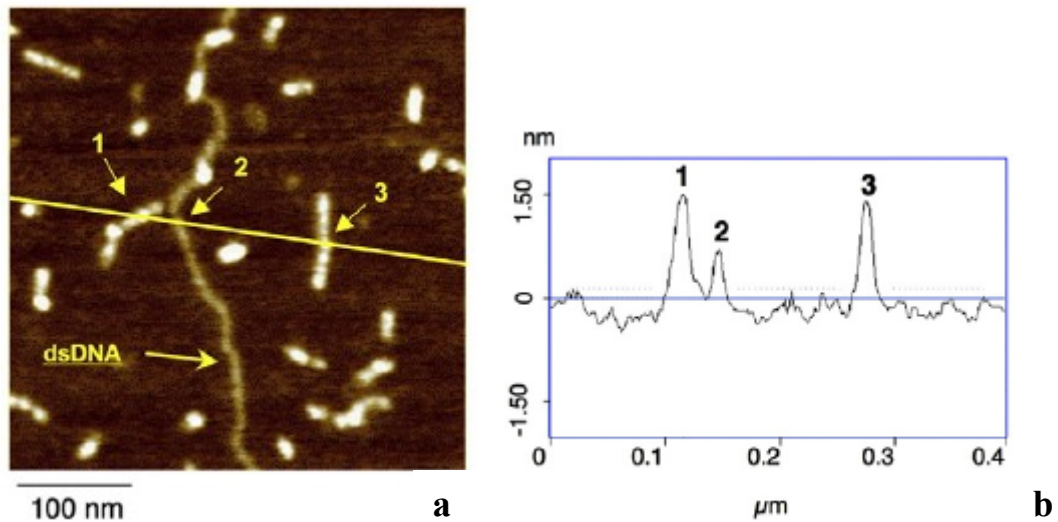


Figura 2.8: a) confronto tra le strutture formate da HTP e quelle formate da un frammento di DNA a doppio filamento; b) profilo delle altezze lungo il segmento giallo di fig 2.8a. Le particelle indicate con 1 e 3 corrispondono agli REs mentre 2 corrisponde al DNAd.

Le dimensioni degli REs sono assimilabili a quelle di un dimero di tetrameri e lo spazio vuoto tra un elemento ripetuto e l'altro ad un monomero o ad un dimero di tetrametri.

E'importante inoltre notare che tale distanza tra un elemento ripetuto e l'altro aumenta all'aumentare del numero di lavaggi effettuati (necessari per allontanare l'eccesso di sali e di materiale oligonucleotidico non legato) suggerendo che rimuovendo i sali si assiste ad un parziale desorbimento di HTP dalla MICA (**fig. 2.9 e 2.10**).

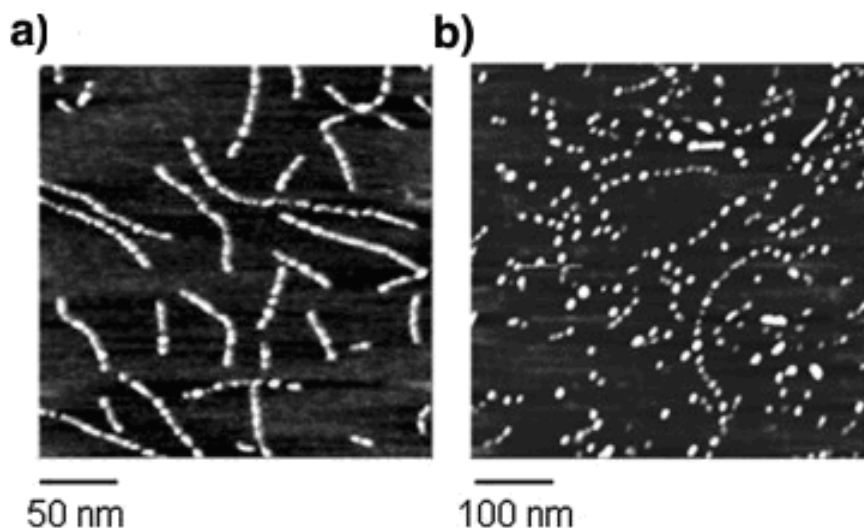


Figura 2.9: Immagini AFM di HTP ottenute incrementando la quantità di H_2O usata per i lavaggi della MICA. a) HTP in soluzione TN con 5mM $MgCl_2$ e supporto lavato con 500 μ l di acqua deionizzata; b) HTP in soluzione TN con 5mM $MgCl_2$ e supporto lavato con 3 ml di acqua deionizzata

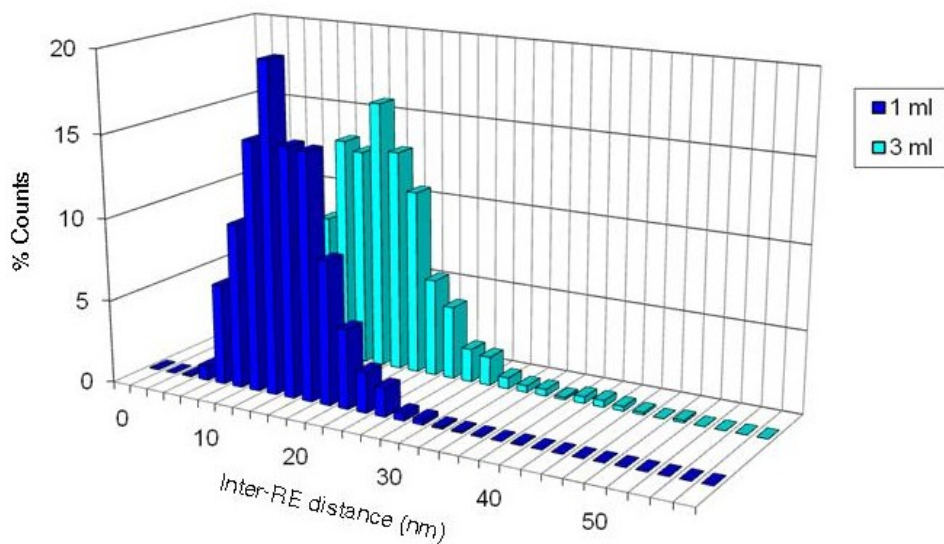


Figura 2.10: istogramma della distribuzione delle distanze tra gli RE. La distanza è 16.31 ± 4.41 nm nel caso del lavaggio con 1ml di H_2O e 19.51 ± 5.96 nm usando 3 ml di H_2O .

2.3.4 Modello di interazione intermolecolare

Alla luce dei risultati descritti è stato ipotizzato che HTP formi una struttura quadruplex di cui i *loop* di deossiadenosina non fanno parte. Tale modello è in buon accordo con le dimensioni degli REs che corrispondono all'impilamento di soli 13 quartetti. Il monomero può dare origine a due diverse forme di cui una chiusa responsabile della banda più veloce nel PAGE e una forma aperta con cammino elettroforetico più lento (**fig. 2.11**).

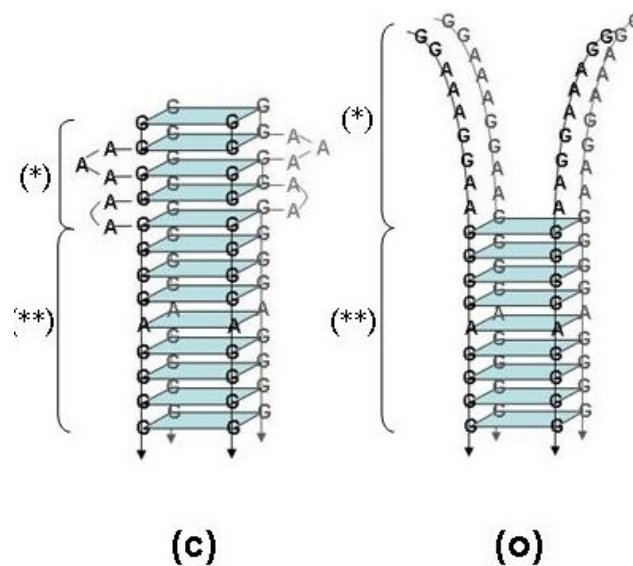


Figura 2.11: Modello della struttura proposta per HTP. Con (c) è indicata la forma chiusa nella quale le interazioni di stacking tra i quartetti è massima; con (o) è indicata la forma aperta.

Le bande ritardate nell'elettroforesi, i dati AFM gli esperimenti di denaturazione termica al CD suggeriscono un'organizzazione di tipo

polimerico. In particolare è stato elaborato un modello teorico di interazione molecolare.

Secondo tale modello l'ODN è in grado di formare una quadruplex tetramolecolare contenente tre *loops*, lungo ciascun filamento, costituiti da uno due o tre residui deossi-adenosinici. Tali quadruplex tetramolecolari sono a loro volta in grado di associarsi per costituire un polimero mediante interazione di *stacking* tra i quartetti di G posti ai terminali (**fig. 2.12**).

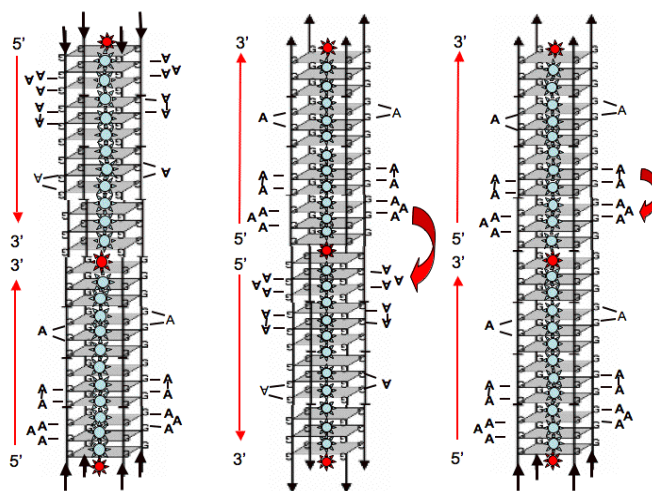


Figura 2.12: rappresentazione schematica delle interazioni 3'-3', 5'-5' e 5'-3' tra strutture quadruplex intermolecolari.

E' importante sottolineare la differenza esistente tra il modello di oligomerizzazione proposto e quello di interpretazione generale proposto per le *G-wire*, precedentemente riportato. Le *G-wire* danno, all'AFM, immagini di polimeri continui. Questo perché la *G-wire* è originata dalla

formazione di quadruplex parallele in cui un filamento partecipa contemporaneamente alla formazione di due unità strutturali successive, creando un impilamento ininterrotto di quartetti di G. Nel nostro caso, a causa della presenza di ripetizioni di sole due G al terminale 5' la formazione di classiche *G-wire* è impedita e l'oligomerizzazione deve necessariamente essere spiegata invocando un differente modello di interazione. Il modello che prevede una interazione di *stacking* tra i terminali di due unità di quadruplex parallele è quello che mostra una migliore interpretazione dei dati sperimentali ottenuti. Come è possibile evidenziare dalla figura 2.12 tre possibili interazioni possono consentire l'accrescimento del polimero: interazioni 5'-5', interazioni 3'-5' ed interazioni 3'-3'. Secondo calcoli teorici le interazioni che portano a valori minimi in energia libera sono quelle che prevedono *stacking* tra i terminali 5'-5'. Il modello prevede, infatti, che un contributo alla stabilizzazione della struttura è dovuto alla interazione tra i due *loop* di tre residui di dA mediante *stacking* o formazione di legami ad idrogeno. Ciò sottolinea il ruolo strutturale ma anche funzionale svolto dai *loop*.

2.3.5 Fosforilazione del terminale 5'

Al fine di validare tale modello di interazione, il terminale 5' di HTP è stato fosforilato. In questo modo la repulsione elettrostatica tra le cariche

negative dei gruppi fosfato sfavorisce l'interazione di tipo 5'-5'²² .

L'oligonucleotide 5'-fosforilato è stato ottenuto mediante sintetizzatore automatico, utilizzando nucleotidi 5' fosforammiditi e come supporto solido una resina CPG solfone. Il distacco dell'ODN dal supporto solido è stato ottenuto per trattamento a caldo con ammoniaca al 33% . Il trattamento con la base consente, mediante un meccanismo di β -eliminazione, il rilascio dell'ON recante all'estremità 5' il gruppo fosfato. In alternativa, la modifica al terminale 5' poteva essere realizzata trattando l'ON ancora ancorato al supporto solido con un appropriato agente fosforilante. Tale tipo di reazione, tuttavia, ha rese comprese tra il 50% ed il 60% e dal distacco successivo dal supporto solido si sarebbe ottenuta una miscela di ON fosforilato e non, con notevole complicazione delle procedure di purificazione.

Gli esperimenti CD condotti su P-5'HTP hanno mostrato che l'ON conserva il profilo di una struttura quadruplex con filamenti paralleli. Riscaldando i campioni da 10 ad 80°C in TN si assiste ad una totale destrutturazione dell'ON (**fig. 2.13a**). L'aggiunta di 5mM di MgCl₂, anche in questo caso, contribuisce a stabilizzare parzialmente la struttura formata in TN (**fig. 2.13b**). Al contrario in TK lo spettro registrato ad 80°C pur mostrando una diminuzione dell'intensità della banda dicroica a 265 nm ne conserva il profilo, indicando che gran parte della struttura quadruplex è ancora presente in soluzione a questa temperatura (**fig.**

2.13c). E' importante notare che i valori espresso in ellitticità molare, in tutte le condizioni utilizzate sono più bassi dei corrispondenti valori ottenuti per HTP.

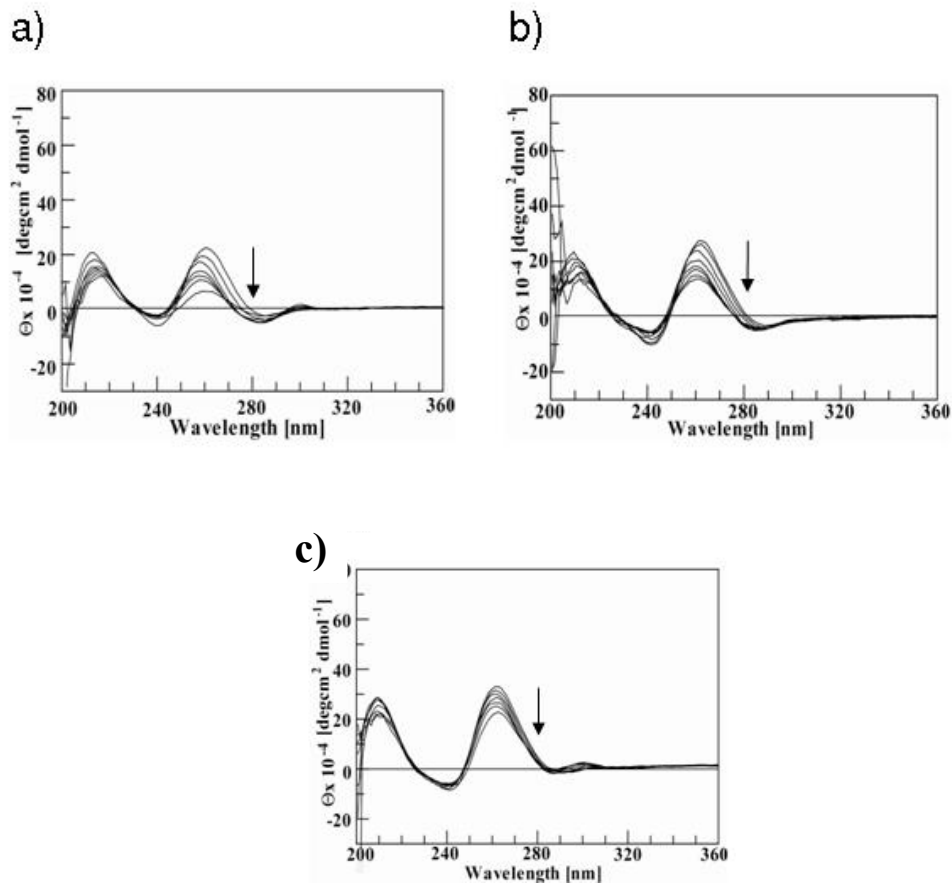


Figura 2.13: Spettri CD registrati per 5'-P-HTP (concentrazione finale $20\mu\text{M}$) in diverse condizioni sperimentali: a) Tampone TN; b) tampone TN con 5mM MgCl_2 ; c) tampone TK. Le frecce indicano l'incremento di temperatura da 10 ad 80°C con un Δt di 10°C .

Gli esperimenti elettroforetici sono stati condotti utilizzando le stesse condizioni già riportate per HTP. Come mostrato in **fig. 2.14** nel pozzetto corrispondente a P-5'HTP (linea 4) è presente un'unica banda a

basso P.M mentre risultano assenti le bande ad alto peso molecolare, attribuibili a specie di natura polimerica, visibili nel caso di HTP.

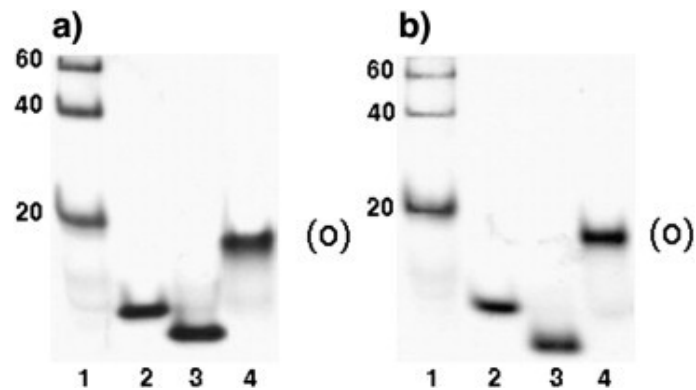


Figura 2.14: Gel non denaturante al 20% in diverse condizioni sperimentali. a) tampone TN; b) tampone potassio. Linea 1 : filamento di dsDNA 20mer; linea 2: sequenza 5'-T₄GTGATGCTCG-3' usata come riferimento di un filamento random coil; linea 3: sequenza 5'- G₃(T₂AG₃)₃-3' formante una struttura quadruplex intramolecolare; linea 4: P- 5'HTP

Analogamente anche gli esperimenti di AFM hanno confermato l'assenza di un'organizzazione sovrastrutturale per 5'-HTP (dato non mostrato).

2.3.6 Esperimenti di interferenza di metilazione e footprinting

Come prova diretta della formazione di strutture di tipo quadruplex sono stati condotti esperimenti di interferenza di metilazione e *footprinting*. E' noto infatti che se gli N7 di un quartetto di dG sono impegnati nella formazione di un legame ad idrogeno di tipo *Hoogsteen* essi non

subiscono reazione di alchilazione quando l'ON è trattato con un agente metilante²³. Dopo la reazione con l'agente l'alchilante, HTP è stato trattato con una soluzione di piridina per scindere i legami fosfodiesterici a livello delle basi metilate. La soluzione finale dopo specifici trattamenti atti ad eliminare l'eccesso di reattivi è stata cromatografata su gel di poliacrilammide contenente urea come agente denaturante. Tale saggio richiede che l'ON sia marcato all'estremità 5'. I risultati mostrati in **fig. 2.15** mostrano che in TK (con e senza 5mM di MgCl₂) solo le guanine poste ai terminali 3' sono coinvolte nella formazione dei quartetti, mentre la porzione all'estremità 5' non è strutturata.

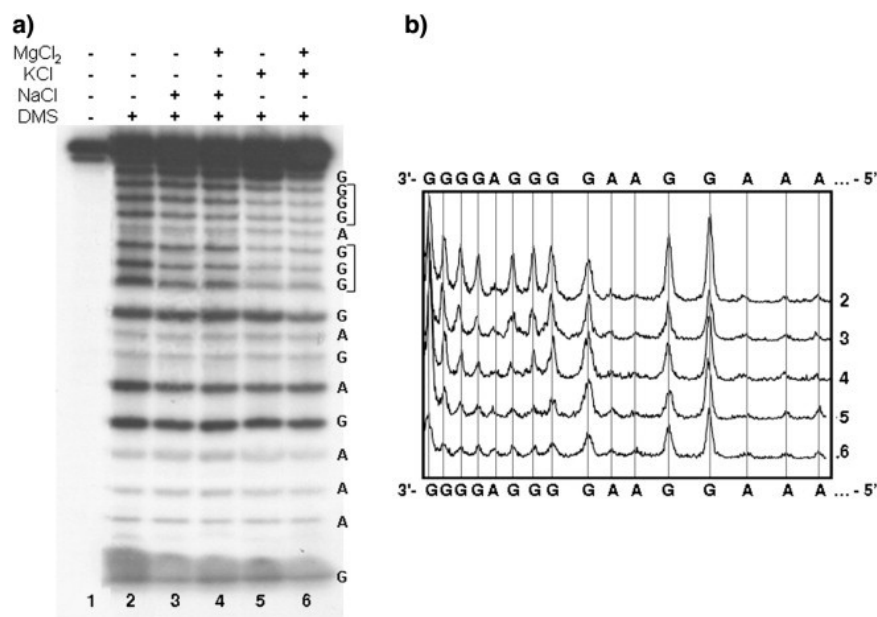


Figura 2.15: a) footprinting di ³²P 5'HTP. Linea 1: prima della reazione di metilazione; linea 2: in 20mM Tris-HCl pH 7.40; linea 3: in TN; linea 4: in TN contenente 5mM MgCl₂; linea 5: in TK; linea 6: in TK contenente 5mM MgCl₂. b) analisi densitometrica delle bande corrispondenti alle linee 2-6.

Infatti sei guanine, da G11 a G17, sono quasi inaccessibili alle metilazione mentre le restanti guanine sono uniformemente metilate come nella reazione di controllo (linea 2). Quando la reazione è condotta in TN (linea 3) il *pattern* è simile alla reazione di controllo. Il profilo densiometrico riferito al saggio condotto in TN contenente 5mM di MgCl₂ mostra una debole protezione delle guanine al terminale 3' in confronto al profilo densiometrico della reazione di controllo. Tali risultati sembrano indicare che la formazione di strutture quadruplex in TN è meno efficace che in TK. Ciò è in accordo con i dati della spettroscopia CD.

2.4 Conclusioni

Dai risultati ottenuti mediante la spettroscopia CD, gli esperimenti elettroforetici ed il saggio di interferenza di metilazione, è plausibile ipotizzare che la sequenza sia in grado di formare una struttura a quadrupla elica intramolecolare. In particolare noi proponiamo che HTP assuma una struttura altamente compatta con l'eccezione del *loop* di A che connette i due blocchi G4. Tale monomero può dare origine a due forme di cui una aperta ed una chiusa. La forma chiusa rappresenta il monomero di una organizzazione di tipo polimerico. La capacità di alcune quadruplex intermolecolari di auto-assemblarsi è nota da diverso

tempo. Come descritto nel cap.1, il termine “G-wires” fu coniato da Marsh ed Henderson per descrivere le sovrastrutture formate dalla sequenza $G_4T_2G_4$ mediante slittamento dei filamenti. Nel caso di HTP, il diverso comportamento esibito all’AFM in TK o TN richiede una spiegazione più complessa. E’ necessario infatti invocare l’esistenza di moduli di assemblaggio caratterizzati da diversa stabilità e, probabilmente da diversa capacità di interazione con la MICA. Delle tre possibili interazioni tra monomeri quella energeticamente più favorita coinvolge i terminali 5’-5’. In questo caso infatti i *loop* di deossadenosina contribuiscono a stabilizzare la struttura. I dati di AFM suggeriscono che le interazioni della macrostruttura con la superficie anionica di MICA non sono tutte equivalenti. Questo spiega perché lo spazio tra un elemento ripetuto e l’altro aumenta con l’aumentare del numero di lavaggi con H_2O . Il modello proposto è stato validato dall’analisi strutturale di P-5’HTP. La repulsione elettrostatica indotta dalla fosforilazione all’estremità 5’ sposta infatti l’equilibrio verso la forma aperta, l’unica identificata con il saggio di interferenza di metilazione e ne ostacola l’organizzazione sovramolecolare. Nonostante studi più approfonditi siano necessari per ottenere informazioni più dettagliate circa il processo di oligomerizzazione, i dati preliminari così raccolti ci consentono di trarre alcune importanti conclusioni. Innanzitutto la dimostrazione che la sequenza HTP esaminata, situata

vicino al sito di inizio della trascrizione di hTERT, sia in grado di formare quadruplex è estremamente importante da un punto di vista biologico in quanto la formazione di tali strutture non B-DNA potrebbe svolgere un ruolo fondamentale nei processi di regolazione della trascrizione. La formazione di strutture di tipo polimerico suscita un notevole interesse da un punto di vista delle nanotecnologie a DNA. In particolare è interessante notare che nel caso di HTP al contrario dei precedenti modelli riportati per le *G-wire*, la forza trainante per l'auto-assemblaggio è connessa alle interazioni di tipo “*end to end stacking*” tra i quartetti di dG. Tale forza, è stato recentemente dimostrato, guida anche la formazione di cristalli liquidi nel caso di piccoli frammenti di DNA a doppio filamento in condizioni di affollamento molecolare²⁴.

2.5 Procedure sperimentali

Sintesi degli oligomeri

Le sintesi sono state effettuate seguendo il protocollo classico dei fosforammiditi su sintetizzatore automatico Ciclone della Milligen. Per la sintesi di HTP sono stati utilizzati come supporto solido una resina CPG *high loading* funzionalizzata con dG e 50mg di ciascun nucleotide 5'-DMT-3'-fosforammidito sciolti in 1ml di ACN dry (amidite diluent). La sintesi di 5'-P HTP è stata condotta invece utilizzando 50 mg di supporto solido CPG solfone e nucleotidi 3'-DMT-5'-fosforammiditi. L'efficienza di ciascuno step di accoppiamento è stata valutata mediante misura spettrofotometrica del catione tritilico. Il distacco degli oligomeri dal supporto solido è stato effettuato mediante trattamento con una soluzione ammoniacale al 33% per 12 ore a 55°C. Il surnatante ed i lavaggi del supporto solido sono stati raccolti e seccati sotto vuoto.

Gli ONs sono stati purificati mediante HPLC utilizzando una colonna a scambio ionico Nucleogen Sax eluita con un gradiente lineare di 20mM di NaH₂PO₄, H₂O/ACN 80:20, pH 7.00, (eluente A) e 20mM di NaH₂PO₄ e 1M di NaCl, H₂O/ACN 80:20, pH 7.00 (eluente B), dallo 0% al 100% di B in 30', a temperatura ambiente.

Gli ONs purificati sono stato desalificati mediante cromatografia ad esclusione molecolare eseguita su BIOGEL P2-fine. La concentrazione degli oligomeri è stata determinata spettrofotometricamente a 260nm usando i seguenti coefficienti di estinzione molare: $15400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per dA e $11700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per dG. Ciascun oligonucleotide è stato poi caratterizzato mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

Dicroismo circolare

Gli spettri CD sono stati registrati da 200 a 360nm (velocità di scansione 100nm/min, risposta 16 sec, bandwidth 1nm). I campioni per i due ONs sono stati preparati a ad una concentrazione finale di 20 μ M in tamponi sodio (50mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄, pH 7.40) e in tampone potassio (50mM KCl, 10mM KH₂PO₄, pH 7.40) con o senza 5mM di MgCl₂. Sono state impiegate cellette in quarzo con cammino ottico 0.5cm. Ogni spettro è stato registrato dopo aver fatto stabilizzare il campione a ciascuna temperatura per 60 minuti ed è stato ottenuto come media di tre scansioni. Per ciascun campione lo spettro del tampone da solo è stato sottratto dalle media delle scansioni.

Esperimenti elettroforetici

Gli esperimenti sono stati realizzati usando gel non-denaturanti al 20% (19:1 acrilammide: N'N'-bis-metilenacrilamide) e tampone sodio

(89mM Acido Borico, 89mM Tris, 2mM EDTA, 10mM NaH₂PO₄, 0,1M NaCl o potassio (89mM Acido Borico, 89mM Tris, 2mM EDTA, 10mM KH₂PO₄, 0,1M KCl) come buffer di corsa. Le corse elettroforetiche sono state effettuate a 4°C per 17ore con un voltaggio costante di 150V. Le bande sono state visualizzate o per fluorescenza (per gli ONs non marcati) o mediante radioattività del ³²P. Nel primo caso i gel sono stati colorati con SYBR Green e visualizzati con Typhoon 9200 (Amersham Biosciences), mentre nell'ultimo caso i gel sono stati visualizzati mediante sistema Typhoon phosphor imager.

Microscopia a Forza Atomica

I campioni degli ONs (10µM in tampone sodio o potassio) sono stati diluiti 10 volte con il buffer di deposizione (tampone sodio o potassio contenente 5mM MgCl₂ per consentire l'adesione del DNA sulla superficie anionica di MICA). 10µl della soluzione 1µM di HTP così preparata sono stati depositati sulla MICA. Dopo 3 min la superficie anionica è stata delicatamente lavata con 1 ml di acqua deionizzata e asciugata sotto flusso di azoto. Le immagini sono state acquisite in modalità 'tapping mode' usando un Nanoscope IIIa equipaggiato con uno scanner pizelettrico di tipo E (Digital Instruments Inc., Santa Barbara, CA). Le immagini sono state acquisite con una velocità di scansione di 3-4 Hz. Un *software* appropriato ha permesso la raccolta delle immagini ed il

loro *'flattering'* necessario per la rimozione del rumore di fondo. Questo software ha consentito di ottenere le misure sia del DNA che la lunghezza degli elementi ripetuti. Poichè la dimensione delle particelle visualizzate con l'AFM dipende anche dal raggio di curvature della punta utilizzata, la reale lunghezza degli elementi ripetuti è stata calcolata utilizzando la seguente formula: $h_{RE} = h_D \cdot (w_{RE}/w_D)^2$ in cui h_{RE} è la reale dimensione, non nota, degli elementi ripetuti, h_D corrisponde a 2nm (ossia il diametro di una doppia elica di DNA coadsorbito sulla superficie ed utilizzato come riferimento) e w_{RE} e w_D sono le larghezze delle particelle visualizzate (RE e duplex rispettivamente).

Esperimento di interferenza di metilazione e footprinting

La metilazione di HTP marcato con ^{32}P è stata ottenuta mediante trattamento con dimetilsolfato 1M a temperatura ambiente per 2min. La reazione è stata interrotta con l'aggiunta di 4 μl di 2 mercapto-etanolo 7M. I campioni sono stati precipitati con sodio acetato ed etanolo a -80°C per 1h; dopodiché sono stati trattati con piperidina al 10% a 85°C per 15min e la reazione interrotta raffreddando a 0°C per altri 15min. I campioni sono stati essiccati sottovuoto in centrifuga Savant e sciolti in 50 μl di acqua. Tale operazione è stata ripetuta 3 volte.

I campioni sono stati poi ridisciolti in una miscela contenente il 98% di formammide, 10 mM EDTA pH 8.0, xylene cyanol (1 mg/ml) e blu di

bromofenolo (1 mg/ml) e denaturati a 95°C per 15min, raffreddati in ghiaccio per 10 min e sottoposti ad elettroforesi su gel denaturante al 15% contenente UREA 8M. Il gel è stato fatto correre a 50W per 90min, asciugato a ed auto radiografato con Typhoon Phosphor Imager.

Riferimenti bibliografici

- ¹ Rhodes, D.; Fairall, I.; Simonsson, T.; Court, L.; Chapman, L. *EMBO Rep.* **3**, **2002**, 1139-1145
- ² Zakian, V.A. *Science*, **1995**, *270*, 1601-1607
- ³ Price, C. and Jacob, N.K. *Molecular Cell*, **2005**, *18*, 147-148
- ⁴ Blackburn, E.H. *FEBS Lett.*, **2005**, *579*, 859-862
- ⁵ O'Reilly, M.O.; Teichmann, S.A.; Rhodes, D. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1999**, *9*, 56-65
- ⁶ Greider, C.; Blackburn, E.H. *Cell.*, **1987**, *51*, 887-898
- ⁷ Harrington, L.; McPhail, T.; Mar, V.; Zhou, W.; Oulton, R.; Bass, M.B.; Arruda, L.; Robinson, M.O. *Science*, **1997**, *275*, 073-977
- ⁸ Klapper, W.; Parwaresch, R.; Krupp, G. *Mech. Ageing Dev.*, **2001**, *122*, 695-712
- ⁹ Strachan, T.; Read, A.P. *Human Molecular Genetics 3*, **2004**, Ch. 17
- ¹⁰ Zhang, X.; Mar, V.; Zhou, W.; Harrington, L.; Robinson, M.O. *Genes Dev.* , **1999**, *13*, 2388-2399
- ¹¹ Kyo, S.; Takakura, M.; Kanaya, T.; Zhuo, W.; Fujimoto, K.; Nishio, Y.; Orimo, A.; Inoue, M. *Cancer Res.*, **1999**, *59*, 5917-5921
- ¹² Greenberg, R.A.; O'Hagan, R.C.; Deng, H.; Xiao, Q.; Hann, S.R.; Adams, R.R.; Lichtsteiner, S.; Chin, L.; Morin, G.B.; DePinho, R.A. *Oncogene*, **1999**, *18*, 1219-1226

- ¹³ Pascolo, E., Wenz, C.; Lingner, J.; Huel, N.; Priepke, H.; Kauffmann, I.; Garin-Chesa, P.; Rettig, W.J.; Damm, K.; Schnapp, A. *J.Biol. Chem.*, **2002**, 277, 15566-15572.
- ¹⁴ Mergny, J.L.; Riou, J.F.; Mailliet, P.; Teulade-Richou, M.P.; Gilson, E. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30, 839-865
- ¹⁵ Pisano, S.; Varra, M.; Micheli, M.; Coppola, T.; De Santis, P.; Mayol, L.; Savino, M. *Biophys. Chem.* **2008**, 135, 159-163
- ¹⁶ Luger, K.; Mader, A.W.; Richmond, R.K; Sargent, D.F.; Richmond, T.J. *Nature* , **1997**, 389, 251–260
- ¹⁷ Anselmi, C.; Bocchinfuso, G.; De Santis, P.; Savino, M.; Scipioni, A. *J. Mol. Biol.* , 1999, **286** , 1293–1301
- ⁸ Anselmi, C.; De Santis, P.; Paparcone, R.; Savino, M.; Scipioni, A. *Biophys. Chemist.* , **2002**, 95, 23–47
- ¹⁹ Neidle, S.; Parkinson, G.N. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2003**, 13, 275-283
- ²⁰ Marsh, T.C.; Vesenka, J.; Henderson, E. *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23, 696-700
- ²¹ Cohen, H.; Sapir, T.; Borovok, N.; Molotosky, T.; Di Felice, R.; Kotlyar, A.B.; Porath, D.M. *Nano Lett*, **2007**, 7, 981-986
- ²² Uddin, M.K., Kato, Y.; Takagi, Y.; Mikuma, T; Taira, K. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 4618-4629
- ²³ Sen, D.; Gilbert, W. *Nature*, **1988**, 334, 364-366.

²⁴ Nakata, M.; Zanchetta, G.; Chapman, B.D.; Jones, C.D.; Cross, J.O.; Pindak, R.; Bellini, T.; Clark, N. *Science*, **2007**, 318, 1276-1279

CAPITOLO 3

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI NUOVI ANALOGHI MODIFICATI DEL TBA

3.1 Introduzione

3.1.1 Coagulazione e ruolo della trombina

L'emostasi è l'insieme dei meccanismi fisiologici volti a garantire la fluidità del sangue e nello stesso tempo ad evitarne la fuoriuscita dall'albero vascolare in caso di trauma¹.

In seguito a danno tissutale vengono attivati una serie di meccanismi fisiologici di difesa, tra cui quello più evoluto e perfezionato è il processo di "coagulazione", il cui risultato è un cambiamento dello stato chimico-fisico del sangue, da fluido a solido, formazione del "coagulo" ed arresto della fuoriuscita di sangue stesso. Le reazioni caratteristiche della fase coagulativa prevedono l'assemblaggio di un complesso composto da un enzima (fattore della coagulazione attivato) da un substrato (forma pro-enzimatica di un fattore della coagulazione), e un co-fattore (acceleratore di reazione). Questi tre componenti vengono assemblati su un complesso fosfolipidico presente sulla membrana delle piastrine attivate o sull'endotelio e sono tenuti insieme da ioni calcio:

questo fa sì che l'intero processo rimanga localizzato nelle sedi opportune (**fig. 3.1**).

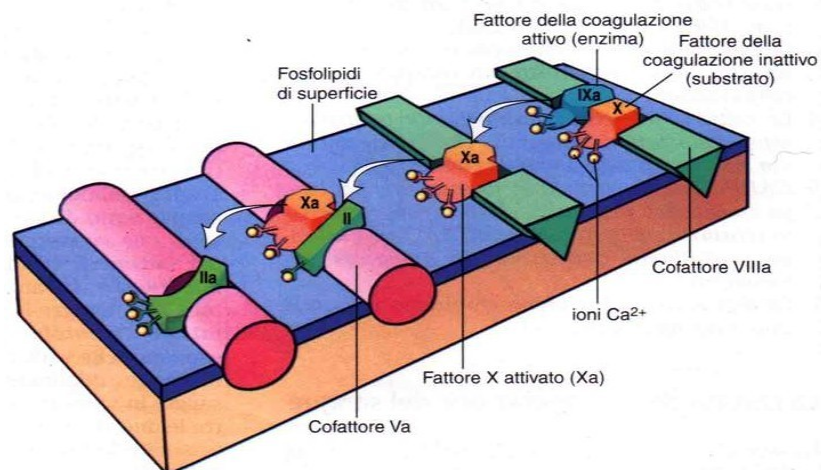


Figura 3.1: Schema dell'assemblaggio del complesso enzima/cofattore/substrato su una superficie fosfolipidica in presenza di ioni calcio.

Il meccanismo della coagulazione *in vivo* deriva dalla complessa interazione tra le vie estrinseca ed intrinseca, che convergono nella via comune, in cui i fini meccanismi di *feedback* portano all'amplificazione del segnale iniziale (**fig. 3.2**).

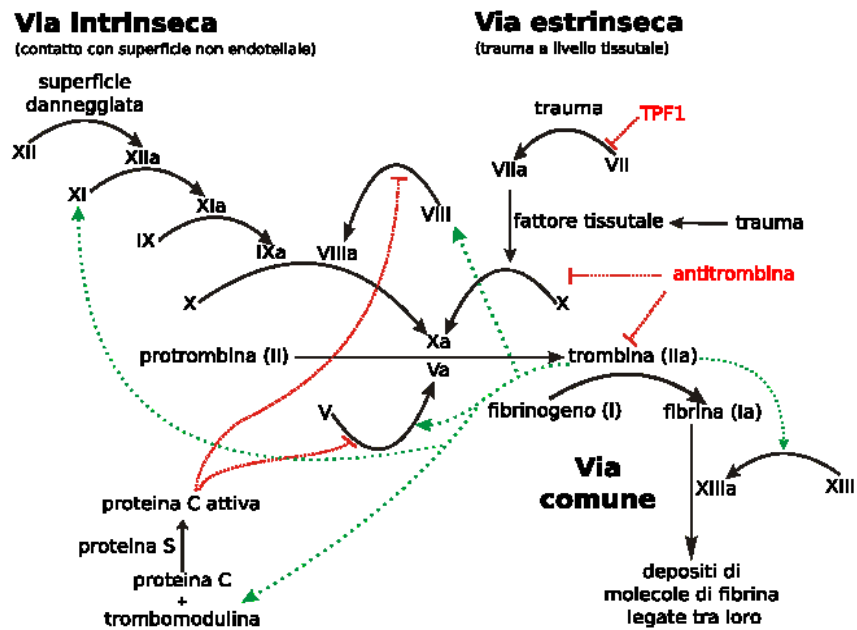


Figura 3.2: Schema delle vie intrinseca ed estrinseca della cascata coagulativa.

Diverse proteine circolanti interagiscono in una serie di reazioni proteolitiche a catena per cui, ad ogni tappa un fattore zimogenico della coagulazione va incontro a proteolisi parziale trasformandosi in una proteasi attiva. Quest'ultima funge a sua volta da attivatore per il successivo fattore della coagulazione. La via intrinseca e la via estrinseca convergono nelle fasi finali del processo coagulativo portando alla trasformazione del fibrinogeno solubile in fibrina insolubile ad opera della trombina.

L'iniziatore principale del processo di coagulazione (via intrinseca) è rappresentato dal fattore tissutale (TF) il quale viene esposto sull'

endotelio danneggiato. Ad esso si lega il fattore VIIa ed il complesso a sua volta attiva i fattori IX e X con conseguente formazione di trombina. La trombina è una glicoproteina appartenente alla classe delle serino proteasi che gioca un ruolo centrale nell'omeostasi cellulare e nei processi di coagulazione del sangue². La prima analisi di struttura cristallografica di una molecola di α -trombina umana, risalente al 1989, ha fornito una descrizione dettagliata della sua struttura interna ma in particolare ha identificato importanti regioni implicate in varie interazioni intermolecolari³.

L' α -trombina ha una massa di 32.7 Kdal ed è costituita da una catena A (36 amminoacidi) e una catena B (259 amminoacidi) legate attraverso un ponte disolfuro tra il residuo di Cys¹ della prima catena e il residuo di Cys¹²² della seconda. Inoltre presenta altri tre ponti disolfuro localizzati nella catena B che le fanno assumere il tipico ripiegamento delle serino proteasi (**fig. 3.3**). La cristallografia a raggi X ha mostrato che la superficie della trombina è caratterizzata da “fenditure” e “asperità” probabilmente responsabili della grossa varietà di funzioni biologiche di questo enzima.

Un elemento particolare della trombina è la sua pronunciata distribuzione di carica⁴. Tre zone superficiali contigue, due con un potenziale positivo e una negativa risultano essere di particolare interesse. La prima zona caricata positivamente si estende fino alla

superficie convessa della trombina, dove si trova la “fenditura” del sito attivo. Questa prima zona, a causa della sua capacità di legare il fibrinogeno, è oggi più conosciuta come “esosito I anionico di *binding*” o “esosito legante il fibrinogeno”. La seconda zona superficiale, caricata positivamente, con un campo elettrostatico positivo più forte del precedente, si estende a partire dall’elica intermedia fino al C-terminale della trombina. A causa di questa interazione con l’eparina, questa zona caricata positivamente, è stata definita “sito di *binding* per l’eparina” o anche “esosito II”⁵. La trombina non solo è necessaria per l’attivazione del fibrinogeno ma svolge un ruolo chiave in diverse tappe del processo emostatico con effetti sia *pro-coagulanti*, attivando i fattori V, VIII e XIII e la stessa conversione del fibrinogeno in fibrina, che *anti-coagulanti*, interagendo con la Proteina C^{6,7}. La capacità della trombina di passare dalla forma pro-coagulante alla forma anti-coagulante, nota come “paradosso della trombina”, suggerisce l’ipotesi di una modulazione allosterica alla base della funzionalità della proteina stessa. Si parla quindi di proteina “allosterica”⁸, la cui funzione è legata all’equilibrio tra due conformazioni, dette *slow* (lenta) e *fast* (veloce), in base alla rapidità con la quale catalizzano la reazione di proteolisi del fibrinogeno^{9,10}. La transizione allosterica dell’enzima è ulteriormente modulata dall’interazione con lo ione Na⁺, che stabilizza la forma procoagulante (*fast*), innescando la fase della coagulazione. Infatti, la

forma *fast* mostra una maggiore affinità per il fibrinogeno, per i recettori cellulari PAR-1 (type-1 Protease-Activated Receptor) e per l'ATIII (antitrombina III); la forma *slow*, invece, ha un'affinità minore verso i fattori pro-coagulanti ed affinità invariata per la Proteina C.

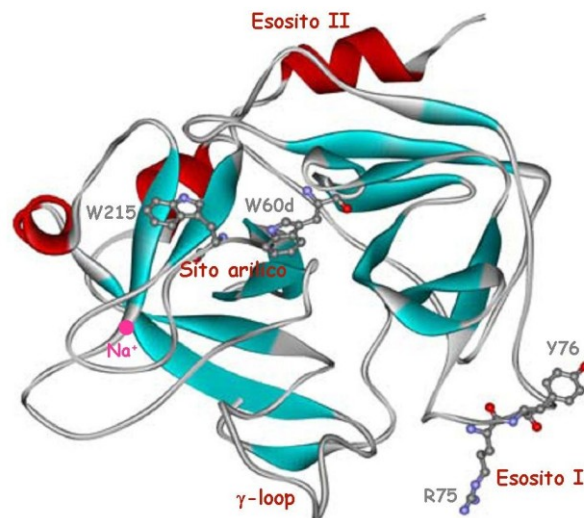


Figura 3.3: Catena pesante della α -trombina umana nella forma *fast*.

3.1.2 Inibitori della trombina

La trombina può essere inibita bloccando il sito attivo oppure l'esosito di *binding* per il fibrinogeno. L'esosito I è un elemento importante per il riconoscimento di substrati, cofattori e inibitori della trombina.

I farmaci anticoagulanti tuttora utilizzati possono essere classificati in base al loro meccanismo d'azione in:

-Inibitori indiretti della trombina

-Inibitori diretti della trombina

Tra gli inibitori indiretti della trombina troviamo l'eparina (**fig. 3.4**) la cui azione è dovuta non al legame diretto con la trombina bensì alla sua interazione con l'antitrombina (ATIII)¹¹. Essa consiste in una miscela di mucopolisaccaridi solforati e agisce catalizzando la reazione antitrombina-proteasi senza essere consumata di modo che, una volta formatosi il complesso, viene nuovamente resa disponibile per legarsi a nuova antitrombina.

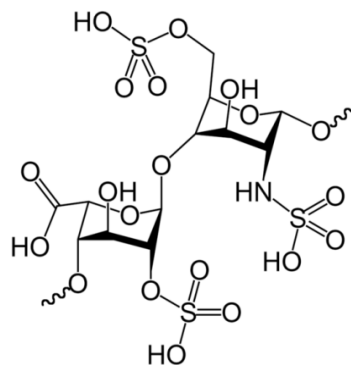


Figura 3.4: Struttura dell'eparina

L'eparina presenta tuttavia una serie di limitazioni. Innanzitutto, essendo un farmaco di origine animale deve essere usato con cautela nei soggetti allergici. Inoltre, poiché la sua azione è strettamente dipendente dalla presenza dell'ATIII, non può essere utilizzata nei casi in cui vi è diminuzione o consumo eccessivo dei livelli plasmatici di tale proteina come avviene nella coagulazione intravasale disseminata. Il

sanguinamento, la trombocitopenia transitoria (25% dei casi) o grave (5% dei casi) rappresentano altri effetti indesiderati.

Gli inibitori diretti della trombina presentano diversi vantaggi rispetto all'eparina tra cui, non essendovi interazione con altre proteine plasmatiche, una risposta anticoagulante più prevedibile. Tra gli inibitori diretti della trombina vi è l'irudina, una piccola proteina di 65 amminoacidi prodotta dalle ghiandole salivari di *Hirudo medicinalis*, attualmente disponibile grazie a tecnologie del DNA ricombinante¹².

L'analisi della struttura cristallina del complesso¹³ ha dimostrato che l'irudina interagisce con l'enzima per un'area molto estesa. In particolare i domini ammino-terminali interagiscono saldamente con il sito catalitico della trombina e con il dominio carbossi terminale dell'esosito I. La natura quasi irreversibile di questo complesso rappresenta uno dei limiti nell'applicazione dell'irudina nella pratica clinica in quanto nessun antidoto è disponibile in caso di emorragia.

Considerato che la formazione di trombi venosi o arteriosi rappresenta oggi una delle principali cause di morte nei paesi industrializzati^{14,15,16}, e visti i limiti delle molecole oggi in uso per bloccare la formazione del coagulo, la ricerca di nuove strategie anticoagulanti è attualmente di grande interesse.

Tra le molecole che hanno attirato un forte interesse vi sono gli aptameri i quali vengono classificati tra gli inibitori diretti della trombina.

3.1.3 Aptameri e SELEX

Gli aptameri (dalla parola latina “*aptus*” cioè “adatte”) sono molecole di acidi nucleici, a singolo o a doppio filamento, che legano specificamente una varietà di molecole biologicamente importanti. Essi hanno una notevole propensione ad assumere diversi motivi secondari e terziari con differenti conformazioni¹⁷. Per tale ragione non esistono restrizioni riguardo al tipo di molecola che un aptamero può riconoscere.

Gli aptameri sono isolati da librerie combinatoriali mediante un processo chiamato SELEX (*Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment*)^{18,19}. Tale processo consta di 2 fasi:

- Selezione degli aptameri aventi affinità per un bersaglio scelto
- Amplificazione degli aptameri .

Il processo comincia con la sintesi di librerie combinatoriali di acidi nucleici a singolo filamento. Gli oligonucleotidi sintetizzati per la libreria sono costituiti da una regione a sequenza *random* affiancata da regioni a sequenza fissa che funzionano come siti di legame per i *primer*. Poiché la lunghezza della sequenza *random* è normalmente di 20-40 bp, si creano librerie con più di 10^{15} differenti sequenze.

La libreria è quindi incubata con la molecola bersaglio in condizioni opportune per il legame. Dopo il ciclo di *binding* gli acidi nucleici non legati vengono separati da quelli legati i quali sono eluiti via dal bersaglio ed amplificati mediante PCR. Ogni ciclo consta quindi di selezione e amplificazione: una tipica procedura SELEX richiede 8-12 cicli per l'isolamento di acidi nucleici in grado di legare specificamente un *target* (**fig. 3.5**). Successivamente gli acidi nucleici che hanno mostrato affinità per il bersaglio possono essere facilmente prodotti mediante sintesi chimica o enzimatica e allo stesso modo possono essere introdotte delle modifiche aggiuntive per migliorarne l'attività terapeutica o l'applicazione diagnostica.

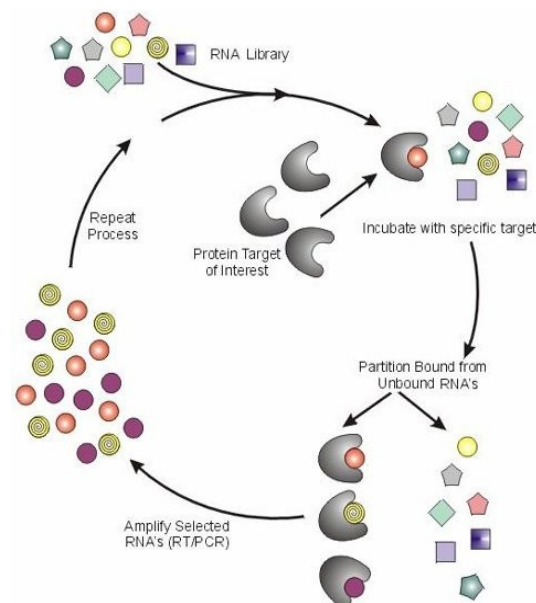


Figura 3.5: Ciclo di selezione e amplificazione del processo di SELEX

La SELEX non è l'unico metodo di selezione degli aptameri, esistono infatti dei metodi "non SELEX" quali, ad esempio, l'elettroforesi capillare, che si è rivelata un ottimo approccio per la separazione di aptameri a partire da un *pool* di molecole *random*. Uno dei più significativi vantaggi di questo metodo non SELEX, è la sua possibilità di applicazione a librerie che non possono, o che mostrano difficoltà ad essere amplificate.

L'impiego degli aptameri in campo terapeutico è subordinato ad alcuni requisiti essenziali. In primo luogo, essi devono interagire saldamente e specificamente con le molecole bersaglio. L'elevata grandezza ed estensione superficiale degli acidi nucleici rappresenta un vantaggio notevole, in quanto essi possono dar luogo ad un numero elevato di interazioni con il bersaglio rispetto a molecole di piccole dimensioni e, di conseguenza, è richiesta una concentrazione più bassa per un'efficiente inibizione rispetto ad esempio ai farmaci tradizionali. Inoltre l'estensione superficiale conferisce agli aptameri la capacità di discriminare tra macromolecole strutturalmente molto simili tra di loro. In secondo luogo il riconoscimento specifico deve essere accompagnato dall'inibizione della funzione biologica della molecola bersaglio; in tal senso sono stati descritti aptameri, formati da oligonucleotidi fosforotioati (17mer), in grado di inibire *in vitro* la trascrittasi inversa del

virus HIV²⁰ ed anche aptameri a RNA in grado di riconoscere ed inibire il recettore di un fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF)²¹.

In terzo luogo gli aptameri devono essere anche in grado di modulare il metabolismo cellulare associato al bersaglio; a tal proposito sono stati selezionati aptameri in grado di inibire il rilascio di serotonina mediato dalle IgE da parte di cellule in colture tissutali²².

Gli aptameri possono anche essere inoltre usati come *decoy* (esca) o come strumenti diagnostici, ad esempio come biosensori. Il loro utilizzo in questo campo deriva dall'abilità di alcuni aptameri di subire un cambiamento conformazionale non appena legato il sito di *binding*. Combinata con la loro alta affinità e specificità per il bersaglio, questi possono essere efficientemente usati per produrre segnali in risposta all'attacco di un ligando.

3.1.4 Thrombin Binding Aptamer (TBA)

Il TBA è un oligodeossinucleotide costituito da 15 nucleotidi (15mer), avente sequenza 5' $\text{d}(\text{GGTTGGTGTGGTTGG})$ 3', identificato nel 1992 mediante processo SELEX²³. Studi *in vitro* hanno mostrato che il TBA usato in concentrazioni nanomolari, è in grado di prolungare il tempo di coagulazione da 25 a 43 secondi nel plasma umano²⁴. Nonostante la sua emivita sia di 1-2min, studi condotti su *bypass* cardiopolmonare di cani

hanno dimostrato che esso è in grado di mantenere la circolazione extracorporea evitando continue infusioni²⁵.

La struttura tridimensionale del TBA è stata determinata mediante esperimenti NMR^{26,27}. Feigon e coll.²⁸ dimostrarono che il TBA forma una struttura quadruplex monomolecolare tipo sedia costituita da due tetradi di G connesse da due *loop* laterali TT e da un *loop* grande centrale TGT (**fig 3.6a**). Vorlickova e coll.²⁹ hanno invece recentemente provato mediante esperimenti elettroforetici e spettroscopia CD che il TBA forma una struttura bimolecolare (**fig. 3.6b**) ponendo quindi nuove questioni circa i meccanismi struttura-attività. Infatti tali meccanismi sono stati fino ad oggi riferiti ad un modello TBA-trombina nel quale l'aptamero adottava una struttura monomerica.

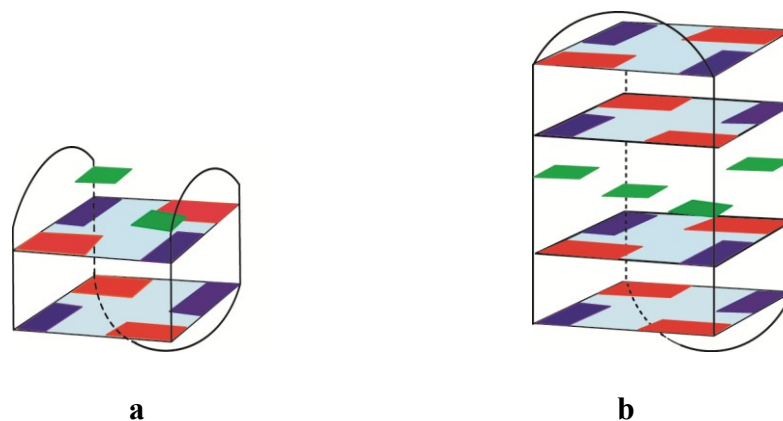


Figura 3.6: rappresentazione schematica della possibili strutture del TBA: a) quadruplex monomolecolare; b) quadruplex bimolecolare simmetrica. In entrambe le rappresentazioni i riquadri rossi e blu indicano le basi G rispettivamente in conformazione *syn* o *anti*. I riquadri verdi rappresentano invece le basi T4 e T13 unite da legame ad idrogeno e stackizzate sul quartetto adiacente.

3.2 Obiettivi: *analoghi del TBA contenenti il nucleoside aciclico N1-(3-idrossi-2-idrossimetil-2-metilpropil)timidina*

Alla luce dei dati presenti in letteratura e con l'obiettivo di ottenere nuove informazioni circa il processo di ricognizione TBA-trombina abbiamo intrapreso uno studio volto alla sintesi, alla caratterizzazione strutturale e biologica di analoghi modificati del TBA.

In una prima serie di analoghi sintetizzati, le timidine dei *loop* sono state sostituite, una alla volta, con il nucleoside aciclico N1-(3-idrossi-2-idrossimetil-2-metilpropil)timina (indicato con T*)³⁰. Precedenti lavori nei quali erano state apportate modifiche ai *loop* avevano infatti mostrato che oltre ai quartetti di G anche i *loop* stessi sono coinvolti nei processi di riconoscimento^{31,32,33}.

Gli ONs contenenti nucleosidi aciclici sono di notevole interesse per diversi motivi, tra cui la loro minore suscettibilità alle nucleasi^{34,35,36}. Appare inoltre molto probabile che nucleosidi aciclici siano stati i precursori degli acidi nucleici in epoca prebiotica³⁷.

Le differenze strutturali tra il nucleoside aciclico e la timidina sono riportate in **fig. 3.7** e possono essere così riassunte: a) la distanza tra la base timina e il gruppo fosfato è accorciata di un legame; b) il metile rappresenta una componente idrofobica; c) la presenza di un carbonio prochirale fa sì che il *linker* diventi un centro chirale quando il nucleotide è inserito in una sequenza.

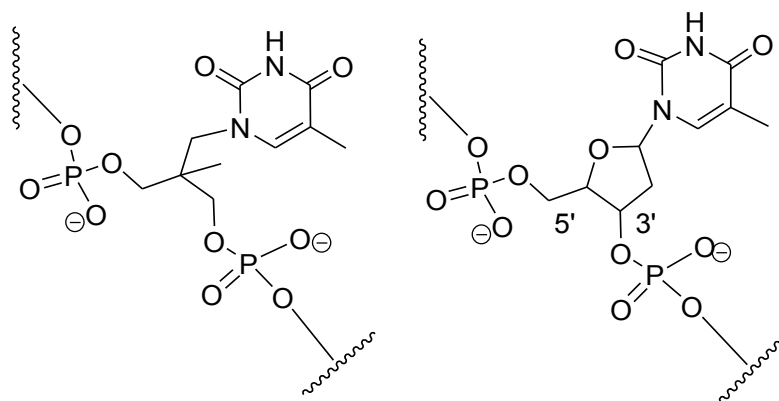


Figura 3.7: Differenze strutturali tra il nucleotide aciclico (sinistra) e la timidina (destra).

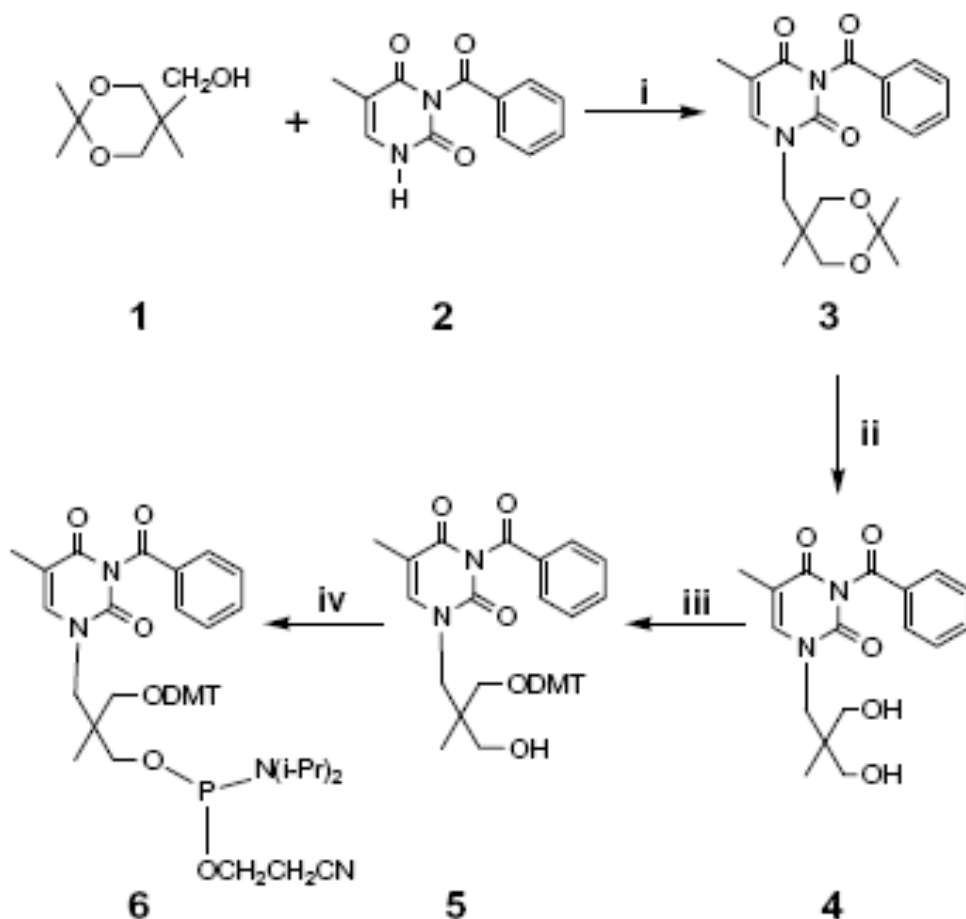
La capacità delle sequenze sintetizzate di assumere conformazioni quadruplex è stata valutata mediante spettroscopia ^1H NMR, UV e CD. Inoltre le proprietà farmacologiche di inibizione della trombina sono state valutate mediante saggio del PT e saggio di coagulazione su fibrinogeno purificato.

3.3 Risultati

3.3.1 Sintesi

La sintesi del derivato aciclico è riportata nello **schema 3.1**. La reazione chiave è rappresentata dalla condensazione di Mitsunobu^{38,39} tra il 5-idrossimetil-2,2,5 trimetil-1,3 diossano (**1**) e l'N-3-benzoil timina (**2**).

Sia la base che il *linker* sono state preventivamente sottoposti a reazioni di protezione.



Schema 3.1: Sintesi del nucleoside fosforamidito (T^*). Reagenti: i) **1** (9mmol), **2** (4mmol), PPh_3 (6mmol), DtBAD (6mmol), diossano (25ml); ii) **3** (10mmol), DOWEX (30mmol), $H_2O/MeOH$ (1:9 v:v, 50ml), iii) **4** (8mmol), DMTCl (2mmol), DMAP (0.4mmol), Py (32ml); iv) **5** (4mmol), DIPEA (16mmol), 2-cianoetil-diisopropil-clorofosforamidito (2mmol), DCM (35ml).

Il prodotto commercialmente disponibile 1,1,1-tris (idrossimetil)etano è stato convertito in 5-idrossimetil-2,2,5-trimetil-1,3-diossano mediante reazione con 2,2-dimetossi-propano in presenza di piridinio *p*-toluen solfonato (PPTS) come catalizzatore.

La protezione selettiva della timina in posizione N³ è stata ottenuta seguendo, in un primo momento, la procedura descritta da Reese⁴⁰. Quest'ultima consiste nella conversione della timina nel derivato N¹,N³ dibenzoilato per reazione con cloruro di benzoile e una miscela acetonitrile-piridina come solvente. Il prodotto disostituito dopo un rapido trattamento di idrolisi con una soluzione di carbonato di sodio fornisce il prodotto N³ benzoilato con scarse rese. Con l'obiettivo di superare tale difficoltà abbiamo apportato piccole modifiche al protocollo descritto. In particolare abbiamo riscontrato che prolungando il tempo di reazione si ottiene una maggiore quantità di prodotto N³ benzoilato probabilmente per decomposizione del derivato disostituito. In particolare le rese massime sono state ottenute dopo un tempo di reazione di circa 72 ore.

La reazione di Mitsunobu tra i derivati **1** e **2** è stata condotta utilizzando trifenilfosfina e di-*tert*-butil-azodicarbossilato come agenti di *coupling* e diossano come solvente. Il prodotto di condensazione **3** è stato quindi trattato su una resina scambiatrice di cationi di tipo DOWEX[®] 50W-

X8(H⁺)⁴¹. Il derivato ottenuto è stato caratterizzato mediante spettrometria di massa e spettroscopia NMR mono e bi dimensionale.

Al fine di poter utilizzare il nucleoside aciclico nella sintesi in fase solida degli ON esso è stato funzionalizzato nel derivato ‘fosforammidito *building block*’ (**6**) seguendo le procedure descritte per le reazioni di monotrilitazione e fosfitilazione⁴².

Sostituendo una alla volta i residui T lungo la sequenza del TBA sono stati ottenuti gli oligomeri di **tabella 3.1**.

ON	SEQUENZE
I	GGTTGGTGTGGTTGG
II	GGT ₃ *TGGTGTGGTTGG
III	GGTT ₄ *GGTGTGGTTGG
IV	GGTTGGT ₇ *GTGGTTGG
V	GGTTGGTGT ₉ *GGTTGG
VI	GGTTGGTGTGGT ₁₂ *TGG
VII	GGTTGGTGTGGTT ₁₃ *GG

Tabella 3.1: TBA ed analoghi sintetizzati, utilizzando il nucleotide T* come analogo della timidina

3.3.2 Spettroscopia CD e UV

Per gli esperimenti CD sono stati preparati campioni ad una concentrazione finale di 10 μ M in due differenti tamponi: 100mM KCl, 10mM KH₂PO₄, pH 7.4 (TK) e 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM NaH₂PO₄, pH 7.4 (PBS) dove quest'ultimo mima le normali condizioni saline fisiologiche. Gli spettri CD ottenuti per i TBA modificati mostrano un massimo positivo a 295nm ed un massimo negativo a 265nm confermando che, come il TBA naturale, essi formano una struttura quadruplex con filamenti antiparalleli⁴³.

Con l'obiettivo di stabilire la molecolarità della struttura formata, è stata monitorata l'ampiezza della banda CD a 295nm prodotta da ONs a tre differenti concentrazioni: 1x10⁻⁴M, 1x10⁻⁵M, 1x10⁻⁶M. E' noto infatti che una struttura quadruplex monomolecolare produce bande CD la cui ampiezza, espressa come ellitticità molare, è indipendente dalla concentrazione²⁹. Come mostrato in **fig. 3.8a-b** gli spettri CD registrati a 10°C in TK mostrano una dipendenza della banda CD esaminata dalla concentrazione indicando quindi un arrangiamento di tipo intermolecolare.

L'analisi termica UV in TK mostra un profilo ambiguo. Per tutti i modificati infatti, riscaldando il campione da 10 ad 80°C, avvengono due transizioni strutturali, di cui la prima a circa 25-30°C e la seconda

intorno ai 50°C. Pertanto, per escludere che la dipendenza dell'ellitticità molare dalla concentrazione fosse dovuta a interazioni di tipo 'end to end' tra due quadruplex monomolecolari favorita dalle basse temperature, gli spettri CD sono stati registrati anche a 30°C (**fig. 3.8 c-d**). Eccetto una piccola diminuzione dell'ellitticità molare, non si osservano variazioni confermando quindi che in TK la quadruplex è di tipo intermolecolare. Risultati completamente diversi sono invece ottenuti utilizzando il tampone fisiologico PBS. In questo caso infatti, la banda dicroica a 295nm non mostra alcuna dipendenza dalla concentrazione (**fig. 3.9**).

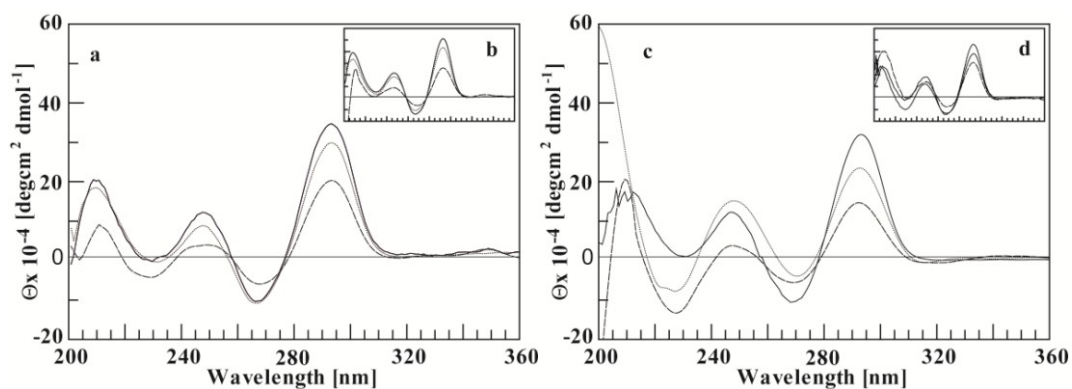


Figura 3.8: Spettri CD registrati a 10 e 30°C per l'ON VII (**a** e **c** rispettivamente) e per l'ON I (inserti **b** e **d** rispettivamente). Gli spettri sono stati ottenuti per campioni a tre diverse concentrazioni in TK: 1×10^{-4} M (linea continua); 1×10^{-5} M (linea punteggiata); 1×10^{-6} M (linea tratteggiata).

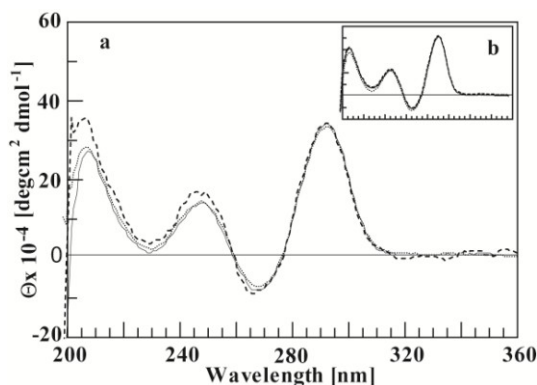


Figura 3.9: Spettri CD registrati a 10°C per l'ON VII (a) e per l'ON I (inserto b). Gli spettri sono stati ottenuti per campioni a tre diverse concentrazioni in PBS: 1×10^{-4} M (linea continua); 1×10^{-5} M (linea punteggiata); 1×10^{-6} M (linea tratteggiata).

Questo dato suggerisce che sia il TBA naturale che i suoi analoghi I-VI sono capaci di formare strutture quadruplex intra o inter-molecolari a seconda del tipo di catione (sodio o potassio) presente in soluzione.

Per valutare la stabilità termica^{44,45,46,47} delle quadruplex formate, sono stati condotti esperimenti UV di denaturazione termica riscaldando il campione da 10 ad 80°C (**fig. 3.10**). Ciascun esperimento è stato ripetuto utilizzando due differenti velocità di scansione: 0.1 e 0.5 °C/min sia in TK che in PBS. Le temperature di *melting* estrapolate sono riportate in **tabella 3.2** e sono in accordo con i dati riportati in letteratura secondo i quali le basi T4 e T13 sono impegnate in un legame ad idrogeno ed insieme a T9 danno interazioni di *stacking* con il quartetto di G adiacente^{26,27,28}. Questi tipi di interazione sono totalmente, nel caso di V, o parzialmente come nel caso di III, distrutte dall'introduzione del nucleotide aciclico. Al contrario II e VI mostrano valori della Tm

praticamente invariati e **IV** solo un leggero aumento della stabilità termica suggerendo un ruolo marginale di queste posizioni nella stabilità della struttura.

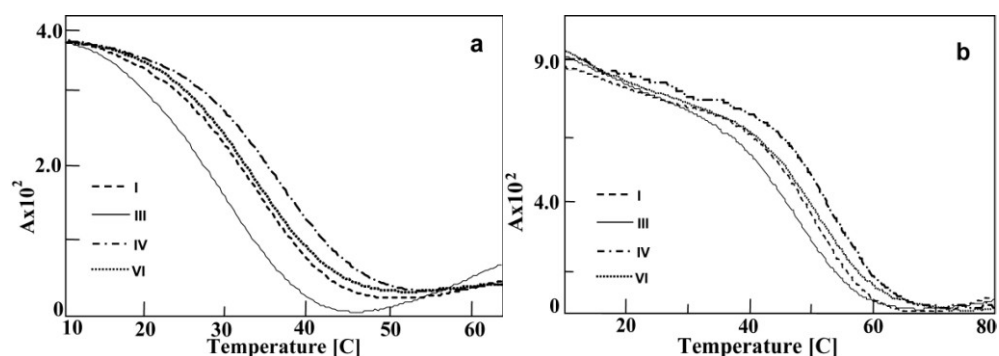


Figura 3.10: Curve di fusioni normalizzate ottenute per gli ONs I, III, IV, VI: a) in PBS e b) in TK. Velocità di scansione fissata a 0.1°C/min.

ON	SEQUENZE	T_m (TK)	T_m (PBS)
I	GGTTGGTGTGGTTGG	50	33
II	GGT ₃ *TGGTGTGGTTGG	51	34
III	GGTT ₄ *GGTGTGGTTGG	47	30
IV	GGTTGGT ₇ *GTGGTTGG	54	37
V	GGTTGGTGT ₉ *GGTTGG	39	22
VI	GGTTGGTGTGGT ₁₂ *TGG	51	34
VII	GGTTGGTGTGGTT ₁₃ *GG	47	30

Tabella 3.2: valori delle temperature di melting (T_m) ottenute per il TBA ed i suoi analoghi **II-VII** in TK e in PBS.

Per tutti i modificati **I-VI** sono stati registrati spettri UV differenza (**fig. 3.11**) e spettri CD a differenti temperature (**fig. 3.12**) in PBS.

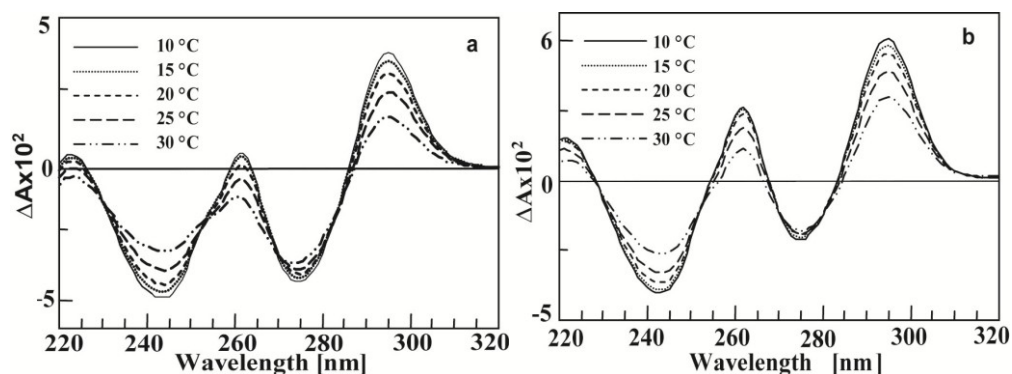


Figure 3.11: Spettri UV differenza degli ONs **VII** (a) e **I** (b). Ciascun profilo è stato ottenuto per sottrazione dello spettro registrato a 65 °C da quello ottenuto alla specifica temperatura (10, 15, 20, 25, 30 and 35 °C). La concentrazione dei campioni è 1.0×10^{-5} M in PBS.

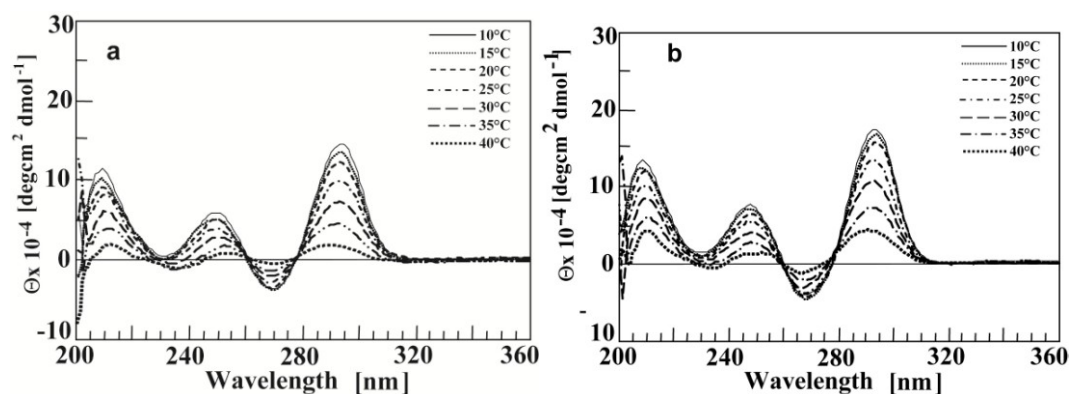


Figura 3.12. Spettri CD degli ONs **VII** (a) e **I** (b) registrati a varie temperature (10, 15, 20, 25, 30, 35, and 40 °C). La concentrazione dei campioni è 1.0×10^{-5} M in PBS.

Tranne che per l'ON **V**, si evidenziano punti isosbastici ed isoellittici indicando che in soluzione è presente un'unica tipologia di quadruplex monomolecolare²⁹.

3.3.3 Spettroscopia ¹H NMR

Lo spettro ¹H NMR del TBA è caratterizzato dalla presenza di otto segnali ben risolti nella regione tra 11.5 e 12.5 ppm attribuibili ai protoni imminici scambiabili coinvolti nella formazione dei legami ad idrogeno di tipo *Hoogsteen* tra le due tetradi di G. Nella regione degli aromatici invece (6.8-8.5 ppm) si notano 15 segnali attribuibili ai protoni H8 e H6 delle basi guanine e timine rispettivamente^{26,27,28}. Incrementando la temperatura l'intensità dei segnali imminici diminuisce progressivamente e, allo stesso tempo, raddoppia il numero dei protoni aromatici a causa della contemporanea presenza in soluzione delle forme strutturate e non strutturate. Oltre i 50°C i protoni imminici della struttura quadruplex scompaiono completamente e si ricontano soltanto 15 protoni aromatici in quanto in soluzione la specie predominante è l'ON in forma non strutturata.

Gli spettri ¹H NMR di tutti i modificati, tranne **V**, mostrano un profilo molto simile (**fig. 3.13**). Il maggiore affollamento dovuto alla separazione di alcuni segnali può essere spiegato considerando che la

sostituzione della timina con il nucleoside aciclico T* produce ONs diastereoisomerici.

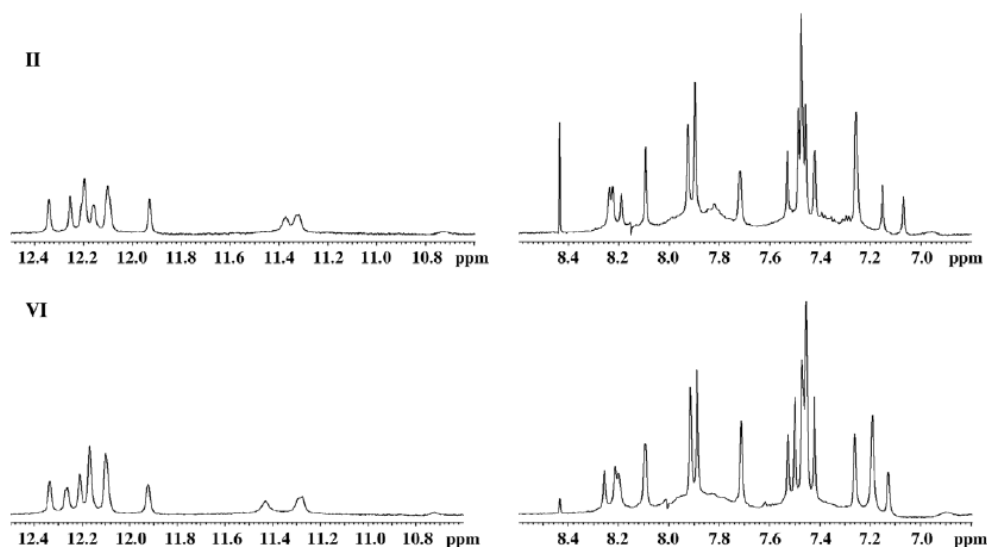


Figura 3.13: regione imminica (sinistra) e aromatica (destra) dello spettro ^1H NMR ottenuto per gli ONs **II** e **VI** (700MHz, 2°C).

Nello spettro del TBA naturale i metili delle basi T4 e T13 risuonano distanti (0.98 e 1.03ppm) da quelli delle altre timine (circa 2 ppm) a causa della loro particolare posizione nella struttura quadruplex. Considerato che il *linker* introdotto nei modificati presenta anch'esso un gruppo metilico, intorno ad 1 ppm si ci aspettano tre singoletti, invece in quasi tutti i casi in questa regione appaiono più di tre segnali. In particolare per **III** e **VII** (fig. 3.14) nei quali il nucleotide aciclico sostituisce rispettivamente T4 e T13, si distinguono 5 e 6 segnali. Incrementando la temperatura a 45°C i metili delle basi T4 e T13 sono

spostati a campi più bassi mentre il metile del *linker* risuona come coppia di singoletti centrata a 0.78 ppm come conseguenza della presenza di due filamenti non strutturati diastereoisomerici.

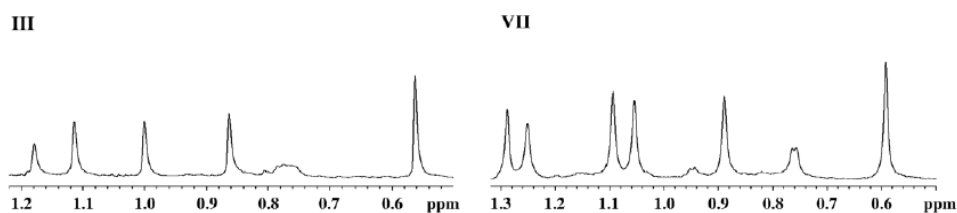


Figura 3.14: la regione a campi alti degli spettri ^1H NMR ottenuti per gli ONs **III** e **VII** mostra la separazione in due segnali del metile del linker e delle basi T4 e T13 (500MHz, 25°C).

Contrariamente a quello degli altri modificati, lo spettro ^1H NMR di **V** appare molto affollato, confermando che più conformazioni sono contemporaneamente presenti in soluzione come suggerito anche dagli esperimenti CD e UV dai quali non si evidenziavano punti isoellittici ed isosbastici.

3.3.4 Saggi farmacologici

Il test del tempo di protrombina^{48, 23, 32} (PT o INR o Quick time) misura, *in vitro*, il tempo necessario alla formazione del coagulo di fibrina quando al plasma (addizionato di sodio citrato) si aggiungono

tromboplastina e calcio ed è comunemente utilizzato per il monitoraggio di terapie anticoagulanti. La tromboplastina induce una rapida conversione della protrombina plasmatica in trombina, la quale, a sua volta, converte il fibrinogeno in fibrina, formando il coagulo. In assenza di un inibitore della trombina, il tempo che intercorre tra l'aggiunta della tromboplastina e la formazione del coagulo, rappresenta il tempo basale di protrombina. Quando il saggio è condotto in presenza dell'aptamero, il legame del fibrinogeno alla trombina è inibito ed è richiesto più tempo per formare il coagulo.

Per il saggio sono stati usati plasma umano citrato, tromboplastina e una concentrazione nota di ON. I tempi di protrombina sono stati misurati utilizzando un coagulometro automatico. Il plasma è stato incubato con 2 o 20 μM di soluzione di ciascun ON (in tampone PBS) a 37°C. Dopo un tempo di incubazione di 30sec, 2, 5, 10, 15, 30 o 60 min, il processo di coagulazione è stato innescato dall'aggiunta di tromboplastina. Ciascun tempo di protrombina è stato prodotto in triplicato e per ciascun ON calcolato il tempo medio. I risultati ottenuti sono riportati in **tabella 3.3**. Il valore ottenuto per il TBA concorda con quello noto dalla letteratura⁴⁹.

ON	PT (2 μ M)	PT (20 μ M)
I	22.60 \pm 1.83	53.68 \pm 1.48
II	14.30 \pm 0.31	35.15 \pm 1.70
III	14.50 \pm 0.20	32.28 \pm 0.21
IV	24.67 \pm 0.59	60.20 \pm 1.38
V	13.23 \pm 0.20	34.65 \pm 2.01
VI	18.07 \pm 0.47	44.83 \pm 1.30
VII	17.50 \pm 0.23	46.97 \pm 1.83

Tabella 3.3: Valori di PT, espressi in secondi, ottenuti dopo incubazione con gli ONs alle concentrazioni 2 e 20 μ M fino ad un tempo massimo di 60min.

Tutti i modificati mostrano attività inibitoria nei confronti della trombina a 20 μ M, ma soltanto gli ONs **IV**, **VI** e **VII** sono significativamente attivi a 2 μ M. Il più alto valore di PT è stato ottenuto per l'ON **IV** (**fig 3.15**) nel quale la modifica coinvolge la posizione 7, mentre i valore più bassi sono stati ottenuti per gli ONs **II**, **III** e **V**

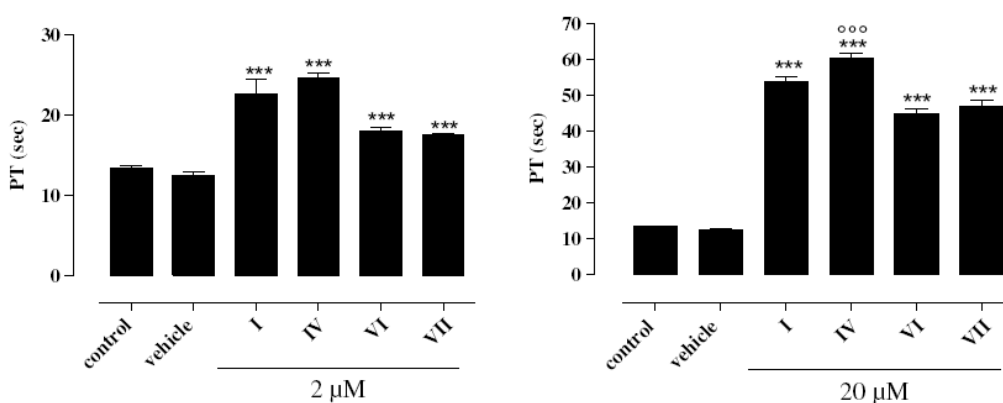


Figura 3.15: Incubazione fino a 60 min di **I**, **IV**, **VI** e **VII**. Incremento dei valori di PT concentrazione dipendente. *** p <0.001 vs veicolo; ooo p < 0.001 vs **I**. n =3.

L'attività farmacologica è stata ulteriormente valutata mediante saggio del tempo di *clotting* condotto su fibrinogeno purificato^{23,50}. Il test è molto simile al saggio sopra descritto ma, poiché si evita l'interazione dell'ON con altri componenti del sangue, esso è stato utilizzato per accertare che le proprietà anticoagulanti degli ONs modificati **II-VI** fossero effettivamente correlate alla loro capacità di legare la trombina.

Per misurare il tempo di coagulazione in assenza di inibitore, la trombina viene aggiunta ad una soluzione tampone contenente fibrinogeno, precedentemente incubata a 37°C per alcuni minuti. Il tempo richiesto per formare il coagulo di fibrina è misurato con un coagulometro. Quando il TBA viene aggiunto alla soluzione di fibrinogeno, il tempo necessario alla formazione del coagulo viene prolungato in maniera concentrazione-dipendente. Allo scopo di valutare la capacità inibitoria degli ONs **II-VII**, abbiamo determinato per ciascuno di essi la concentrazione necessaria per raddoppiare il tempo basale di *clotting* (**tab. 3.4**).

Nonostante le condizioni sperimentali utilizzate corrispondano perfettamente a quelle precedentemente riportate, la concentrazione del TBA necessaria è risultata circa 10 volte più alta di quella descritta mentre il tempo basale coincide perfettamente. Gli ONs **IV**, **VI** e **VII** raddoppiano il tempo necessario per il coagulo a concentrazioni più basse del TBA, mentre **II**, **III** e **V** richiedono concentrazioni più elevate.

Questi risultati sono confrontabili con quelli ottenuti mediante saggio del PT indicando che le attività *in vitro* di questi ONs sono direttamente associate ad una loro azione sulla trombina.

ON	[ON] _{2t} nM (± 10)
I	175
II	238
III	250
IV	70
V	210
VI	78
VII	100

Tabella 3.4: concentrazione richiesta per ciascun ON per raddoppiare il tempo necessario alla formazione del coagulo. Il tempo basale di clotting, calcolato come media di 6 misure, è 27 ± 3 s. E' stata quindi calcolata la concentrazione di ON richiesta per prolungare il tempo di clotting ad un valore finale di 57 ± 10 s.

3.4 Conclusioni

Gli studi riportati da Vorlikova e coll.²⁹ avevano dimostrato che il TBA adotta una struttura quadruplex di tipo bimolecolare. I nostri dati tuttavia confermano questo dato soltanto in TK, suggerendo che la molarità della struttura quadruplex formata è fortemente influenzata dal tipo di catione (sodio o potassio) presente in soluzione. Considerando che il PBS mima la composizione salina del sangue, si può supporre che la struttura intermolecolare che richiede quantità maggiori di potassio non sia rilevante da un punto di vista biologico.

L'attività farmacologica degli aptameri modificati è stata testata *in vitro* a 37°C. Gli esperimenti UV di denaturazione termica hanno messo in evidenza che i valori di T_m del TBA e dei suoi analoghi sono più bassi della temperatura a cui è effettuato il saggio. Di conseguenza in soluzione nelle condizioni del saggio gli ONs sono principalmente in forma non strutturata.

Poiché studi NMR e di cristallografia a raggi X attribuiscono alla quadruplex monomolecolare la sua capacità di interazione con la trombina⁵¹, le modifiche apportate (con lo scopo di migliorare proprietà quali la permeabilità cellulare o l'emivita) sembrerebbero avere validità solo se preservano la stabilità della struttura a sedia. Tuttavia i nostri dati sperimentali concordano solo parzialmente con quest'assunzione. Infatti una diretta relazione tra stabilità termica ed attività biologica è mantenuta solo quando il nucleotide modificato è introdotto nel *loop* centrale TGT; l'introduzione nei *loop* piccoli TT origina infatti una più complessa relazione struttura-attività.

Studi precedenti^{27,50} avevano dimostrato che la sostituzione di T7 con un *linker* abasico era associata ad un miglioramento della capacità di legame con la trombina; al contrario l'introduzione in posizione T9 produceva una diminuzione della capacità di legame. Questo dato è in accordo con i dati strutturali del complesso TBA-trombina dai quali emerge che l'interazione di *stacking* tra T9 e G8 sul quartetto adiacente è

importante per la stabilità del complesso stesso. Lo stesso comportamento è stato riscontrato per gli ONs **IV** e **V** nei quali la modifica coinvolge sempre le posizioni 7 e 9 confermando ulteriormente che entrambe le interazioni di *stacking* sono importanti per la stabilità del complesso. L'incremento di attività biologica riscontrato per ON **IV** indica che un aumento di flessibilità in questa posizione migliora l'interazione. Questo dato dovrebbe essere tenuto in considerazione nella progettazione di nuovi analoghi del TBA.

Per quanto riguarda i *loop* piccoli TT, non ci sono effetti significativi sulla stabilità quando la modifica coinvolge le posizioni 3 e 12. Al contrario la modifica nelle posizioni 4 e 13 produce una diminuzione della stabilità termica. Questi dati possono essere spiegati considerando la struttura NMR dalla quale si evince che T4 e T13 danno interazioni di *stacking* con il quartetto adiacente e sono tra loro unite da un legame ad idrogeno. Proprio l'incapacità di formare questo legame ad idrogeno dovuta all'introduzione del *linker* aciclico potrebbe giustificare la minore stabilità termica degli ONs **III** e **VII**.

Baldrich e coll.⁵² e Nagatoshi e coll.⁵³ avevano precedentemente dimostrato che la trombina può funzionare da *chaperone* per la forma non strutturata del TBA inducendo la formazione della struttura quadruplex. Inoltre gli autori ipotizzavano che il riconoscimento potrebbe iniziare dall'interazione tra i residui TT e alcuni siti idrofobici

della proteina. Poiché i dati biologici evidenziano che la modifica nelle posizioni T3 e T4 produce una perdita dell'attività farmacologica mentre l'introduzione nelle posizioni T12 e 13 un' incremento di tale attività, si può ipotizzare che il processo di *chaperone* coinvolga un contatto iniziale tra la trombina e il loop TT al terminale 5'.

I dati ottenuti possono essere presi in considerazione nella progettazione di nuovi modificati e possono essere utili per la comprensione dei meccanismi struttura-attività del TBA.

3.5 Procedure sperimentali

5-idrossimetil-2,2,5-trimetil-1,3 diossano (1)

1,1,1-Tris(idrossimetil)etano (41.63mmol) è stato disciolto in 50ml di 2,2-dimetossipropano. E' stato aggiunto il piridinio *p*-toluen solfonato (8.32 mmol) e la sospensione tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente sotto flusso di argon. Dopo 24h la reazione è stata interrotta per aggiunta di TEA. Dopo 30 min sotto agitazione il solvente è stato rimosso ed il grezzo cromatografato su gel di silice eluito con EtOAc/esano 1:1v/v lasciando un liquido oleoso incolore **1** (Resa 67%); Rf 0.40 (1:1 EtOAc/esano).

^1H NMR (CDCl_3): δ ppm 3.71–3.56 (dd, 4 H), 3.38 (s, 2H), 1.41 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 0.83 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ ppm 90.1, 68.2, 65.9, 37.0, 28.3, 13.3.

ESI MS m/z 161 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 183 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N³-Benzoiltimina (2)

La timina (8.55 mmol) è stata sospesa in una miscela di ACN (10 mL) e piridina (5 mL) anidri e la miscela raffreddata a 0 °C. Il benzoin cloruro (19.1 mmol) è stato aggiunto lentamente alla sospensione e la reazione lasciata a temperatura ambiente per 72h sotto flusso di argon. Dopodichè i solventi sono stati rimossi sotto vuoto e il residuo ridisciolti in DCM

ed estratto due volte con H₂O. Il prodotto monoprotetto è stato cristallizzato da DCM dando un solido bianco. (Resa 85%); R_f 0.45 (CHCl₃/MeOH 9:1 v/v).

¹H NMR (CDCl₃): δ ppm 9.57 (br, 1H), 7.95 (d, 2H), 7.68 (t, 1H), 7.50 (t, 2H), 7.12 (s, 1H), 1.95 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ ppm 167.7, 162.1, 151.1, 142.1, 135.8, 132.1, 131.0, 129.9, 110.2, 18.7. 2D-NOESY NMR (CDCl₃) δ ppm: un cross peak NOE è presente tra H-6 (7.12) ed N¹H (9.57).

ESI MS m/z 231[M+H]⁺, 253 [M+Na]⁺.

N³-benzoil N¹[metilen(2,2,5-trimetil-1,3-diossan)]timina (3)

2 (4.0 mmol), trifenilfosfina (6.0 mmol) e di-tert-butyl azodicarbossilato (6.0 mmol) sono stati sospesi in 25 mL di diossano anidro. Dopo aver raffreddato la miscela di reazione a -20°C è stato aggiunto **1**. La reazione è stata lasciata a temperatura ambiente per 18h sotto flusso di argon. La soluzione è stata concentrata sotto vuoto ed il grezzo di reazione purificato mediante cromatografia su gel di silice eluito 95:5 Et₂O/CH₂Cl₂ 95:5 v/v per dare un solido bianco (**3**). (Resa 75%); R_f 0.59 (CHCl₃/MeOH 9:1 v/v).

¹H NMR (CDCl₃) δ ppm 7.92 (d, 2H), 7.63 (t, 1H), 7.48 (t, 2H), 7.19 (s, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.71–3.57 (dd, 4H), 1.97 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.46 (s,

3H), 0.79 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ ppm 167.7, 162.1, 151.1, 142.1, 135.8, 132.1, 131.0, 129.9, 110.2, 90.1, 67.0, 51.9, 37.0, 28.3, 18.7, 13.3.
ESI MS m/z 373 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 395 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

N³-benzoil-N1-(3-idrossi-2idrossimetil-2-metilpropil)-timina (4)

3 (2.83mmol) sono stati sospesi in 50ml di una soluzione MeOH/H₂O (9:1v/v). Sono stati aggiunti 3g di resina Dowex® 50WX8 (H⁺) e la miscela di reazione lasciata sotto lenta agitazione per circa 8 ore fino a completa dissoluzione di **3**. Dopo aver neutralizzato la miscela per aggiunta di una soluzione acquosa 0.5M di NaOH, la soluzione è stata concentrata sotto pressione ridotta ottenendo il prodotto **4** come solido bianco. (Resa 98%); R_f 0.27 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1v/v)

^1H NMR (CDCl_3): δ ppm 7.98 (d, 2H), 7.70 (t, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.57 (t, 2H), 3.80 (s, 2H), 3.20 (m, 4H), 1.95 (s, 3H), 0.89 (s, 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ ppm 167.7, 162.1, 151.1, 142.1, 135.8, 132.1, 131.0, 129.9, 110.2, 65.8, 51.9, 42.0, 18.7, 13.3.

ESI MS m/z 333 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 355 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N³-Benzoyl-N¹-[3-metossi(4,4'-dimetossitritil)-2-idrossimetil-2-metilpropil]-timina (5)

4 (1.54mmol), 4,4'-dimetossitritilcloruro (1.23mmol), e DMAP (0.077mmol) sono stati disciolti in piridina (10 mL) ed acetonitrile anidri (5 mL). La miscela di reazione è stata lasciata per un'ora a temperatura ambiente sotto flusso di argon. Per interrompere la reazione è stato utilizzato metanolo anidro. Dopo 30 min sotto agitazione, la soluzione è stata concentrata sotto pressione e il grezzo purificato mediante cromatografia su gel di silice eluito con EtOAc/esano/TEA 50:50:5 v/v/v per dare il prodotto **5** in forma di solido giallo chiaro. (Resa 45%), Rf 0.51 (EtOAc/esano 1:1 v/v).

¹H NMR (CDCl₃): δ ppm 7.90 (d, 2H), 7.65 (t, 1H), 7.48 (t, 2H), 7.40 (d, 2H), 7.38 (m, 3H), 7.35 (d, 4H), 7.12 (s, 1H), 6.85 (d, 4H), 3.95–3.75 (dd, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.38–3.21 (m, 2H), 3.10–2.95 (m, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.05 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ ppm 167.7, 162.1, 158.8, 151.1, 143.6, 142.1, 135.0, 135.5, 132.1, 131.0, 129.9, 129.5, 129.2, 128.4, 126.7, 113.4, 110.2, 94.5, 71.8, 65.9, 55.4, 51.2, 42.0, 18.7, 13.3.

ESI MS m/z 635 [M+H]⁺, 657 [M+Na]⁺.

N³-benzoil-N¹-[3-metossi(4,4'-dimetossitritil)-2-metilpropil-2-cianoetile-diisopropilfosforoammiditoil]timina (6)

Il prodotto **5** (0.559mmol), dopo essere stato anidrificato sotto vuoto per 12 ore, è stato disciolto in DCM anidro (5 mL) e DIPEA (2.24 mmol, 4 equiv). A questa soluzione lentamente è stato aggiunto il 2-cianoetil diisopropilclorofosforammidito (0.838 mmol, 1.5 equiv) sotto flusso di argon. Dopo 20 min la reazione è stata interrotta con aggiunta di metanolo anidro. Il grezzo è stato diluito con acetato di etile (15 ml) e lavato prima con una soluzione di Na₂CO₃ al 10% (15ml) poi con una soluzione satura di NaCl (15ml). La fase organica è stata anidrificata su solfato di magnesio e concentrata *in vacuo*. Il grezzo è stato cromatografato su colonna impaccata con gel di silice ed eluita con DCM:EtOAc:TEA 80:10:10 v/v/v. Le frazioni contenenti il prodotto sono state riunite concentrate sotto vuoto dando il prodotto finale **6** sotto forma di un solido spugnoso di colore bianco. (Resa: 82%); R_f 0.65 (CHCl₃/MeOH 97:3v/v).

¹H NMR (CDCl₃): δ ppm 7.90 (d, 2H), 7.65 (t, 1H), 7.48 (t, 2H), 7.40 (d, 2H), 7.38 (m, 3H), 7.35 (d, 4H), 7.12 (s, 1H), 6.85 (d, 4H), 3.95–3.80 (m, 2H), 3.75 (s, 6H), 3.70 (m, 2H), 3.60 (m, 2H), 3.55 (m, 2H) 3.39–3.02 (m, 2H), 2.60–2.45 (t, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.09 (s, 12H) 1.05 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃); δ ppm 163.3, 158.7, 150.6, 141.8, 135.0, 130.6,

130.4, 129.3, 129.2, 128.4, 128.1, 128.1, 127.0, 113.4, 110.1, 94.5, 66.1, 55.4, 54.2, 51.2, 43.3, 42.0, 24.7, 20.7, 18.7, 13.3.

ESI MS m/z 835.7 [M+H]⁺, 857.7 [M+Na]⁺.

Sintesi degli oligomeri

Il TBA ed i modificati **II-VII** sono stati sintetizzati utilizzando resine CPG *high-loading* come supporto solido e seguendo il protocollo standard del fosforammidito. Il distacco degli ONs dal supporto solido è stato effettuato per trattamento con una soluzione ammoniacale al 33% per tutta la notte a 55°C. I filtrati e di lavaggi sono stati raccolti insieme, concentrati sotto vuoto, disciolti in H₂O, filtrati e purificati per HPLC usando una colonna a scambio ionico del tipo Nucleogen Sax eluita con un gradiente lineare (dallo 0 al 30%B in 30min) di tamponi fosfato a pH 7.0 (A: 20mM NaH₂PO₄ contenente 20% ACN e B: 1M NaCl, 20mM NaH₂PO₄ contenente 20% ACN). Gli oligomeri sono stati successivamente desalificati mediante cromatografia ad esclusione molecolare su Biogel P2-fine. Il grado di purezza è stato controllato mediante HPLC utilizzando una colonna a fase inversa (C-18 purospher Star[®], Merck) ed elettroforesi in condizioni denaturanti su gel di poliacrilammide al 20% contenente urea 7M.

La concentrazione dei campioni utilizzati per gli esperimenti UV e CD è stata determinata spettrofotometricamente misurando l'assorbanza a 260nm a 80°C ed utilizzando i coefficienti di estinzione molare calcolati secondo il metodo di Gray. Per il monomero modificato il coefficiente di estinzione molare è stato considerato uguale a quello di una timidina non modificata. MALDI-TOF MS m/z (calcd. 4738 $[M-H]^-$, 4761 $[M-2H+Na]^-$) 4736 (**II**, $[M-H]^-$), 4736 (**III**, $[M-H]^-$), 4735 (**IV**, $[M-H]^-$), 4734 (**V**, $[M-H]^-$), 4763 (**VI**, $[M-2H+Na]^-$), 4762 (**VII**, $[M-2H+Na]^-$).

Spettroscopia UV

Ciascun ON, alla concentrazione finale di 10 μ M è stato disciolto in TK (100mM KCl, 10mM KH₂PO₄, pH 7.0) o PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM NaH₂PO₄, pH 7.4). Le curve di fusione sono state ottenute monitorando la variazione di assorbanza a 295nm incrementando la temperatura da 10 ad 80°C. Sono stati ottenuti due set di esperimenti fissando la velocità di scansione rispettivamente a 0.1°C/min e 0.5°C/min. I campioni sono stati successivamente sottoposti a processi inversi di raffreddamento utilizzando le stesse velocità di scansione.

Gli spettri UV differenza sono stati ottenuti per sottrazione dello spettro registrato a 65°C da quelli ottenuti a ciascuna temperatura (10, 15, 20, 25, 30 e 35°C).

Spettroscopia CD

Gli spettri CD sono stati registrati da 200 a 360nm con una velocità di scansione di 100nm/min (risposta:16sec, bandwidth: 1.0nm). Prima della scansione sono stati equilibrati per 30 min a ciascuna temperatura. Ogni profilo CD è stato ottenuto come media di tre scansioni dalle quali è stato sottratto lo spettro del tampone da solo. Per valutare la dipendenza della banda dicroica a 295nm (espressa come ellitticità molare) dalla concentrazione dell'ON in PBS e in TK, sono stati preparati campioni a tre differenti concentrazioni $1 \times 10^{-4} \text{M}$, $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $1 \times 10^{-6} \text{M}$. Per la registrazione di tali spettri sono state utilizzate cellette in quarzo aventi cammino ottico rispettivamente di 0.1, 0.5 e 1cm. Per la registrazione degli spettri CD a differenti temperature sono stati utilizzati campioni in TK o in PBS ad una concentrazione di $1 \times 10^{-5} \text{M}$.

Esperimenti NMR

I campioni degli ONs **II-VI** per l'analisi NMR sono stati preparati ad una concentrazione di 0.5mM in H₂O/D₂O (9:1 v/v) con una concentrazione finale in sali di 130mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄, 0.2mM EDTA.

Saggio del tempo di protrombina (PT)

I campioni di sangue umano sono stati ottenuti mediante prelievi e frazionati per centrifuga a 2000rpm per 5 min. I valori di PT sono stati

misurati utilizzando un apparecchio Koagulab equipaggiato con uno specifico kit RecombiPlastin Hemosil (Inst.Labs.Lexiton, USA).

Per la valutazione del PT a 20 μ M nell'apposito microtubo sono stati aggiunti 2 μ l dell'ON (alla concentrazione di 1mM in PBS). Dopo 30 sec, 1, 5, 15, 30, 60 minuti di incubazione, sono stati aggiunti 200 μ l della soluzione del Kit contenente tromboplastina. Quest'ultima in presenza di ioni calcio innesca la via estrinseca della coagulazione. La misura del PT per ciascun tempo di incubazione, è stata prodotta in triplicato ed è stato calcolato il valore medio.

Saggio di coagulazione su fibrinogeno purificato

Gli ONs sono stati incubati per 1 min a 37°C in 200 μ l di una soluzione tampone (20mM Tris acetato, 140mM NaCl, 2.7mM KCl, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, pH 7.4) contenente fibrinogeno (2mg/ml). La trombina è stata disciolta nello stesso tampone e pre-incubata per 1min a 37°C. Trascorso questo tempo 100 μ l di trombina sono stati aggiunti alla soluzione contenente fibrinogeno e l'ON (concentrazione finale della trombina 13nM). Il tempo richiesto per la formazione del coagulo è stato misurato utilizzando un apparecchio Koagulab Mj. Per ciascun ON l'esperimento è stato ripetuto a cinque diverse concentrazioni (20, 50, 100, 175, 200 e 300nM) e i tempi di coagulazione sono stati calcolati considerando la media di sei misure per ciascuna concentrazione. Il

tempo basale necessario per la coagulazione è stato determinato misurando il tempo richiesto in assenza di ON. In grafico sono stati riportati i valori del tempo di coagulazione in funzione della concentrazione dell'ON.

Riferimenti bibliografici

- ¹ Bode, W. *Blood Cell, Molecules and Diseases*, **2006**, 36, 122-130
- ² Coughlin, S.R. *J. Throm. Haemost.*, **2005**, 3, 1800-1814
- ³ Bode, W.; Mayr, I.; Nesheim, M. *J. Biol. Chem*, **1996**, 271, 16603
- ⁴ Bode, W.; Turk, D.; Karshikov, A. *Protein Sci.*, **1992**, 1 , 426
- ⁵ Bode, W. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, **2006**, 36, 122-130
- ⁶ Rydel, T.J.; Yin, M.; Padmanabhan, K.P.; Blankenship, D.T.; Cardin, A.D.; Correa, O.E.; Fenton, J.W.; Tulinsky, A. *J. Biol. Chem*, **1994**, 269, 22000-22006
- ⁷ Di Cera, E.; Guinto, E.R.; Vindigni, A.; Dang, Q.D.; Ayala, Y.M.; Wuyi, M.; Tulinsky, A. *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 22089-22092
- ⁸ Butini, S.; Campiani, G.; Borriello, M.; Gemma, S.; Panico, A.; Persico, M.; Catalanotti, B.; Ros, S.; Brindisi, M.; Agnusdei, M.; Fiorini, I.; Nacci, V.; Novellino, E.; Belinskaya, T.; Saxena, A.; Fattorusso, C. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 3154-3170
- ⁹ Wells, C.M.; Di Cera, E. *Biochemistry*, **1992**, 31, 11721-11730
- ¹⁰ De Cristofaro, R.; Akhavan; S.; Altomare, C.; Carotti, A.; Peyvandi, F.; Mannucci, P.M. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 13034-13035
- ¹¹ Rosenberg, R.D. *The Molecular Basis of Blood Diseases*. Philadelphia, PA, Saunders, **1987**, 546
- ¹² Harvey, R.P.; Degryse, E., Stefani, L. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1986**, 83, 1084-1088

- ¹³ Rydel, T.J.; Ravichandran, K.G.; Tulinsky, A. *Science*, **1990**, 249, 277-280
- ¹⁴ Dahlback, B. *J. Int. Med.* , **2005**, 257, 209–223
- ¹⁵ Colman, R.W.; Hirsh, J.; Marder, V.J.; Clowes, A.W. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice* (4th ed.), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia , **2004**, 17–20
- ¹⁶ Weitz, J.I.; Hirsh, J. *Chest.* , **2001**, 119 , 95S–107S
- ¹⁷ Nimjee, S.M., Rusconi, C.P.; Sullenger, B.A. *Annu. Rev. Med.*, **2005**, 56, 555-583
- ¹⁸ Tuerk, C.; Gold, L. *Science*, **1990**, 249, 505-510
- ¹⁹ Abelson, J. *Science*, **249**, 488-489
- ²⁰ Schneider, D.J.; Feigon, J.; Hostomskj, Z.; Gold, L. *Biochemistry*, **1995**, 34, 9599-610
- ²¹ Jelinek, D.; Green, L.S.; Bell, C.; Janjic, N.; *Biochemistry*, **1994**, 33, 10450-56
- ²² Wiegand, T.W.; Williams, P.W.; Dreskin, S.C.; Jouvin, M.H.; Kinet, J.P.; Tasset, D. *J. Immunol.*, **1996**, 157, 221-230
- ²³ Griffin, C.; Tidmarsh, G.F.; Bock, L.C.; Toole, J.J.; Leung, L.L.K. *Blood*, **1993**, 81, 3271–327.
- ²⁴ Bock, L.C.; Griffin, L.C. ; Latham, J.A.; Vermaas, E.H.; Toole, J.J. *Nature*, 1992, **355**, 564–566.

- ²⁵ Nimjee, S.M.; Rusconi, C.P.; Sullenger, B.A. *Annu. Rev. Med.* , **2005**, 56, 555–58.
- ²⁶ Wang, K.Y.; McCurdy, S.; Shea, R.G.; Swaminathan, S.; Bolton, P.H. *Biochemistry*, **1993**, 32, 1899–1904
- ²⁷ Wang, K.Y.; Krawczyk, S.H.; Bischofberger, N.; Swaminathan, S.; Bolton, P.H. *Biochemistry*, 1993, **32**, 11285–11292
- ²⁸ Macaya, R.F.; Schultze, P.; Smith, F.W.; Roe, J.A.; Feigon, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90, 3745–3749
- ²⁹ Fialová, M.; Kypr, J.; Vorlíčková, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 344, 50–54
- ³⁰ Coppola, T.; Varra, M., Oliviero, G., Galeone, A., D’Isa, G.; Mayol, L., Morelli, E., Bucci, M-R., Vellecco, V.; Cirino, G.; Borbone, N. *Bioorg. Med. Chem*, **2008**, 16 , 8244-8253
- ³¹ He, G.-X.; Krawczyk, S.H.; Swaminathan, S.; Shea, R.G. ; Dougherty, J.P.; Terhorst, T. ; Law, V.S.; Griffin, L.C. ; Coutré, S.; Bischofberger, N. *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 2234–2242
- ³² He, G.-X.; Williams, J.P.; Postich, M.J.; Swaminathan, S.; Shea, R.G.; Terhorst, T.; Law, V.S.; Mao, C.T.; Sueoka, C.; Coutré, S.; Bischofberger, N. *J. Med. Chem.* , **1998**, 41 , 4224–4231
- ³³ Krawczyk, S.H.; Bischofberger, N.; Griffin, L.C.; Law, V.S.; Shea, R.G.; Swaminathan, S. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **1995**, 14, 1109–1116

- ³⁴ Merle, Y.; Bonneil, E.; Merle, L.; Sage, J.; Szmező, A. *Int. J. Biol. Macromol.* , **1995**, 17 , 239–246
- ³⁵ Marshalko, S.J.; Schweitzer, I.B.; Beardsley, G.P. *Biochemistry* , **1995**, 34 , 9235–9248
- ³⁶ Zhang, L.; Periz, A.; Meggers, E.V. *J. Am. Chem. Soc.* , **2005**, 127, 4174–4175
- ³⁷ Joyce, G.F. *Nature*, **2002**, 418 , 214–221
- ³⁸ Mitsunobu, O. *Synthesis* , **1981**, 1,. 1–28
- ³⁹ Di Grandi, M.J.; Tilley, J.W. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 4327–4330
- ⁴⁰ Cruickshank, K.A.; Jiricny, J.; Reese, C.B. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 681–684
- ⁴¹ Park, K.H.; Yoon, Y.J.; Lee, S.G. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 737–740
- ⁴² Sinha, N.D.; Biernat, J.; McManus, J.; Koster, H. *Nucleic Acids Res.*, **1984**, 12, 4539–4557
- ⁴³ Dapić, V.; Abdomerović, V.; Marrington, R.; Peberdy, J. ; Rodger, A.; Trent, J.O.; Bates, P.J. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, 2097–2107
- ⁴⁴ Mergny, J.-L.; Phan, A.-T.; Lacroix, L. *FEBS Lett.*, 1998, **435**, 74–78
- ⁴⁵ Mergny, J.-L.; Li, J.; Lacroix, L.; Amrane, S.; Chaires, J.B. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, e138/1–e138/6
- ⁴⁶ Saccà, B.; Lacroix L.; Mergny, J.-L. *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 1182–1192

- ⁴⁷ Gros, J.; Rosu, F.; Amrane, S.; De Cian, A.; Gabelica, V.; Lacroix, L.; Mergny, J.-L. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, 3064–3075
- ⁴⁸ Kelly, J.A.; Feigon, J.; Yeates, T.O. *J. Mol. Biol.*, **1996**, *256*, 417–422
- ⁴⁹ Martino, L.; Virno, A.; Randazzo, A.; Virgilio, A.; Esposito, V.; Giancola, C.; Bucci, M.; Cirino, G.; Mayol, L. *Nucleic Acids Res.*, **2006**, *34*, 6653–6662
- ⁵⁰ Krawczyk, S.H.; Bischofberger, N.; Griffin, L.C.; Law, V.S.; Shea, R.G.; Swaminathan, S. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **1995**, *14*, 1109–1111
- ⁵¹ Padmanabhan, K.; Tulinsky, A. *Acta Crystallogr.*, **1996**, *D52*, 272–282
- ⁵² Baldrich, E.; O’Sullivan, C. K. *Anal. Biochem.* **2005**, *341*, 194–197
- ⁵³ Nagatoishi, S.; Tanaka, Y.; Tsumoto, K. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2007**, *352*, 812–817

3.6 Obiettivi: *analoghi del TBA contenenti il nucleoside modificato 5,6-trimetilen-2'-deossiuridina*

Alla luce dei risultati ottenuti utilizzando il nucleoside aciclico¹ e con lo scopo di fare luce sui meccanismi di riconoscimento TBA-trombina, è stata messa appunto una strategia di sintesi per l'ottenimento in larga scala di un nuovo nucleoside contenente una base modificata. Il monomero, opportunamente funzionalizzato, è stato utilizzato per sostituire una alla volta le timidine sia dei *loop* piccoli TT che del *loop* centrale TGT del TBA .

La 5,6-trimetilen-2'-deossiuridina (**fig. 3.16**), indicata con P*, può essere considerata come un analogo della timina, i cui gruppi metilenici le conferiscono un maggiore carattere idrofobo, ritenuto necessario per l'interazione con la trombina.

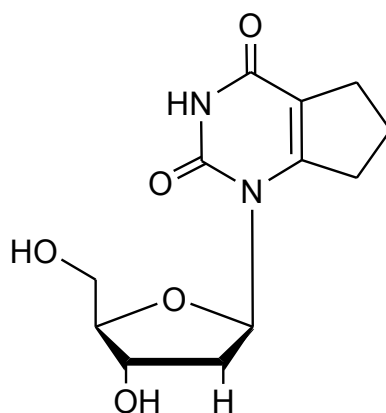


Figura 3.16: *Struttura della 5,6-trimetilen-2'-deossiuridina*

Questa modifica inoltre indirizza l'equilibrio *syn-anti* verso il conformero *syn* del nucleoside, piuttosto che nella conformazione *anti* rispetto al legame N-glicosidico assunta dalle timine nella struttura quadruplex monomolecolare del TBA (fig. 3.17).

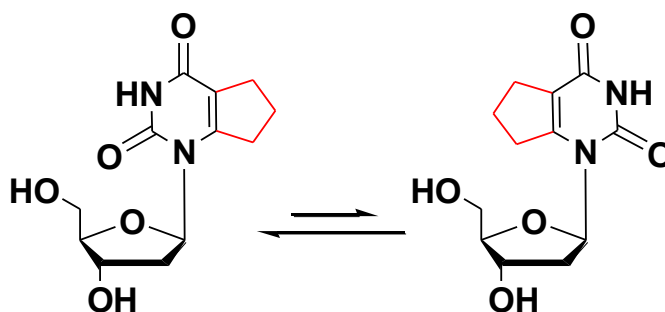


Figura 3.17: equilibrio tra le conformazioni *syn* e *anti*.

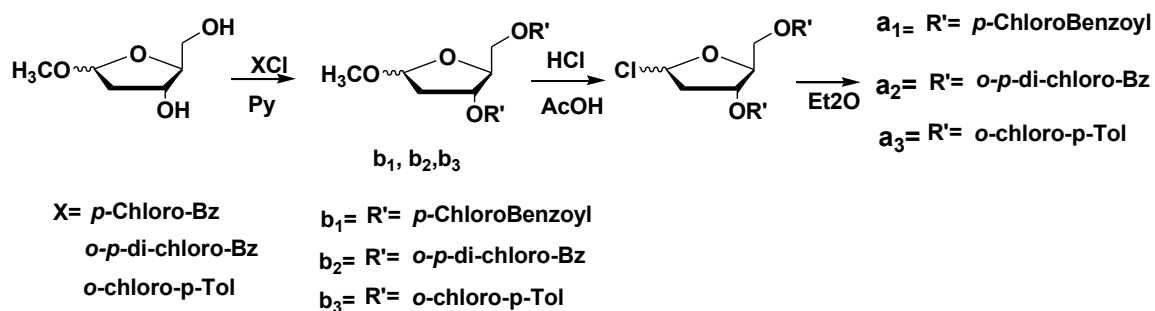
Le sequenze sintetizzate sono state studiate mediante spettroscopia CD, UV, ^1H NMR ed elettroforesi e l'attività farmacologica è stata testata mediante test del tempo di protrombina e saggio su fibrinogeno purificato.

3.7 Risultati

3.7.1 Sintesi

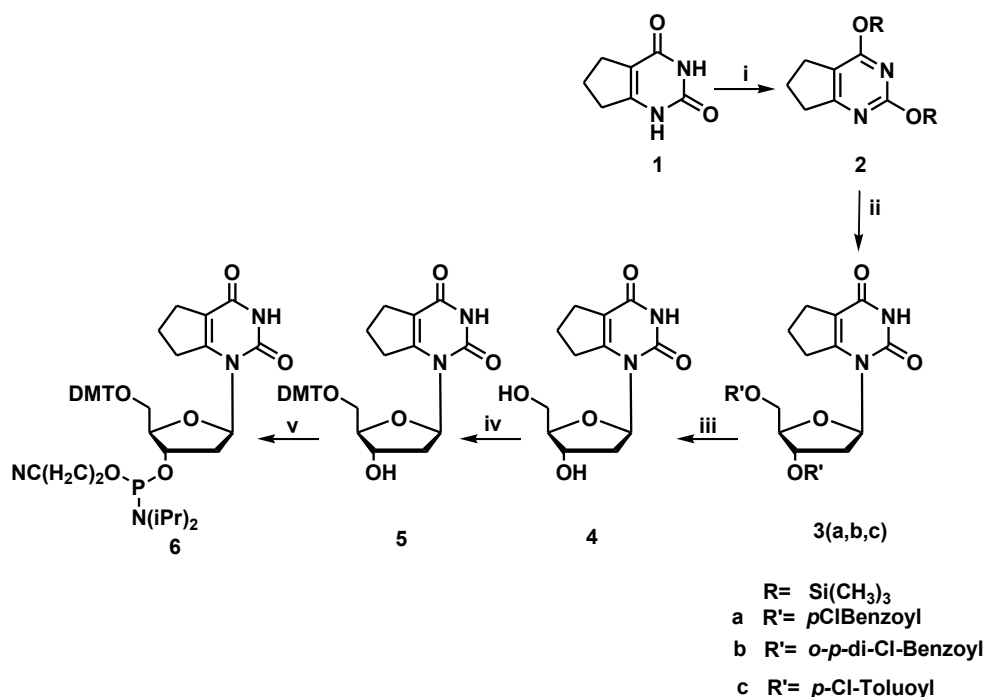
La reazione chiave della sintesi del monomero modificato è la condensazione tra la base 5,6-trimetilen-uracile e lo zucchero opportunamente protetto ed attivato.

La base modificata 5,6-ciclopentauracile è stata convertita in 2,6-di-O-trimetilsilil-5,6-ciclopentauridina (**2**, **schema 3.3**) mediante reazione con esametildisilazano (HMDS). Tale forma attivata è stata inizialmente fatta reagire con lo zucchero 1-Cl-3,5-di-O-toluil-D-eritro-pentafuranosio in assenza di catalizzatori. In queste condizioni tuttavia la reazione di condensazione procede con una resa totale del 65% e con un rapporto 2:3 tra gli anomeri α e β . Con l'intento di incrementare le rese del prodotto desiderato (anomero β) sono state esplorate differenti condizioni per tale reazione di condensazione. Sono stati pertanto preparati tre derivati che differiscono per il tipo di gruppi protettori (*p*-cloro-benzoil, *o*-cloro-*p*-toluil e *o-p*-dicloro-benzoil) sulle funzioni ossidriliche dell' 1-metil-2-deossi-D-ribosio. Tali zuccheri protetti (b1, b2 e b3, **schema 3.2**) sono stati convertiti nei corrispondenti cloro derivati secondo la procedura descritta da Hoffer e coll.^{2,3,4}.



Schema 3.2: Sintesi di 1-cloro-2-deossi-3,5-di-O-p-clorobenzoil-α-D-eritro-pentafuranosi (\mathbf{a}_1 , \mathbf{a}_2 , \mathbf{a}_3).

Questi ultimi sono stati quindi condensati con la base siliata 5.6-ciclopentauracile in presenza di trimetilsilil trifluorometansolfonate (TMSOTf) come agente di *coupling* e usando una miscela DCE/ACN come solvente^{5,6,7,8}. Come precedentemente riportato, il tipo di solvente gioca un ruolo fondamentale in queste reazioni. In particolare percentuali di DCE più alte rispetto all'ACN favoriscono la formazione dell'anomero α , mentre una quantità più alta di ACN diminuisce la resa complessiva della reazione favorendo la formazione di prodotti collaterali. I migliori risultati si sono ottenuti con una miscela 4:7 v/v di ACN/DCE: 80% di resa complessiva con un rapporto 65:35 tra gli anomeri β e α . **3a** inoltre consente una buona precipitazione selettiva dell'anomero β sottoforma di solido cristallino.



Schema 3.3: Sintesi del nucleoside modificato fosforamidito (P^*): i) 6,7-diidro-1H-ciclopenta[d]pirimidina-2,4(3H,5H)-dione (**1**, 3,28 mmol), HMDS (7 ml), $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (0.32 mmol) 2h at 150°C; ii) **2** (3,2 mmol), 2-deossi- 3,5-*p*-Clorobenzoil- α -D-pentofuranosil cloruro (**a** 3.05 mmol), TMSOTf (400 μl sciolti in 2 ml of DCE), ACN (20 ml), DCE (35 ml); iii) NaOH (0.5M in MeOH); iv) **4** (0,63 mmol), DMTCl (0.5 mmol), DMAP (0.077 mmol), Py dry (8 ml), ACN dry (4 ml); **5**, (0.56 mmol) DIPEA (2,24 mmol), 2-cianoetil-diisopropil-clorofosforamidito (0,838 mmol), DCM (5 ml).

Il β nucleoside **3** è stato quindi sottoposto a reazione di deprotezione per liberare le funzioni alcoliche dello zucchero utilizzando una soluzione metanolica di NaOH. Tale metodica è stata preferita a quella che prevede l'idrolisi basica del legame con il gruppo protettore *p*-clorobenzilestere mediante ammoniaca in metanolo, sia per le rese maggiori sia per la maggiore sicurezza di esecuzione, a causa della volatilità dell' NH_3 alla

temperatura di circa 55°C a cui essa viene eseguita. Il grezzo di reazione viene sottoposto ad una estrazione H₂O/CHCl₃. Le fasi acquose sono raccolte, essiccate sottovuoto e cromatografate su colonna per ottenere la β-5,6-trimetilen-2'-deossiuridina.

Il nucleoside modificato **4** è stato quindi caratterizzato mediante spettrometria di massa e spettroscopia NMR mono e bidimensionale. Al fine di poterlo impiegare nella sintesi oligonucleotidica in fase solida, esso è stato quindi sottoposto alle opportune reazioni di monotrilitazione e fosfitilazione seguendo i protocolli standard⁹. Sostituendo una alla volta i residui T lungo la sequenza del TBA sono stati ottenuti gli oligomeri di **tabella 3.5**.

ON	SEQUENZA
I	GGTTGGTGTGGTTGG
IIp	GGP*GGTGTGGTTGG
IIIp	GGTP*GGTGTGGTTGG
IVp	GGTT GGP*GTGGTTGG
Vp	GGTTGGTG P*GGTTGG
VIp	GGTTGGTGTGG P*TGG
VIIp	GGTTGGTGTGGT P*GG

Tabella 3.5: TBA ed analoghi sintetizzati utilizzando in nucleotide P come analogo della timidina*

3.7.2 Spettroscopia UV e CD

Per gli esperimenti CD sono stati preparati campioni ad una concentrazione finale di 10 μ M in due differenti tamponi: 100mM KCl, 10mM KH₂PO₄, pH 7.4 (TK) e 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM NaH₂PO₄, pH 7.4 (PBS) dove quest'ultimo mima le normali condizioni saline fisiologiche. Gli spettri CD ottenuti per i TBA modificati mostrano un massimo positivo a 295nm e ed un massimo negativo a 265nm, confermando che l'introduzione del monomero modificato non influenza la capacità dell'aptamero di formare strutture quadruplex antiparallele¹⁰.

Con l'obiettivo di stabilire la molarità della struttura formata, anche per gli analoghi **IIp-VIIp**, è stata monitorata l'ampiezza della banda CD a 295nm prodotta da ONs a tre differenti concentrazioni¹¹: 1x10⁻⁴M, 1x10⁻⁵M, 1x10⁻⁶M. Il TBA, come precedentemente riportato nel paragrafo 3.3.2, forma una struttura quadruplex intra o intermolecolare in base alla natura del catione presente in soluzione (sodio e potassio rispettivamente). I profili dicroici registrati per gli ONs **IIp-VIIp** in TK mostrano, come per il TBA, una dipendenza della banda dicroica dalla concentrazione indicando un arrangiamento di tipo intermolecolare (**fig. 3.18**).

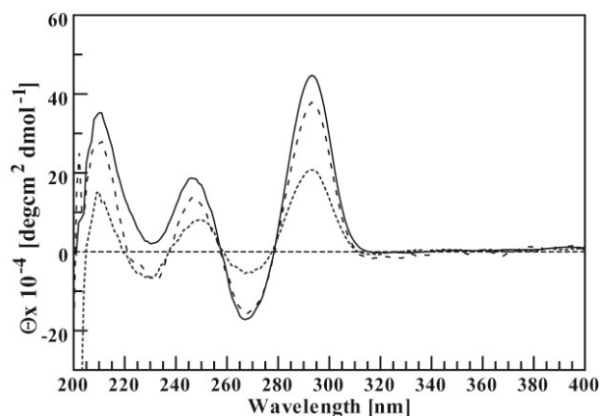


Figura 3.18: Spettri CD registrati a 10°C per **IIp** a tre diverse concentrazioni in TK: 1×10^{-4} M (linea continua); 1×10^{-5} M (linea punteggiata); 1×10^{-6} M (linea tratteggiata).

Tuttavia, mentre in tampone fisiologico il TBA forma una struttura quadruplex monomolecolare, gli ONs **IIp** -**VIIp** danno luogo a segnali dicroici dipendenti dalla concentrazione del campione (**fig. 3.19b**). Per escludere che la dipendenza dell'ellitticità molare dalla concentrazione fosse dovuta ad interazioni *end-to-end stacking* tra i quartetti di G posti ai terminali indotte dalla basse temperature, gli esperimenti sono stati ripetuti anche a 30°C per i campioni in TK e a 16°C in PBS ottenendo gli stessi risultati.

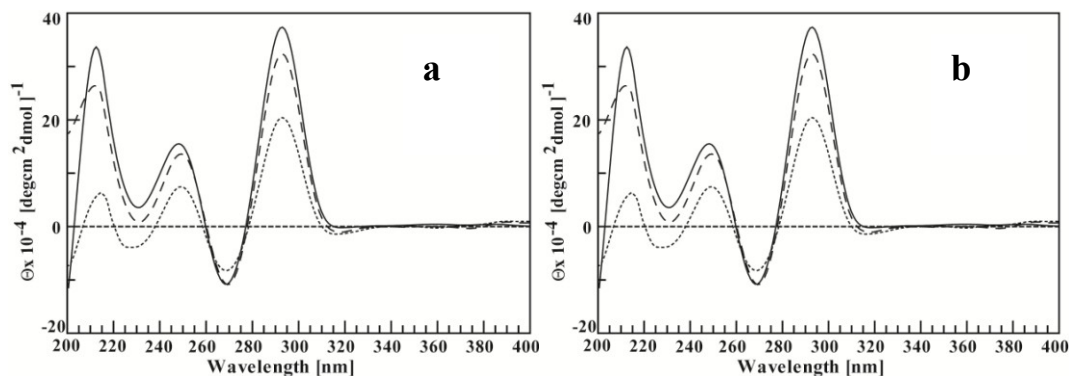


Figura 3.19: Spettri CD registrati a 10°C per **IIIp** (a) e **IVp** (b) a tre diverse concentrazioni in PBS: $1 \times 10^{-4} M$ (linea continua); $1 \times 10^{-5} M$ (linea tratteggiata); $1 \times 10^{-6} M$ (linea punteggiata)

La stabilità termica delle strutture quadruplex formate dai modificati **IIp-VIIp** è stata valutata mediante esperimenti di denaturazione termica^{12,13,14,15} monitorando la variazione di intensità della banda dicroica a 295nm in funzione della temperatura (**fig. 3.20**).

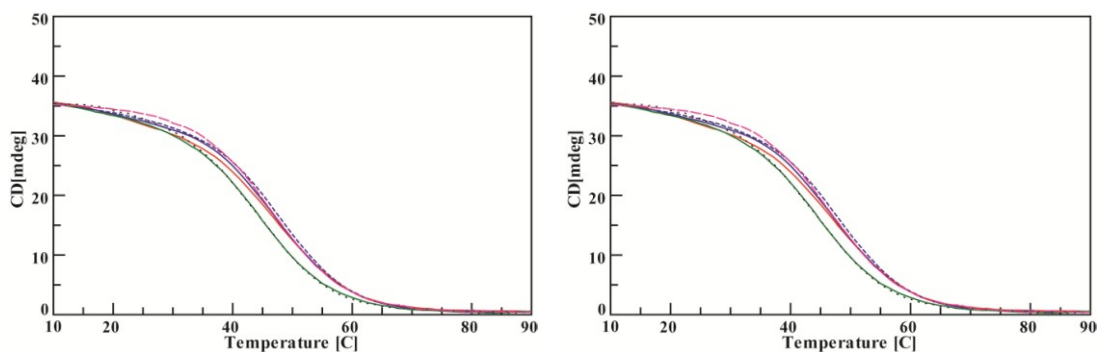


Figura 3.20: Curve di ottenute per gli **IIp-VIIp** a) in PBS e b) in TK. Velocità di scansione fissata a 0.5°C/min. **IIp** (linea rossa); **IIIp** (linea nera tratteggiata); **IVp** (linea blu tratteggiata); **Vp** (linea rossa tratteggiata); **VIp** (linea viola); **VIIp** (linea verde)

I valori delle temperature di fusione estrapolati dai profili di *melting* sono riassunti in **tabella 3.6**. Sia in TK che in PBS per tutti i modificati **IIp-VIIp**, le temperature di fusione risultano più basse di quelle ottenute per il TBA, indicando che il nucleotide modificato induce un effetto destabilizzante generalizzato. Tale fenomeno è particolarmente accentuato nel caso di **IIIp** e **VIIp** con un abbassamento della T_m di circa 6°C sia in TK che in PBS.

ON	SEQUENZA	T_m (TK)	T_m (PBS)
I	GGTTGGTGTGGTTGG	50	33
IIp	GGP3*GGTGTGGTTGG	47	30
IIIp	GGTP4*GGTGTGGTTGG	44	25
IVp	GGTT GP7*GTGGTTGG	48	31
Vp	GGTTGGTG P9*GGTTGG	47	26
VIp	GGTTGGTGTGG 12*TGG	47	27
VIIp	GGTTGGTGTGGT 13*GG	44	26

Tabella 3.6: valori delle temperature di melting (T_m) ottenute per il TBA ed i suoi analoghi **IIp-VIIp** in TK e in PBS.

Per tutti i modificati **IIp-VIp** sono stati registrati spettri UV differenza (fig. 3.21) e spettri CD a differenti temperature (fig. 3.22) per campioni in TK e in PBS.

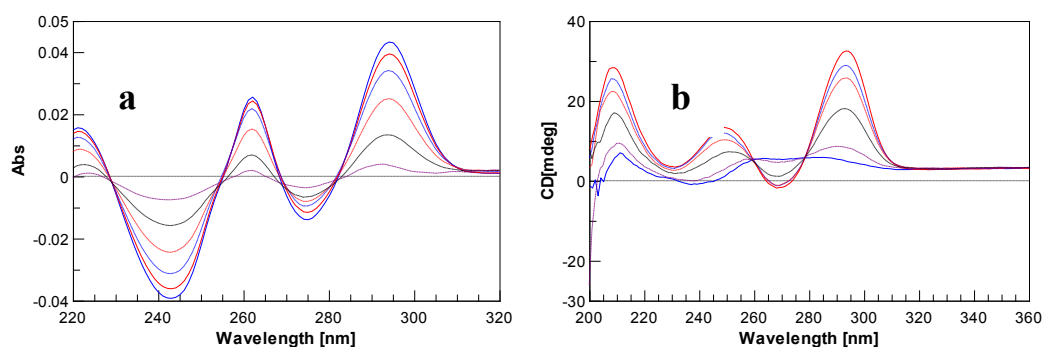


Figura 3.21: spettri differenza ottenuti per **VIp** in PBS (a) e in TK (b). Ciascun profilo è stato ottenuto sottraendo lo spettro registrato a 65°C e a 80°C (rispettivamente in PBS e in TK) da quello ottenuto a ciascuna temperatura (10°, 20°C, etc)

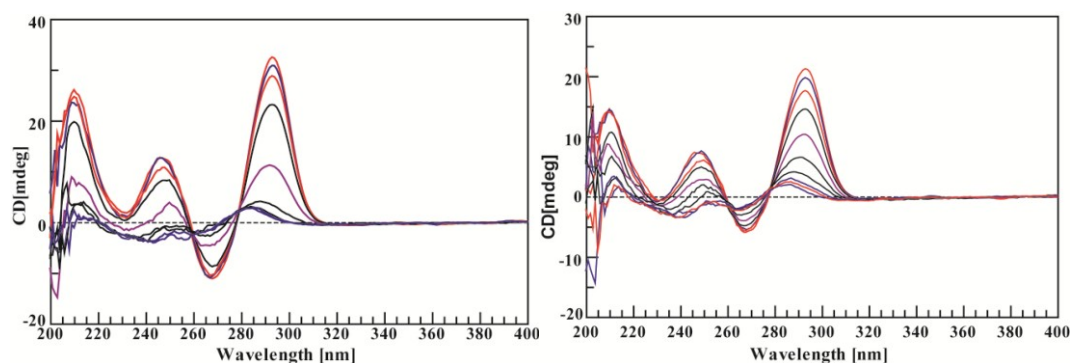


Figura 3.22: Spettri CD registrati a differenti temperature per **IIp** (a) in PBS (10°-50°C, Δt 5°C) (b).e in TK (10°-90°C, Δt 10°C)

La presenza di punti isosbestici ed isoellitici rispettivamente negli spettri UV differenza e nei profili dicroici indica che sia in TK che in PBS è presente un'unica tipologia di struttura quadruplex bimolecolare.

3.7.3. Spettroscopia ^1H NMR

Gli spettri ^1H NMR dei modificati **IIp-VIIp** appaiono molto simili a quello del TBA. La regione tra 11.5 e 12.5ppm presenta otto segnali ben risolti attribuibili ai protoni imminici scambiabili coinvolti nella formazione dei legami ad idrogeno di tipo *Hoogsteen* tra le due tetradi di G. Nella regione degli aromatici invece (6.8-8.5 ppm) si notano 15 segnali attribuibili ai protoni H8 e H6 delle basi guanine e timine rispettivamente^{16,17,18}. Incrementando la temperatura l'intensità dei segnali imminici diminuisce progressivamente, confermando il profilo di destrutturazione della struttura quadruplex evidenziato dagli esperimenti di CD *melting* (**fig. 3.23**).

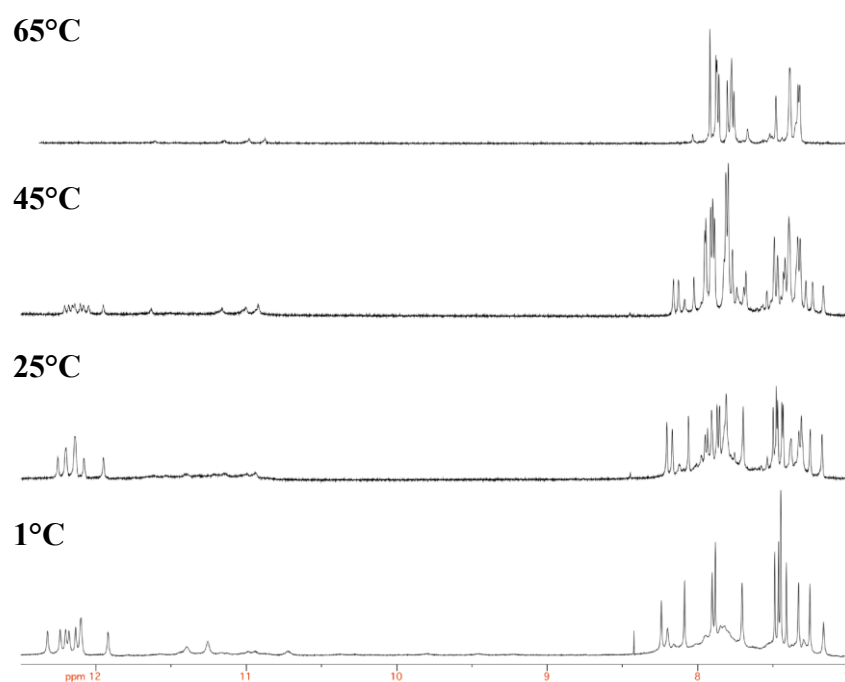


Figura 3.23: spettri ^1H NMR di **VIIp** in TK acquisiti a differenti temperature.

3.7.4 Esperimenti elettroforetici

Per confermare i dati spettroscopici circa la molecolarità dei modificati **IIp-VIIp** sono stati condotti esperimenti elettroforetici su gel di acrilamide/bisacrilammide a diverso grado di reticolazione (12, 16 e 20%). Come standard di riferimento sono stati utilizzati l' ON TG₄T il quale è noto formare una struttura quadruplex tetra molecolare, un dsDNA ($5'$ TCAGTTAGCTCTGTT $3'$ x $5'$ AACAGAGCTAACTGA $3'$) ed il filamento *random coil* $5'$ AACAGAGCTAACTGA $3'$ (**fig. 3.24**). La mobilità elettroforetica del TBA e degli analoghi **IIp-VIIp** risulta essere

paragonabile a quello del filamento dsDNA di peso molecolare comparabile, confermando ancora una volta la formazione di specie dimeriche.



Figura 3.24: Elettroforesi su gel di poliacrilammide al 20%. Linea 1: quadruplex monomolecolare formata dalla ripetizione telomerica $(GGGTTA)_4$; linea 2: singolo filamento $5' AACAGAGCTAACTGA^3$; linea 3: dsDNA $5' TCAGTTAGCTCTGTT^3 \times 5' AACAGAGCTAACTGA^3$; linea 4: TBA NAT; linea 5: IIp; linea 6: IIIp, linea 7: IVp, linea 8: Vp, linea 9: VIp, linea 10: VIIp.

3.7.5 Saggi farmacologici

Gli esperimenti biologici sono stati condotti seguendo le stesse modalità precedentemente descritte nel paragrafo 3.3.4

Come si evince dai risultati ottenuti con il saggio del tempo di protrombina^{19,20} (PT) riportati in **tabella 3.7**, la sostituzione delle posizioni 4 e 13 comporta una perdita totale dell'attività farmacologica sia alle concentrazioni 2 che 20 μ M. Il profilo farmacologico di **VIp**

appare invece particolare in quanto sebbene meno attivo del TBA alla concentrazione 2 μ M, esso risulta essere significativamente più attivo alla concentrazione più 20 μ M. La sostituzione nella posizione 7 produce un aptamero (**IVp**) più attivo del TBA ad entrambe le concentrazioni testate.

ON	PT (2 μ M)	PT (20 μ M)
I	22.60 \pm 1.83	53.68 \pm 1.48
IIp	15.07 \pm 0.20	48.40 \pm 1.32
IIIp	12.50 \pm 0.37	16.23 \pm 0.51
IVp	22.57 \pm 0.30	54.50 \pm 1.22
Vp	15.25 \pm 0.20	35.80 \pm 1.10
VIp	15.47 \pm 0.47	62.67 \pm 0.95
VIIp	13.50 \pm 0.23	16.30 \pm 0.35
PBS		12.49 \pm 0.39

Tabella 3.7: Valori di PT, espressi in secondi, ottenuti dopo incubazione con gli ONs alle concentrazioni 2 e 20 μ M per un tempo di 15min di incubazione..

Analogamente a quanto fatto per la prima serie di analoghi del TBA, l'attività biologica è stata investigata ulteriormente utilizzando fibrinogeno purificato^{19,21}. Evitando in questo modo interazione con altri componenti del plasma l'attività anticoagulante può essere univocamente attribuita ad un'azione diretta sulla trombina. Tali esperimenti hanno confermato la totale mancanza di attività per **IIIp** e **VIIp**. In **figura 3.25** sono riportati i risultati ottenuti per i due oligomeri attivi **IVp** e **VIp**.

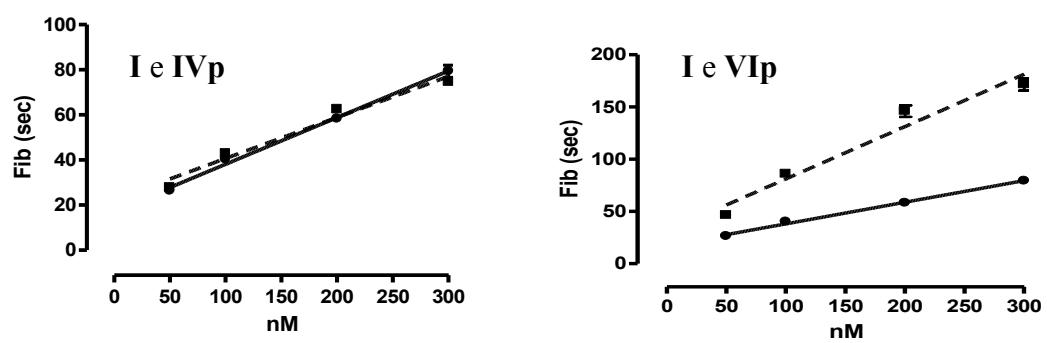


Figura 3.25: rette ottenute per IVp e VIp (linee tratteggiate) a confronto con i risultati ottenuti per il TBA (linea continua)

3.8 Conclusioni

Il nucleoside modificato 5,6- trimetilen-deossiuridina, opportunamente funzionalizzato come ‘fosforammidito *building block*’ è stato utilizzato per sostituire una alla volta le timidine sia dei *loop* piccoli TT che del *loop* grande TGT lungo la sequenza del TBA. I dati spettroscopici ottenuti indicano che tutti gli analoghi del TBA (**IIp-VIIp**) sono in grado di formare strutture quadruplex antiparallele. La molecolarità di tali strutture è stata valutata registrando spettri per campioni a differente concentrazione di ON e misurando l’intensità della banda dicroica, espressa come ellitticità molare, a 295nm. Contrariamente a quanto accade per il TBA, il *folding* per i modificati **IIp-VIIp** risulta essere sempre di tipo intermolecolare, indipendentemente dalla natura del catione in soluzione. Gli esperimenti di CD *melting* hanno evidenziato che le strutture quadruplex formate, tanto in TK che in PBS, sono meno stabili della quadruplex formata dal TBA, indicando che la modifica produce un effetto destabilizzante generalizzato. Nel caso di **IIIp** e **VIIp** la più pronunciata perdita di stabilità può essere spiegata considerando che nella struttura riportata per il TBA i nucleotidi 4 e 13 danno interazioni π - π *stacking* con il quartetto di G adiacente e sono uniti tra di loro mediante un legame ad idrogeno. Questa interazione può essere parzialmente o totalmente persa quando viene introdotto il monomero modificato.

Il saggio del tempo di protrombina ha evidenziato una completa perdita di attività per gli ONs sostituiti nelle posizioni 4 e 13. Ciò indica che la modifica introdotta perturba due punti importanti di riconoscimento TBA-trombina. L'introduzione del monomero modificato nelle posizioni 7 e 12 produce al contrario un miglioramento dell'attività antitrombinica confermando quindi che, come precedentemente ottenuto, entrambi i siti dovrebbe essere tenuti in considerazione nello sviluppo di nuovi aptameri analoghi del TBA. Studi di *molecular modelling* per questi analoghi del TBA contribuiranno a fare luce sui meccanismi di riconoscimento alla base delle relazioni struttura-attività.

3.9 Procedure sperimentali

3',5'-di-O-p-clorobenzoil-2'-deossi-1-O-metil ribosio (b1)

1-O-metil-2-deossi-D ribosio (3.37 mmol) è stato sciolto in 22 ml di piridina anidra. La soluzione è stata raffreddata a 0°C e lentamente è stato aggiunto il benzoil cloruro (1.2 ml). Dopo 10 minuti a freddo la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per tutta la notte e poi interrotta per aggiunta di 3 ml di MeOH anidro. Dopo 20 minuti sotto agitazione il solvente è stato rimosso *in vacuo*, il grezzo sospeso in H₂O ed estratto due volte con cloroformio. Successivamente la fase organica è stata lavata con una soluzione satura di NaHCO₃, poi con una soluzione di HCl 1N e infine con H₂O. (Resa 90%); R_f 0.6 (esano / EtOAc 8:2 v/v).

¹H NMR (CDCl₃): δ=8.00 (dd, 4H); δ=7.40 (dd, 4H); δ=5.60 (t, 1H); δ=5.50 (dd, 1H); δ=4.75 (m, 1H); δ=4.60 (m, 2H); δ=3.40 (s, 3H); δ=2.50 (m, 2H).

[M+H]= 425; [M+Na]= 447.

2'-deossi-3',5'-di-O-p-clorobenzoil-α-D-eritro-pentofuranosil cloruro (a1)

Il derivato **b1** (8.2 mmol) è stato disciolto in 26 ml di etere e lentamente è stata insufflata una soluzione satura di HCl. Tale soluzione è stata preparata per reazione tra acido solforico e cloruro di sodio, mediante

gocciolamento dell'acido da un imbuto ad un pallone contenente il sale. L'acido cloridrico è stato, quindi, fatto gorgogliare sotto cappa al pallone contenente lo zucchero a cui è stata aggiunta una soluzione di acido acetico (35 ml, 1.3 equiv.), che quindi di esso si è saturata. Il pallone di reazione è stato prima posto in ghiaccio a 0°C e successivamente raffreddato a -20°C. fino a che non si è avuto la formazione di una massa cristallina di colore bianco (dopo circa 1h). I cristalli sono stati quindi filtrati e lavati con una soluzione fredda di etere/n-esano 1:1 v/v. Infine i cristalli sono stati anidrificati su P₂O₅ per tutta la notte. (Resa 90%); Rf 0.6 (n-esano/EtOAc 8:2 v/v).

¹H NMR (CDCl₃): δ=8.00 (dd, 4H); δ=7.40 (dd, 4H); δ=6.43 (t, 1H); δ=5.50 (dd, 1H); δ=4.83 (t, 1H); δ=4.63 (m, 2H); δ=2.80 (m, 2H).

[M+H]= 429; [M+Na]= 451.

β-3',5'-di-O-p-clorobenzoil-5,6-trimetilen-2'-deossiuridina (3a)

A 3,34 mmol della base modificata **1** sono stati aggiunti 0.32 mmol di (NH₄)₂SO₄ (0.1eq) e 7ml di esametildisilazano (HMDS). La miscela di reazione è stata lasciata a refluxo a 150°C sotto flusso costante di argon. La reazione è stata interrotta dopo circa 5 ore, allo scadere delle quali, la miscela è apparsa chiarificata. Dopo aver allontanato l'eccesso di HMDS *in vacuo*, la miscela di reazione è stata risospesa in ACN (20ml) e DCE (35ml). È stato quindi aggiunto **a1** (3.05mmol) insieme a 400μl di

TMSOTf disciolto in 2ml di DCE. La sospensione è stata tenuta a 0°C per 10 minuti e poi lasciata sotto agitazione per tutta la notte a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata quindi filtrata e il residuo solido lavato con CHCl₃. La fase organica è stata poi estratta due volte con una soluzione al 10% di NaH₂CO₃, due volte con H₂O e infine anidrificata su MgSO₄. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia su colonna impaccata con gel di silice eluita con EtOAc/n-esano 1:1 v/v. Dopo cromatografia su colonna per allontanare l'eccesso di materiale non reagito, la miscela dei due anomeri è stata separata utilizzando una miscela 3:1 acetato di etile/ n-esano, la quale ha permesso la precipitazione selettiva del nucleoside β-anomero rispetto all'α. Il precipitato ottenuto è stato ulteriormente lavato con tale soluzione fino ad ottenere il solo β pulito. (Resa β-anomero: 52%); Rf: 0.6 (CHCl₃/MeOH 94:6 v/v)

(β-anomero) ¹H NMR (CDCl₃): δ=9.63 (s, 1H, NH); δ=7.98-7.96 (dd, 4H, H aromatico); δ=7.41-7.39 (dd, 4H, H aromatico); δ=6.17 (t, 1H, H1'); δ=5.75 (m, 1H, H3'); δ=4.75-4.61 (dd, 2H, H5' e H5''); δ=4.43 (m, 1H, H4'); δ=3.18-2.45 (m, 2H, H2' e H2''); δ=2.97-2.65 (m, 4H, CH₂); δ=2.01 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (CDCl₃): δ=167.0 (CO benzoile); δ=160.8 (C4); δ=155.8 (C2); δ=151.3 (C6); δ=138.1 (C aromatico); δ=131.1 (C aromatico); δ=128.8 (C aromatico); δ=128.6 (C aromatico);

$\delta=112.4$ (C5); $\delta=86.9$ (C4'); $\delta=85.1$ (C1'); $\delta=70.0$ (C3'); $\delta=61.4$ (C5');
 $\delta=32.0$ (CH₂); $\delta=26.3$ (CH₂); $\delta=21.1$ (CH₂).

[M+H]= 545; [M+Na]= 567.

β -5,6-trimetilen-2'-deossiuridina (4)

Il prodotto di condensazione **3a** è stato disciolto in una soluzione di NaOH 0.5M in MeOH. La miscela è stata lasciata sotto agitazione elettromagnetica a 55°C per circa 3 ore. E' stata interrotta neutralizzando con una soluzione di HCl 0.1M. (Resa: 98%), R_f= 0.3 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5 v/v).

¹H NMR (D₂O): $\delta=5.90$ (t, 1H, H1'); $\delta=4.35$ (m, 1H, H3'); $\delta=3.72$ (m, 1H, H4'); $\delta=3.65-3.58$ (m, 2H, H5' e H5''); $\delta=2.95-2.85$ (m, 2H, H2' e H2''); $\delta=2.72-2.51$ (m, 4H, CH₂); $\delta=1.99$ (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (D₂O): $\delta=160.8$ (C4); $\delta=155.8$ (C2); $\delta=151.3$ (C6); $\delta=112.4$ (C5); $\delta=86.9$ (C4'); $\delta=85.1$ (C1'); $\delta=70.0$ (C3'); $\delta=61.4$ (C5'); $\delta=32.0$ (CH₂); $\delta=26.3$ (CH₂); $\delta=21.1$ (CH₂).

[M+H]= 269

5'-O-(4,4'-dimetossitritil)-5,6-trimetilen-2'-deossiuridina (5)

4 (0.63 mmol), 4,4'-dimetossitritilcloruro (0,60 mmol) e DMAP (0.077 mmol) sono stati disciolti in piridina (8 ml) e acetonitrile (4 ml) anidri. La miscela di reazione è stata lasciata per 1h sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente e sotto flusso di argon.

Metanolo anidro è stato aggiunto per interrompere la reazione. Dopo 30 min sotto agitazione, i solventi sono stati allontanati *in vacuo* e il grezzo purificato mediante cromatografia su colonna impaccata su gel di silice ed eluita con EtOAc/n-esano/TEA 50:50:5 v/v/v per dare un solido di colore giallo chiaro. (Resa 56%); Rf 0.51 (1:1 v/v EtOAc/n-esano).

^1H NMR (CDCl_3): $\delta=8.35$ (s, 1H, NH); $\delta=7.41$ (d, 2H, H aromatico); $\delta=7.35$ (d, 4H, H aromatico); $\delta=7.25$ (t, 2H, H aromatico); $\delta=7.21$ (t, 1H, H aromatico); $\delta=6.81$ (d, 4H, H aromatico); $\delta=6.13$ (t, 1H, H1'); $\delta=4.59$ (m, 1H, H3'); $\delta=3.82$ (m, 1H, H4'); $\delta=3.80$ (s, 6H, $(\text{CH}_3\text{O})_2$); $\delta=3.45$ - 3.35 (m, 2H, H5' e H5''); $\delta=2.95$ - 2.85 (m, 2H, H2' e H2''); $\delta=2.72$ (m, 1H, CH_2); $\delta=2.65$ (m, 2H, CH_2); $\delta=2.21$ (m, 1H, CH_2); $\delta=1.99$ (m, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta=160.8$ (C4); $\delta=158.8$ (C aromatico); $\delta=155.8$ (C2); $\delta=151.3$ (C6); $\delta=143.0$ (C aromatico); $\delta=135.3$ (C aromatico); $\delta=129.4$ (C aromatico); $\delta=129.0$ (C aromatico); $\delta=128.4$ (C aromatico); $\delta=126.0$ (C aromatico); $\delta=114.0$ (C aromatico); $\delta=112.4$ (C5); $\delta=89.1$ (PhCPhOMe_2); $\delta=86.9$ (C4'); $\delta=85.1$ (C1'); $\delta=70.0$ (C3'); $\delta=61.4$ (C5'); $\delta=56.0$ ($(\text{CH}_3\text{O})_2$); $\delta=32.0$ (CH_2); $\delta=26.3$ (CH_2); $\delta=21.1$ (CH_2).

***β -3'-O-[N,N-diisopropilammino-(2-cianoetil)fosfinil]-5'-O-(4,4'-
dimetossitritil)-5,6-trimetilen-2'-deossiuridina (6)***

Il derivato dimetossitritilato 5 (0.559 mmol) è stato anidrificato *in vacuo* per circa 12ore. E' stato quindi disciolto in DCM anidro (5ml) e DIPEA (2.24 mmol) sotto flusso di argon. Lentamente è stato aggiunto alla soluzione l'agente fosfitilante 2-cianoetil diisopropilclorofosforammidito (0.838mmol). Dopo circa 20 minuti la reazione è stata interrotta per aggiunta di MeOH anidro, diluita con EtOAc (15ml) e infine lavata prima con una soluzione al 10% di NaHCO₃ (15ml) e poi con una soluzione satura di NaCl (15ml). La fase organica è stata anidrificata su MgSO₄ e concentrata *in vacuo*. Il residuo è stato cromatografato su gel di silice eluito con DCM/EtOAc/TEA 80:10:10 v/v/v. Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono state unite e concentrate sotto vuoto ottenendo il prodotto sottoforma di un solido spugnoso bianco. (Resa 90%); Rf 0.51 (1:1 v/v EtOAc/esano)

¹H NMR (CDCl₃): δ =9.63 (s, 1H, NH); δ =7.41 (d, 2H, H aromatico); δ =7.35 (d, 4H, H aromatico); δ =7.25 (t, 2H, H aromatico); δ =7.21 (t, 1H, H aromatico); δ =6.81 (d, 4H, H aromatico); δ =6.13 (t, 1H, H1'); δ =4.65-4.55 (m, 1H, H3'); δ =3.95 (m, 1H, H4'); δ =3.80-3.62 (m, 2H, H5' e H5''); δ =3.77 (s, 6H, (CH₃O)₂); δ =3.50 (m, 2H, N[CH(Me₂)₂]); δ =3.30 (m, 2H, OCH₂CH₂CN); δ =2.95-2.85 (m, 2H, H2' e H2''); δ =2.70 (m, 2H, CH₂CN); δ =2.60 (m, 2H, CH₂); δ =2.35 (m, 2H, CH₂); δ =2.21 (m,

1H, CH₂); δ=1.95 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (CDCl₃): δ=160.8 (C4); δ=158.8 (C aromatico); δ=155.8 (C2); δ=151.3 (C6); δ=143.0 (C aromatico); δ=135.3 (C aromatico); δ=129.4 (C aromatico); δ=129.0 (C aromatico); δ=128.4 (C aromatico); δ=126.0 (C aromatico); δ=117.4 (CN); δ=114.(C aromatico); δ=112.4 (C5); δ=89.1 (PhCPhOMe₂); δ=86.9 (C4'); δ=85.1 (C1'); δ=70.0 (C3'); δ=61.4 (C5'); δ=56.0 ((CH₃O)₂); δ=55.8 (OCH₂CH₂CN); δ=36.3 (N[CH(Me₂)₂]); δ=23.7 (N[CH(CH₃)₂]₂); δ=32.0 (CH₂); δ=26.3 (CH₂); δ=21.1 (CH₂); δ=20.1 (CH₂CN).

[M+H]= 771

Sintesi degli oligomeri

Il TBA ed i modificati **IIp-VIIp** sono stati sintetizzati utilizzando resine CPG *high-loading* come supporto solido e seguendo il protocollo standard del fosforamidito. Il distacco degli ONs dal supporto solido è avvenuto per trattamento con una soluzione ammoniacale al 33% per tutta la notte a 55°C. I filtrati e di lavaggi sono stati raccolti insieme, concentrati sotto vuoto, disciolti in H₂O, filtrati e purificati per HPLC usando una colonna a scambio ionico del tipo Nucleogen Sax eluita con un gradiente lineare (dallo 0 al 30%B in 30min) di tamponi fosfato a pH 7.0 (A: 20mM NaH₂PO₄ contenente 20% ACN e B: 1M NaCl, 20mM NaH₂PO₄ contenente 20% ACN).

Gli oligomeri sono stati successivamente desalificati mediante cromatografia ad esclusione molecolare su Biogel P2-fine. Il grado di purezza è stato controllato mediante HPLC utilizzando una colonna a fase inversa (C18 Purospher Star®, Merck) ed elettroforesi in condizioni denaturanti su gel di poliacrilammide al 20% contenente urea 7M. La concentrazione dei campioni utilizzati per gli esperimenti UV e CD è stata determinata spettrofotometricamente misurando l'assorbanza a 260nm a 80°C ed utilizzando i coefficienti di estinzione molare calcolati secondo il metodo di Gray. Per il monomero modificato il coefficiente di estinzione molare è stato considerato uguale a quello di una timidina non modificata.

Spettroscopia UV

Ciascun ON, alla concentrazione finale di 10µM è stato disciolto in TK (100mM KCl, 10mM KH₂PO₄, pH 7.0) o PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM NaH₂PO₄, pH 7.4). Gli spettri UV differenza sono stati ottenuti per sottrazione dello spettro registrato a 65°C da quelli ottenuti a ciascuna temperatura (10, 15, 20, 25, 30 e 35°C).

Spettroscopia CD

Gli spettri CD sono stati registrati da 200 a 360nm con una velocità di scansione di 100nm/min (risposta:16sec, bandwidth: 1.0nm). Prima della scansione sono stati equilibrati per 30 min a ciascuna temperatura. Ogni

profilo CD è stato ottenuto come media di tre scansioni dalle quali è stato sottratto lo spettro del tampone da solo.

Per valutare la dipendenza della banda dicroica a 295nm (espressa come ellitticità molare) dalla concentrazione dell'ON in PBS e in TK, sono stati preparati campioni a tre differenti concentrazioni $1 \times 10^{-4} \text{M}$, $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $1 \times 10^{-6} \text{M}$ e utilizzate cellette in quarzo aventi cammino ottico rispettivamente di 0.1, 0.5 e 1cm. Per la registrazione degli spettri CD a differenti temperature sono stati utilizzati campioni in TK o in PBS ad una concentrazione di $1 \times 10^{-5} \text{M}$. Gli esperimenti di CD *melting* sono stati condotti monitorando l'intensità della banda dicroica a 295nm con l'incremento della temperatura (velocità di scansione $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$)

Esperimenti elettroforetici

Gli esperimenti elettroforetici sono stati condotti su gel di poliacrilammide (di dimensioni $14 \times 16 \times 0.1$) al 12, 16 e 20% (29:1 acrilammide/bisacrilammide), usando un apparecchiatura BIORAD equipaggiata con Power-Pack 3000. I gel, termostatati a 4°C sono stati fatti correre per 7h con un voltaggio costante di 80V (160mA). Come *buffer* di corsa è stato utilizzato TBE (tris-acido borico- EDTA) addizionato di 100mM KCl a pH 7.4. I campioni dopo essere stati sottoposti a procedura di *annealing*, sono stati equilibrati a 4°C per 24h. $5\mu\text{l}$ della soluzione degli ONs sono stati miscelati con $5\mu\text{l}$ di un buffer di

caricamento (TBE 75%, glicerolo 25%) e caricati su gel ad una concentrazione finale di 10 μ M. I gel, dopo la corsa, sono stati trattati con una soluzione colorante di Syber Green per 30min e visualizzati con un sistema di acquisizione Biorad Gel Doc XR.

Esperimenti NMR

I campioni per l'analisi NMR sono stati preparati ad una concentrazione di 0.5mM in H₂O/D₂O (9:1 v/v) con una concentrazione finale in sali di 130mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄, 0.2mM EDTA.

Saggio del tempo di protrombina (PT)

I campioni di sangue umano sono stati ottenuti mediante prelievi e frazionati per centrifuga a 2000rpm per 5 min. I valori di PT sono stati misurati utilizzando un apparecchio Koagulab Mj equipaggiato con uno specifico kit RecombiPlastin Hemosil (Inst.Labs.Lexiton, USA).

Per la valutazione del PT a 20 μ M nell'apposito microtubo sono stati aggiunti 2 μ l dell'ON (alla concentrazione di 1mM in PBS). Dopo 30 sec, 1, 5, 15, 30, 60 minuti di incubazione, sono stati aggiunti 200 μ l della soluzione del Kit contenente tromboplastina. Quest'ultima in presenza di ioni calcio innesca la via estrinseca della coagulazione. La misura del PT per ciascun tempo di incubazione, è stata prodotta in triplicato ed è stato calcolato il valore medio.

Saggio di coagulazione su fibrinogeno purificato

Gli ONs sono stati incubati per 1 min a 37°C in 200µl di una soluzione tampone (20mM Tris acetato, 140mM NaCl, 2.7mM KCl, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, pH 7.4) contenente fibrinogeno (2mg/ml). La trombina è stata disciolta nello stesso tampone e preincubata per 1min a 37°C. Trascorso questo tempo 100µl di trombina sono stati aggiunti alla soluzione contenente fibrinogeno e ON (concentrazione finale della trombina 13nM). Il tempo richiesto per la formazione del coagulo è stato misurato utilizzando un apparecchio Koagulab Mj. Per ciascun ON l'esperimento è stato ripetuto a cinque diverse concentrazioni (20, 50, 100, 175, 200 e 300nM) e i tempi di coagulazione sono stati calcolati considerando la media di sei misure per ciascuna concentrazione. Il tempo basale necessario per la coagulazione è stato determinato misurando il tempo richiesto in assenza di ON. In grafico sono stati riportati i valori del tempo di coagulazione in funzione della concentrazione dell'ON.

Riferimenti bibliografici

- ¹ Coppola, T.; Varra, M., Oliviero, G., Galeone, A., D'Isa, G.; Mayol, L., Morelli, E., Bucci, M-R., Vellecco, V.; Cirino, G.; Borbone, N. *Bioorg. Med. Chem*, **2008**, 16 , 8244-8253
- ² Hoffer, M. *Chem. Ber.*, **1960**, 93, 2777
- ³ Fox, J. J.; Yung, N. C.; Wempen, I.; Hoffer, M. *J. Amer.Chem.Soc.* **1961**, 83, 4066-4070
- ⁴ Kotick, M.P.; Szantay, C.; Bardos, T.J. *J.Org.Chem.* **1969**, 34, 3806-3813
- ⁵ Wilson, J. L.; Hagar, M. W.; El-Kattan, Y. A.; Liotta, D. C. *Synthesis*, **1995**, 12, 1465-1479
- ⁶ Janardhanam, S.; Nambiar, K. P. *Tetrahedron Letters*, **1994**, 35, 3657-3660.
- ⁷ Vorbruggen, H. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 509-520
- ⁸ Vorbruggen, H.; Kroliekiewicz, K.; Benua, B. *Chem. Ber.* **1981**, 114, 1234-1255
- ⁹ Sinha N.D.; Biernat J.; McManus J.; Köster H. *Nucleic Acids Res.* **1984**, 12, 4539-4557.
- ¹⁰ Dapić, V.; Abdomerović, V.; Marrington, R.; Peberdy, J.; Rodger, A.; Trent, J.O.; Bates, P.J. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, 2097–2107
- ¹¹ Fialová, M.; Kypr, J.; Vorlíčková, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 344, 50–54

- ¹² Mergny, J.-L.; Phan, A.-T.; Lacroix, L. *FEBS Lett.*, **1998**, 435, 74–78
- ¹³ Mergny, J.-L.; Li, J.; Lacroix, L.; Amrane, S.; Chaires, J.B. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, e138/1–e138/6
- ¹⁴ Saccà, B.; Lacroix L.; Mergny, J.-L. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 1182–1192
- ¹⁵ Gros, J.; Rosu, F.; Amrane, S.; De Cian, A.; Gabelica, V.; Lacroix, L.; Mergny, J.-L. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35, 3064–3075
- ¹⁶ Wang, K.Y.; McCurdy, S.; Shea, R.G.; Swaminathan, S.; Bolton, P.H. *Biochemistry*, **1993**, 32, 1899–1904
- ¹⁷ Wang, K.Y.; Krawczyk, S.H.; Bischofberger, N.; Swaminathan, S.; Bolton, P.H. *Biochemistry*, 1993, **32**, 11285–11292
- ¹⁸ Macaya, R.F.; Schultze, P.; Smith, F.W.; Roe, J.A.; Feigon, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90, 3745–3749
- ¹⁹ Griffin, C.; Tidmarsh, G.F.; Bock, L.C.; Toole, J.J.; Leung, L.L.K. *Blood*, **1993**, 81, 3271–327
- ²⁰ He, G.-X.; Williams, J.P.; Postich, M.J.; Swaminathan, S.; Shea, R.G.; Terhorst, T.; Law, V.S.; Mao, C.T.; Sueoka, C.; Coutré, S.; Bischofberger, N. *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 4224–4231
- ²¹ Krawczyk, S.H.; Bischofberger, N.; Griffin, L.C.; Law, V.S.; Shea, R.G.; Swaminathan, S. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **1995**, 14, 1109–1111

3.10 Obiettivi: analoghi del TBA contenenti il nucleotide modificato 5,6-trimetilen-N1-[(2,2-diidrossimetilen)propan]-timina

Nei paragrafi 3.3.1e 3.7.1 sono state illustrate le metodiche di sintesi per l'ottenimento in larga scala di due monomeri modificati, rispettivamente N-1[(2,2-diidrossimetilen)propan]timina (T*), il quale presenta un *linker* aciclico in sostituzione del deossiribosio, e la 5,6-trimetilen-deossiuridina la quale presenta invece una base modificata (P*) (**fig. 3.26**)

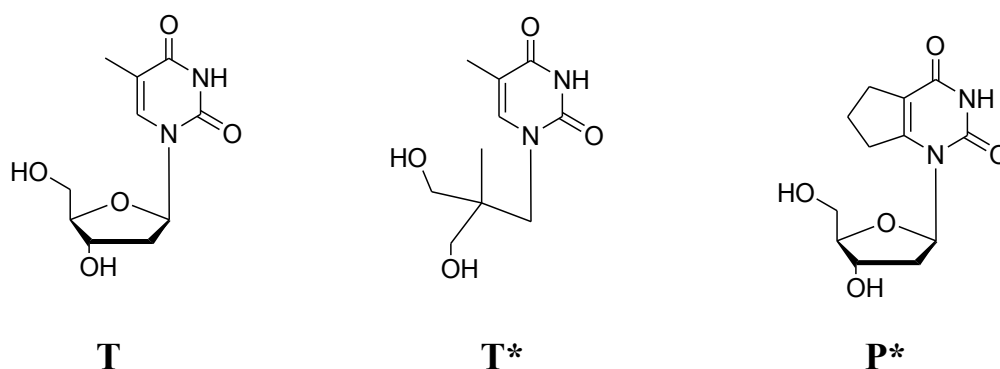


Figura 3.26: confronto tra le strutture della timidina (T) e dei nucleosidi modificati N-1[(2,2-diidrossimetilen)propan]timina (T*) e 5,6-trimetilen-deossiuridina (P*).

I due monomeri, opportunamente funzionalizzati sono stati utilizzati per sostituire una alla volta i residui di timidina sia del *loop* grande che dei *loop* piccoli TT del TBA, ottenendo nuovi aptameri le cui caratteristiche

strutturali e farmacologiche sono state studiate mediante spettroscopia UV, CD, ^1H NMR e test del PT. Gli esperimenti di stabilità termica condotti sulla prima serie di modificati, contenente il monomero T^* , evidenziano che non ci sono sostanziali variazioni rispetto al TBA naturale quando la modifica coinvolge le posizioni 3 e 12 mentre la sostituzione in posizione 7 produce un leggero aumento della stabilità termica. Per quanto riguarda, invece, il saggio farmacologico del PT (tempo di protrombina), l'introduzione del nucleoside aciclico comporta sempre una leggera diminuzione dell'attività anticoagulante, ad esclusione dell'oligomero sostituito in posizione 7 per il quale si evidenzia un incremento dell'attività antitrombinica.

L'introduzione nella sequenza del TBA del monomero P^* (opportunamente funzionalizzato) produce un effetto destabilizzante generalizzato come si evince dal fatto che tutti gli ONs hanno valori della T_m più bassi del TBA. Contemporaneamente la modifica comporta però un miglioramento delle proprietà farmacologiche, in particolare per gli ONs sostituiti nelle posizioni 7 e 12.

Sulla base di questi risultati, con l'intento di ottenere nuovi apameri con buona stabilità termica e al contempo migliore attività antiticoagulante, sono state combinate insieme le due modifiche, ottenendo il nucleoside, 5,6-trimetilen-N1-[(2,2-diidrossimetilen)propan]-timina (D^*) (**fig. 3.27**).

Tale monomero modificato, opportunamente funzionalizzato, è stato inserito, mediante sintesi in fase solida, nelle posizioni 7 e 12 della sequenza del TBA, che sulla base dei dati precedentemente descritti, si erano mostrate particolarmente sensibili alla modifica.

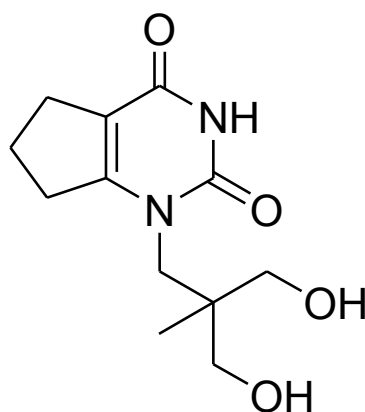


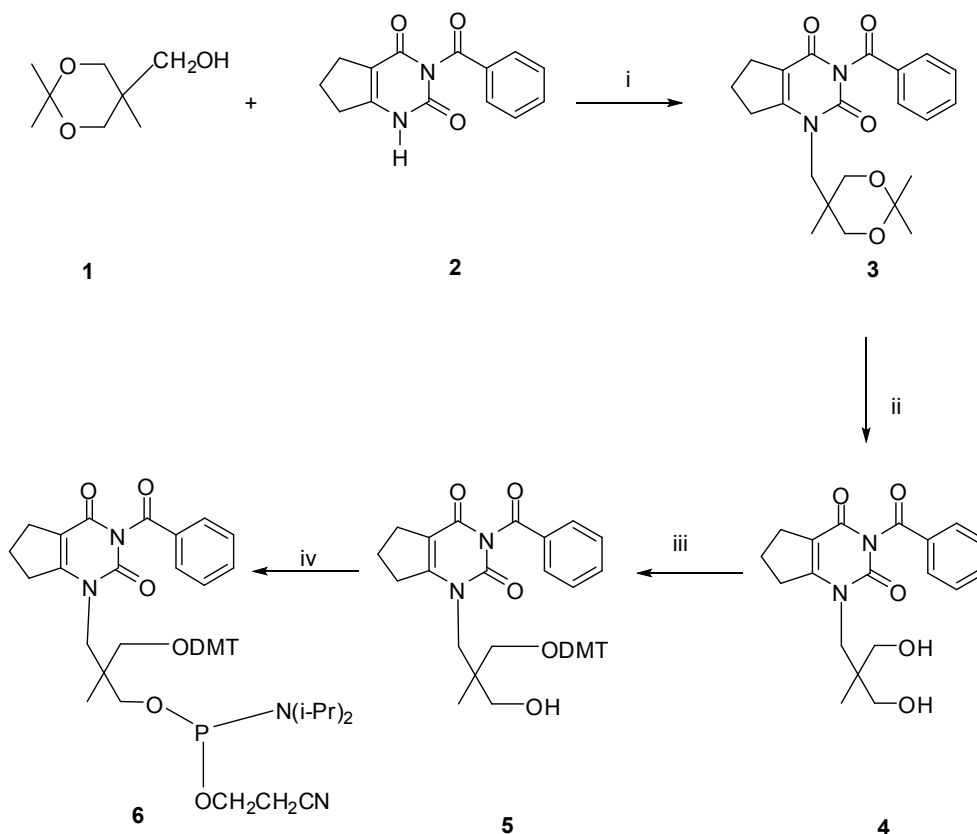
Figura 3.27: nucleoside modificato 5,6-trimetilen-N1-[(2,2-diidrossimetilen)propan]-timina (D*)

3.11 Risultati

3.11.1 Sintesi

La step chiave della sintesi (**schema 3.4**) è la condensazione di Mitsunobu^{1,2} tra la base modificata 5,6-ciclopentauracile opportunamente protetta in posizione 3 con il gruppo benzoile (**2**), ed il *linker* aciclico

(1). Analogamente a quanto descritto nel paragrafo 3.3.1 il prodotto commercialmente disponibile 1,1,1-tris (idrossimetil)etano è stato convertito nel derivato ciclico 5-idrossimetil-2,2,5-trimetil-1,3-diossano (1) mediante reazione con 2,2-dimetossipropano in presenza di piridinio-p-toluensolfonato come catalizzatore. La reazione di Mitsunobu tra la base ed il *linker* è stata condotta utilizzando trifenilfosfina e di-tert-butilazodicarbossilato come agenti di *coupling* e diossano anidro come solvente. Il prodotto di condensazione 3 è stato quindi trattato su resina Dowex[®] 50W-X8(H⁺)³ ottenendo il nucleoside aciclico 5,6-trimetilen-N1-[(2,2-diidrossimetilen)propan]-timina (4). Quest'ultimo è stato caratterizzato mediante spettrometria di massa e spettroscopia NMR. Allo scopo di poterlo utilizzare nella sintesi oligonucleotidica in fase solida esso è stato convertito nel corrispondente derivato fosforammidito (6) secondo le classiche procedure descritte⁴.



Schema 3.4: Sintesi del nucleoside fosforamidito (D^*). Reagenti: i) 1 (9mmol), 2 (4mmol), PPh_3 (6mmol), DtBAD (6mmol), diossano (25ml); ii) 3 (10mmol), DOWEX (30mmol), $H_2O/MeOH$ (1:9 v:v, 50ml), iii) 4 (8mmol), DMTCl (2mmol), DMAP (0.4mmol), Py (32ml); iv) 5 (4mmol), DIPEA (16mmol), 2-cianoetil-diisopropil-clorofosforamidito (2mmol), DCM (35ml).

Il monomero così ottenuto è stato utilizzato come analogo della timidina nelle posizioni 7 e 12 della sequenza del TBA ottenendo i due oligomeri riportati in **tabella 3.8**.

ON	SEQUENZA
I	GGTTGGTGTGGTTGG
IIId	GGTTGGD7*GTGGTTGG
IIIId	GGTTGGTGTGGD12*TGG

Tabella 3.8: TBA ed analoghi sintetizzati utilizzando il nucleotide fosforammidato (D^*) come analogo della timidina.

3.11.2 Spettroscopia CD e UV

Per gli esperimenti CD sono stati preparati campioni ad una concentrazione finale di $10\mu\text{M}$ in due differenti tamponi: 100mM KCl, 10mM KH_2PO_4 , pH 7.4 (TK) e 137mM NaCl, $2,7\text{mM}$ KCl, 10mM NaH_2PO_4 , pH 7.4 (PBS) dove quest'ultimo mima le normali condizioni saline fisiologiche. Gli spettri CD ottenuti per **IIId** e **IIIId** mostrano un massimo positivo a 295nm e ed un massimo negativo a 265nm confermando che, come il TBA naturale, essi formano una struttura quadruplex con filamenti antiparalleli⁵ (**fig. 3.28**).

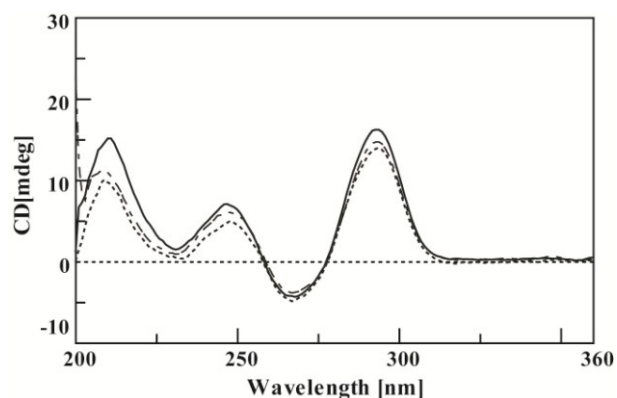


Figura 3.28: profili CD registrati in TK per gli ONs **I** (linea continua), **IIId** (linea tratteggiata) e **IIIId** (linea punteggiata).

Mentre il TBA forma una struttura quadruplex mono o bimolecolare a seconda del catione sodio o potassio presente in soluzione, gli spettri CD registrati per campioni a differente concentrazione⁶ di **IIId** e **IIIId** indicano che l'arrangiamento è sempre di tipo intermolecolare indipendentemente dalla natura del catione in soluzione (**fig. 3.29**)

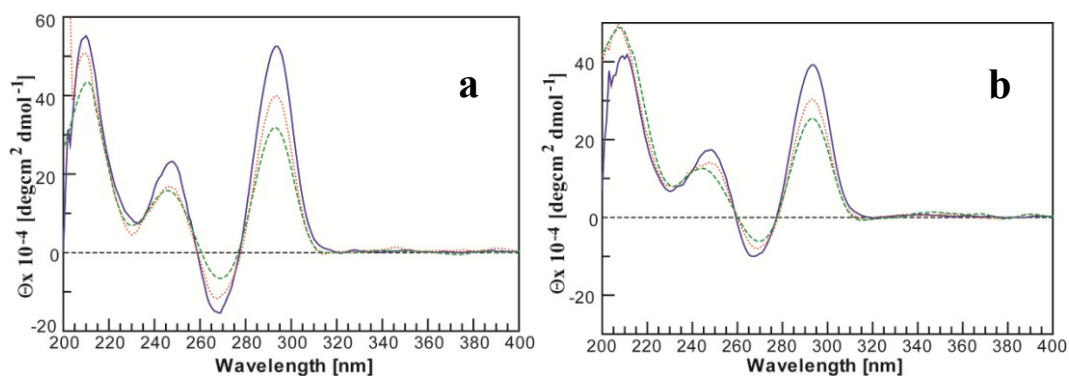


Figura 3.29: spettri CD registrati per **IIIId** in TK (a) e in PBS (b) usando campioni a tre differenti concentrazioni: $1 \times 10^{-4} M$ (linea blu); $1 \times 10^{-5} M$ (linea rossa); $1 \times 10^{-6} M$ (linea verde tratteggiata)

Gli spettri CD registrati per **IIId** e **IIIId** in TK ed in PBS a temperature crescenti da 10° ad 80°C mostrano punti isoellittici indicando che in soluzione è presente soltanto una tipologia di struttura quadruplex (**fig. 3.30**).

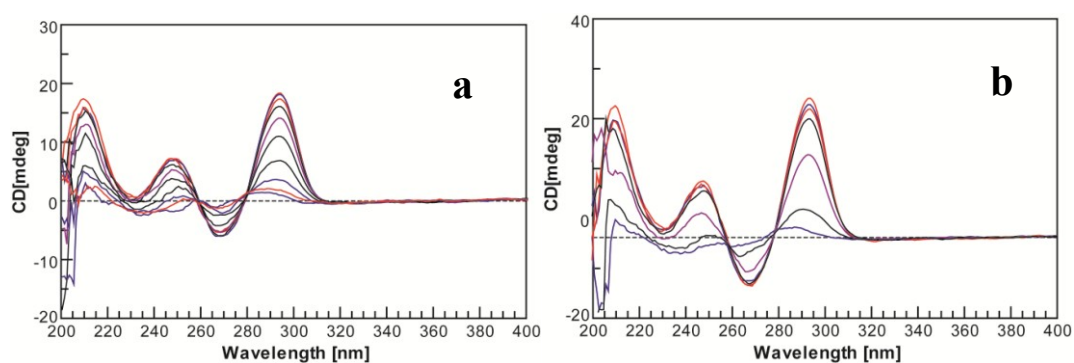


Figura 3.30: spettri CD registrati per **IIId** a temperature crescenti da 10° ad 80°C in PBS (a) e in TK (b).

La stabilità termica delle quadruplex formate è stata misurata mediante esperimenti di CD melting^{7,8,9,10} (**fig. 3.31**). L'ON **IIId** mostra sia in TK che in PBS una stabilità termica incrementata di 2-3°C rispetto al TBA, mentre per **IIIId** si ha una stabilità termica pressochè invariata (**tabella 3.9**)

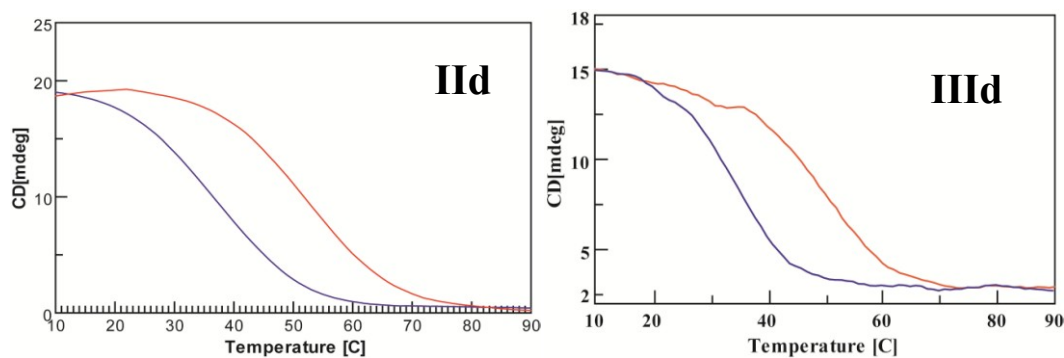


Figura 3.31: profili di fusione ottenuti per **IIId** e **IIIId** monitorando la variazione di intensità della banda dicroica a 295nm con l'incremento della temperatura in TK (linea rossa) e in PBS (linea blu)

ON	SEQUENZA	T _m (TK)	T _m (PBS)
I	GGTTGGTGTGGTTGG	50	33
IIId	GGTTGGD7*GTGGTTGG	54	35
IIIId	GGTTGGTGTGGD12*TGG	50	35

Tabella 3.9: valori di T_m ottenuti per gli ONs modificati in TK e in PBS

3.11.3 Saggi farmacologici

L'attività farmacologica dei modificati **IIId** e **IIIId** è stata valutata, come per gli analoghi descritti nei paragrafi precedenti, mediante saggio del test di protrombina^{11,12}. Per entrambe gli oligomeri l'attività farmacologica risulta significativamente migliorata rispetto al TBA naturale, con valori di PT a 20µM di 54 e 95sec rispettivamente per **IIId** e **IIIId** contro un valore di 52sec per il TBA naturale (**fig. 3.32**). Il valore ottenuto per **IIIId** risulta essere particolarmente interessante.

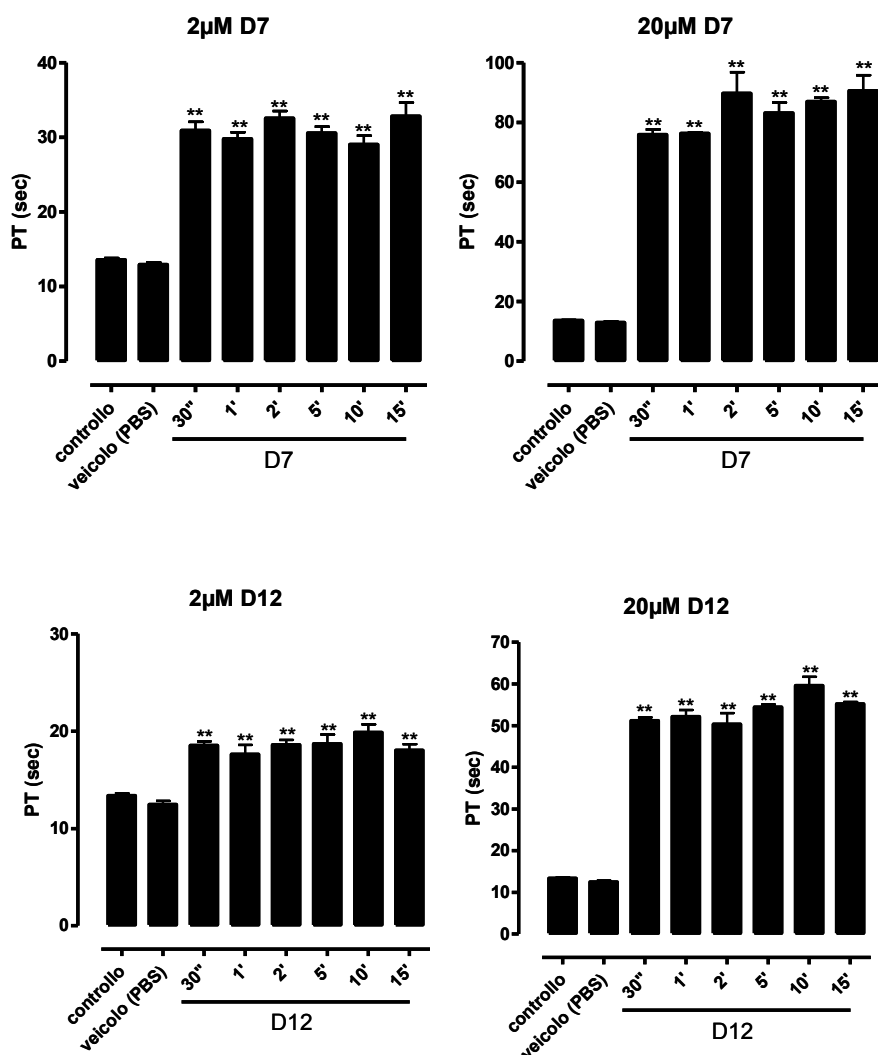


Figura 3.32: Incubazione fino a 15min degli ONs *IId* e *IIId* con la trombina.
 $***p < 0.001$ vs veicolo, $^{\circ\circ\circ}p < 0.001$ vs *I*. $n=3$

3.12 Conclusioni

Sulla base dei dati strutturali e farmacologici ottenuti precedentemente (paragrafi. 3.4 e 3.8.) utilizzando i nucleosidi modificati N-1[(2,2-diidrossimetilen)propan]timina e 5,6-trimetilen-deossiuridina, è stata progettata la sintesi di un nuovo monomero che racchiudesse entrambi i

tipi di modifica. Il nucleotide modificato sintetizzato 5,6-trimetilen-N1-[(2,2-diidrossimetilen)propan]-timina presenta infatti una base modificata che può essere considerata un analogo della timina con un maggior carattere idrofobo, ed un *linker* aciclico in sostituzione del 2'-deossiribosio. Tale unità, opportunamente funzionalizzata, è stata utilizzata per sostituire una alla volta i residui T in posizione 7 e in posizione 12. Queste ultime posizioni si erano infatti dimostrate essere la più sensibili alla modifica per un incremento di attività farmacologica.

Gli studi strutturali condotti hanno evidenziato che entrambi gli oligomeri ottenuti (**IIId** e **IIIId**) conservano la capacità di formare strutture a quadrupla elica antiparallele e che tali strutture risultano avere stabilità termica pressoché uguale (nel caso di **IIIId**) o superiore (nel caso di **IIId**) al TBA naturale sia in TK che in PBS. Gli spettri registrati a concentrazioni crescenti di ON per investigare la molecolarità delle quadruplex formate, hanno evidenziato come per la serie **IIp-VIIp**, un *folding* sempre di tipo intermolecolare contrariamente a quanto accade per il TBA che forma quadruplex mono o bimolecolari a seconda del tipo di catione presente in soluzione. Ciò conferma un ruolo chiave svolto dalla base (piuttosto che dallo zucchero) nel dirigere la tipologia delle quadruplex formate. E' da tener presente che la base modificata 5,6-trimetilen uracile presenta un maggior carattere idrofobo rispetto alla

timina e ciò contribuisce a spostare l'equilibrio *syn-anti* verso il conformero *syn*.

I dati relativi ai saggi biologici hanno condotto a risultati particolarmente interessanti. Mentre **IIIId** risulta avere un'attività biologica solo leggermente superiore rispetto al TBA naturale, **IIId** ha un tempo di protrombina, alla concentrazione di 20 μ m, quasi raddoppiato rispetto al TBA: 93 sec e 53 sec rispettivamente per **IIId** e TBA. La sostituzione in posizione 7 ha prodotto quindi un aptamero con migliore stabilità termica e al contempo interessantissima attività farmacologica. Il *linker* aciclico in posizione 7 comporta infatti un aumento della flessibilità del nucleoside, la cui base modificata, avendo un maggiore carattere idrofobo risulta anche avere una migliore interazione con la trombina. Ciò è in accordo con quanto precedentemente riportati in letteratura da noi e da altri^{13,14,15}. Considerato il notevole interesse nello sviluppo di nuove strategie anticoagulanti, riteniamo che i dati ottenuti siano particolarmente promettenti e che incoraggino alla sintesi di nuovi nucleosidi modificati da inserire nella posizione 7 del TBA.

3.13 Procedure sperimentali

5-idrossimetil-2,2,5-trimetil-1,3 diossano (1)

1,1,1-Tris(idrossimetil)etano (41.63mmol) è stato disciolto in 50ml di 2,2-dimetossipropano. E' stato aggiunto il piridinio *p*-toluen solfonato (8.32 mmol) e la sospensione tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente sotto flusso di argon. Dopo 24h la reazione è stata interrotta per aggiunta di TEA. Dopo 30 min sotto agitazione il solvente è stato rimosso *in vacuo* ed il grezzo cromatografato su gel di silice eluito con EtOAc/esano 1:1v/v lasciando un liquido oleoso incolore **1** (Resa 67%), Rf 0.40 (1:1 EtOAc/esano).

¹H NMR (CDCl₃): δ ppm 3.71–3.56 (dd, 4 H), 3.38 (s, 2H), 1.41 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 0.83 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): δ ppm 90.1, 68.2, 65.9, 37.0, 28.3, 13.3. ESI MS *m/z* 161 [M+H]⁺, 183 [M+Na]⁺.

N-3-Benzoil N-1[metilen(2,2,5-trimetil-1,3-diossan)] timina (3)

2 (4.0 mmol), trifenilfosfina (6.0 mmol) e di-tert-butyl azodicarbossilato (6.0 mmol) sono stati sospesi in 25 mL di diossano anidro. Dopo aver raffreddato la miscela di reazione a -20°C è stato aggiunto **1**. La reazione è stata lasciata a temperatura ambiente per 18h sotto flusso di argon. La soluzione è stata concentrata sotto vuoto ed il grezzo di reazione purificato mediante cromatografia su gel di silice eluito 95:5

Et₂O/CH₂Cl₂ 95:5 v/v per dare un solido bianco (**3**). (Resa 75%), Rf 0.59
(CHCl₃/MeOH 9:1 v/v)

¹H NMR (CDCl₃): δ=7,92 (d, 2H); δ=7,62 (t, 1H); δ=7,43 (t, 2H); δ=4 (s, 2H); δ=3,55-3,65 (d, 4H); δ= 3,10 (t, 2H); δ= 2,78 (t, 2H); δ= 2,05 (t, 2H); 1,45 (s, 6H); δ= 0,9 (s, 3H). MH⁺= 399,2.

N-3-benzoil N-1-[(2,2-diidrossimetilen-2-metil)propan] timina (4)

3 (2.83mmol) sono stati sospesi in 50ml di una soluzione MeOH/H₂O (9:1v/v). Sono stati aggiunti 3g di resina Dowex® 50WX8 (H⁺) e la miscela di reazione lasciata sotto lenta agitazione per circa 8 ore fino a completa dissoluzione di **3**. Dopo aver neutralizzato la miscela per aggiunta di una soluzione acquosa 0.5M di NaOH, la soluzione è stata concentrata sotto pressione ridotta ottenendo il prodotto **4** come solido bianco. (resa 98%); Rf 0.27 (CHCl₃/MeOH 9:1v/v)

¹H NMR (CDCl₃): δ=7,92 (d, 2H); δ=7,62 (t, 1H); δ=7,43 (t, 2H); δ=4 (d, 2H); δ=3,55-3,65 (dd, 4H); δ= 3,10 (t, 2H); δ= 2,78 (t, 2H); δ= 2,05 (t, 2H); δ= 0,9 (s, 3H). MH⁺=359,2; MNa⁺=381,2.

N-3-Benzoil N-1-[(3-ODMT-2-idrossimetilen-2-metil) propan] timina (5)

Il prodotto **4** della reazione precedente (1,38 mmol) è stato anidrificato con tre coevaporazioni sotto vuoto con acetonitrile dry. Ad esso sono

stati aggiunti il DMT-Cl (1,11 mmol, 0,8 eq) e la DMAP (0,069 mmol, 0,05 eq). I reattivi sono stati solubilizzati in 13 ml di piridina/acetonitrile 2:1. La miscela di reazione è stata posta sotto agitazione elettromagnetica e flusso di argon a temperatura ambiente. Dopo circa 20 minuti la reazione è stata interrotta per aggiunta di metanolo dry. Il grezzo è stato seccato sotto vuoto e purificato mediante colonna cromatografica impaccata con gel di silice sospeso in una miscela 1:1 n-esano/acetato di etile contenente lo 0,5% di trietilammina. (Resa: 50%); Rf: 0.6 EtOAc/n-esano 1:1

^1H NMR (CDCl_3): $\delta=7,92$ (d, 2H); $\delta=7,62$ (t, 1H); $\delta=7,43$ (t, 2H); $\delta=7,40$ (d, 2H); $\delta=7,35$ (t, 1H); $\delta=7,30$ (d, 12H); $\delta=6,82$ (d, 8H); $\delta=4$ (d, 2H); $\delta=3,80$ (s, 6H); $\delta=3,55-3,65$ (dd, 4H); $\delta=3,10$ (t, 2H); $\delta=2,78$ (t, 2H); $\delta=2,05$ (t, 2H); $\delta=0,9$ (s, 3H). $\text{MH}^+=661.3$; $\text{MNa}^+=683.3$.

5,6-trimetilen-N-1[(2-metilen-O-DMT-2-metilen- β -cianoetil-diisopropilfosforamidito)propan] timina (6)

Il prodotto E della reazione precedente (0.334 mmol) è stato anidrificato alla pompa ad olio per diverse ore e mediante coevaporazioni con etere dietilico dry. Ad esso sono stati aggiunti 233 μl di DIPEA (1.33 mmol, 4eq), 119 μl di 2-cianoetil-diisopropil-clorofosforoamidito (0.50 mmol, 1,5 eq) e 3,3 ml di DCM dry. La reazione è stata lasciata sotto agitazione elettromagnetica e flusso di argon per 20 minuti ed interrotta

con metanolo dry. Il monitoraggio è stato effettuato mediante TLC in camera 8:1:1 diclorometano/acetato di etile/trietilammina. La miscela di reazione è stata diluita con acetato di etile e lavata prima con circa 10 ml di una soluzione al 10% di Na_2CO_3 e poi con 10 ml di una soluzione di NaCl. La fase organica è stata anidrificata su solfato di magnesio, essiccata sottovuoto e cromatografata. La colonna è stata impaccata con gel di silice sospeso con una soluzione 8:1:1 diclorometano/acetato di etile/trietilammina ed eluita in isocratica. (Resa: 95%); Rf: 0.8 DCM/EtOAc/TEA 8:1:1v/v/v

^1H NMR (CD_3Cl_3): 7,92 (d, 2H); $\delta=7,62$ (t, 1H); $\delta=7,43$ (t, 2H); $\delta=7,40$ (d, 2H); $\delta=7,35$ (t, 1H); $\delta=7,30$ (d, 12H); $\delta=6,82$ (d, 8H) $\delta=3.95-3.80$ (m, 2H); $\delta=3,75$ (s, 6H); $\delta=3,70$ (m, 2H); $\delta=3,60$ (m, 2H); $\delta=3,55$ (m, 2H); $\delta=3,39-3.02$ (m, 2H); $\delta= 3,10$ (t, 2H);); $\delta= 2,78$ (t, 2H); $\delta=2,60-2.45$ (t, 2H); $\delta= 2,05$ (t, 2H); $\delta=1,09$ (s, 12H). $\delta=1,05$ (s, 3H). $\text{MH}^+=861,4$.

Sintesi degli oligomeri

I modificati **IIId** e **IIIId** sono stati sintetizzati utilizzando resine CPG *high-loading* come supporto solido e seguendo il protocollo standard del fosforammidito. Il distacco degli ONs dal supporto solido è avvenuto per trattamento con una soluzione ammoniacale al 33% per tutta la notte a 55°C . I filtrati e di lavaggi sono stati raccolti insieme, concentrati sotto vuoto, disciolti in H_2O , filtrati e purificati per HPLC usando una colonna

a scambio ionico del tipo Nucleogen Sax eluita con un gradiente lineare (dallo 0 al 30%B in 30min) di tamponi fosfato a pH 7.0 (A: 20mM NaH₂PO₄ contenente 20% ACN e B: 1M NaCl, 20mM NaH₂PO₄ contenente 20% ACN). Gli oligomeri sono stati successivamente desalificati mediante cromatografia ad esclusione molecolare su Biogel P2-fine. Il grado di purezza è stato controllato mediante HPLC utilizzando una colonna a fase inversa (C-18 purospher Star, Merck) ed elettroforesi in condizioni denaturanti su gel di poliacrilammide al 20% contenente urea 7M. La concentrazione dei campioni utilizzati per gli esperimenti UV e CD è stata determinata spettrofotometricamente misurando l'assorbanza a 260nm a 80°C ed utilizzando i coefficienti di estinzione molare calcolati secondo il metodo di Gray. Per il monomero modificato il coefficiente di estinzione molare è stato considerato uguale a quello di una timidina non modificata.

Spettroscopia UV

Ciascun ON, alla concentrazione finale di 10µM è stato disciolto in TK (100mM KCl, 10mM KH₂PO₄, pH 7.0) o PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM NaH₂PO₄, pH 7.4). Gli spettri UV differenza sono stati ottenuti per sottrazione dello spettro registrato a 65°C da quelli ottenuti a ciascuna temperatura (10, 15, 20, 25, 30 e 35°C).

Spettroscopia CD

Gli spettri CD sono stati registrati da 200 a 360nm con una velocità di scansione di 100nm/min (risposta:16sec, bandwidth: 1.0nm) utilizzando uno spettropolarimetro JASCO 715 equipaggiato con un sistema di controllo della temperatura PTC-348. Prima della scansione sono stati equilibrati per 30 min a ciascuna temperatura. Ogni profilo CD è stato ottenuto come media di tre scansioni dalle quali è stato sottratto lo spettro del tampone da solo. Per valutare la dipendenza della banda dicroica a 295nm (espressa come ellitticità molare) dalla concentrazione dell'ON in PBS e in TK, sono stati preparati campioni a tre differenti concentrazioni $1 \times 10^{-4}M$, $1 \times 10^{-5}M$, $1 \times 10^{-6}M$. Per la registrazione di tali spettri sono state utilizzate cellette in quarzo aventi cammino ottico rispettivamente di 0.1, 0.5 e 1cm. Per la registrazione degli spettri CD a differenti temperature sono stati utilizzati campioni in TK o in PBS ad una concentrazione di $1 \times 10^{-5}M$. Gli esperimenti di CD *melting* sono stati condotti monitorando l'intensità della banda dicroica a 295nm in funzione della temperatura (velocità di scansione $0.5^{\circ}C/min$).

Saggio del tempo di protrombina (PT)

I campioni di sangue umano sono stati ottenuti mediante prelievi e frazionati per centrifuga a 2000rpm per 5 min. I valori di PT sono stati misurati utilizzando un apparecchio Koagulab equipaggiato con uno specifico kit RecombiPlastin Hemosil (Inst.Labs.Lexiton, USA).

Per la valutazione del PT a 20 μ M nell'apposito microtubo sono stati aggiunti 2 μ l dell'ON (alla concentrazione di 1mM in PBS). Dopo 30 sec, 1, 5, 15, 30, 60 minuti di incubazione, sono stati aggiunti 200 μ l della soluzione del Kit contenente tromboplastina. Quest'ultima in presenza di ioni calcio innesca la via estrinseca della coagulazione. La misura del PT per ciascun tempo di incubazione, è stata prodotta in triplicato ed è stato calcolato il valore medio.

Riferimenti bibliografici

- ¹ Mitsunobu, O. *Synthesis* , **1981**, 1,. 1–28
- ² Di Grandi, M.J.; Tilley, J.W. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 4327–4330
- ³ Park, K.H., Yoon, Y.I., Lee, S.G. *Tetraedron Lett.*, **1994**, 35, 9737-9740
- ⁴ Sinha, N.D.; Biernat, J.; McManus, J.; Koster, H. *Nucleic Acids Res.*, **1984**, 12, 4539–4557
- ⁵ Dapić, V.; Abdomerović, V.; Marrington, R.; Peberdy, J. ; Rodger, A.; Trent, J.O.; Bates, P.J. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, 2097–2107
- ⁶ Fialová, M.; Kypr, J.; Vorlicková, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 344, 50–54
- ⁷ Mergny, J.-L.; Phan, A.-T.; Lacroix, L. *FEBS Lett.*, **1998**, 435, 74–78
- ⁸ Mergny, J.-L.; Li, J.; Lacroix, L.; Amrane, S.; Chaires, J.B. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, e138/1–e138/6
- ⁹ Saccà, B.; Lacroix L.; Mergny, J.-L. *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 1182–1192
- ¹⁰ Gros, J.; Rosu, F.; Amrane, S.; De Cian, A.; Gabelica, V.; Lacroix , L.; Mergny, J.-L. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35 , 3064–3075
- ¹¹ He, G.-X.; Krawczyk, S.H.; Swaminathan, S.; Shea, R.G. ; Dougherty, J.P.; Terhorst, T. ; Law, V.S.; Griffin, L.C. ; Coutré, S.; Bischofberger, N. *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 2234–2242
- ¹² Kelly, J.A.; Feigon, J.; Yeates, T.O. *J. Mol. Biol.* , **1996**, 256, 417–422

- ¹³ Coppola, T.; Varra, M., Oliviero, G., Galeone, A., D'Isa, G.; Mayol, L., Morelli, E., Bucci, M-R., Vellecco, V.; Cirino, G.; Borbone, N. *Bioorg. Med. Chem*, **2008**, 16 , 8244-8253
- ¹⁴ Wang, K.Y.; McCurdy, S.; Shea, R.G.; Swaminathan, S.; Bolton, P.H. *Biochemistry*, **1993**, 32, 1899-1904.
- ¹⁵ Krawczyk, S.H. Bischofberger, N.; Griffin, L.C.; Law, V.S.; Shea, R.G.; Swaminathan, S. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **1995**, 14, 1109-1116

CAPITOLO 4

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DI SEQUENZE POLI-G CONIUGATE AD UN DERIVATO PERILENICO

4.1 Introduzione

Le diimmidi perileniche ed i loro derivati (**fig. 4.1**) riscontrano grande interesse tanto a livello industriale quanto nella ricerca accademica¹. A partire dagli anni '50 molte di esse hanno trovato applicazioni industriali come pigmenti (in particolar modo nell'industria automobilistica come componenti delle vernici) grazie alla favorevole combinazione di alcune proprietà quali insolubilità, stabilità migrazionale, inalterabilità alla luce e al tempo, inerzia chimica e una notevole capacità di tingere con colori compresi tra il rosso e il viola, fino a sfumature di nero².

Più recentemente le diimmidi perileniche hanno suscitato interesse nel campo dei materiali elettronici: esse risultano infatti essere tra i migliori semiconduttori '*n-type*' finora conosciuti grazie all'alta affinità elettronica che le rende molto promettenti nella progettazione di transistor³. In virtù della loro particolare combinazione di proprietà redox ed ottiche da oltre 10 anni sono studiate nel campo dell'elettrofotografia e della fotovoltaica. Inoltre, la scoperta delle

proprietà di fotostabilità e di fluorescenza con elevate rese quantiche le ha resi promettenti come sonde laser e collettori fluorescenti⁴.

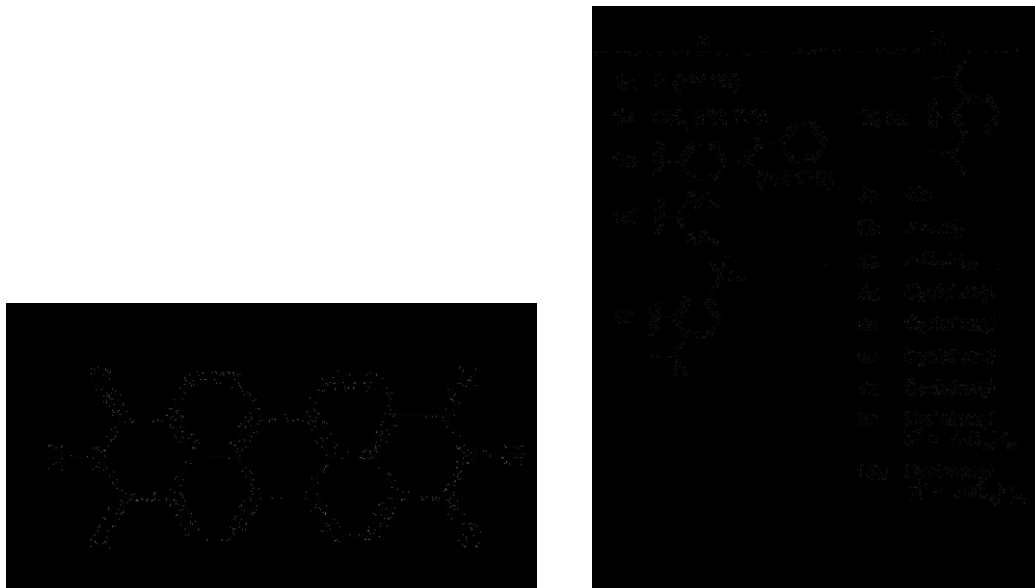


Figura 4.1: diimmidi perileniche con differenti catene laterali

Recentemente i derivati del perilene, sono stati intensamente studiati per la loro capacità di interazione con le strutture a quadrupla elica^{5,6}. Essi infatti fanno parte, insieme a derivati antrachinonici e derivati del naftalene, di quella classe di composti definiti proprio ‘ligandi delle quadruplex’. Grazie infatti all’estesa area aromatica che li caratterizza essi possono interagire mediante interazioni di tipo π - π *stacking* con i quartetti di G producendo un effetto stabilizzante sulla struttura quadruplex. La formazione di quadruplex a livello del filamento 3’

overhang del telomero umano ne inibisce il riconoscimento e la conseguente elongazione da parte della telomerasi (enzima sovraespresso nelle cellule tumorali). Pertanto molecole che selettivamente legano e stabilizzano le strutture quadruplex sono considerati potenziali farmaci antitumorali⁷.

4.2 Obiettivi

Diversi lavori presenti in letteratura hanno come obiettivo la coniugazione di derivati del perilene a sequenza oligonucleotidiche in singoli filamenti⁸ o formanti strutture duplex^{9,10,11} triplex¹² o *hairpin*¹³. Per il raggiungimento di tale obiettivo, è necessario derivatizzare l'unità perilenica in un 'fosforammidato *building block*' che possa essere impiegato nella sintesi oligonucleotidica in fase solida. Tuttavia, la scarsa solubilità delle diimmidi perileniche causa molti problemi in queste preparazioni e soltanto poche delle procedure finora sviluppate sono risultate efficienti.

Per superare il problema connesso alla scarsa solubilità dei substrati, Bevers e coll.¹⁴ hanno sintetizzato ed utilizzato come intermedio chiave della sintesi l' N,N'-bis-2-[(2-O-tert-butildimetilsilietossi)etil]-3,4:9,10-diammide perilene-tetracarbossilica (**fig. 4.2a**). Tale procedura tuttavia, richiedendo la rimozione selettiva del gruppo tert-butildimetilsilile da una delle funzioni alcoliche, riduce significativamente le rese del

prodotto finale. Recentemente Rahe e coll.¹⁵ hanno invece sviluppato un nuovo approccio sintetico nel quale il gruppo dimetossitritile è introdotto per reazione diretta dell'anidride perilenica con una miscela di amminoalcoli protetti e non protetti. Il derivato fosforamidito è stato facilmente introdotto al terminale 5' di ON formanti strutture a doppia elica (**fig. 4.2b**). Un approccio simile è stato seguito da Wagner e coll.¹⁶ per ottenere un nuovo *'building block'* che, avendo due funzioni alcoliche allo stesso lato dell'unità perilenica, potesse essere inserito come un analogo nucleotidico anche all'interno di una sequenza oligonucleotidica (**fig. 4.2c**).

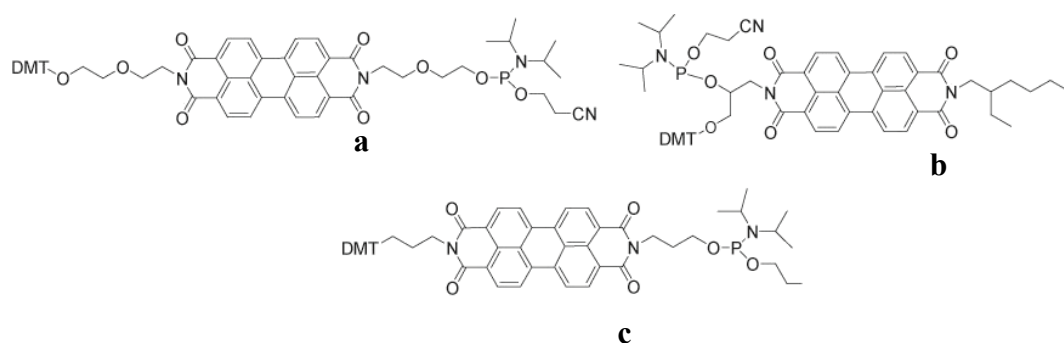


Figura 4.2: derivati perilenici *'fosforamiditi building block'* riportati in letteratura

In tutti i casi descritti, dopo la coniugazione, le cariche dei fosfati dell'ON consentono un miglioramento delle proprietà di solubilità in acqua dell'unità perilenica. Nell'intento di coniugare un derivato del

perilene a sequenze poliG formanti strutture a quadrupla elica, è stato invece necessario tener conto che la formazione di aggregati quadruplex già di per sé diminuisce la solubilità dell'ON e che la coniugazione con unità poco solubili avrebbe generato una combinazione di situazioni non favorevoli. Al fine quindi di migliorare le proprietà di solubilità, sono stati sintetizzati nuovi derivati del perilene bromurati sulla *bay area* (**fig. 4.3**). Studi di cristallografia a raggi X, modellistica molecolare ed NMR hanno dimostrato che l'introduzione di sostituenti a livello della *bay area* produce una deformazione del core aromatico della diimmide perilenica¹⁷. Tali derivati sostituiti, anche detti derivati ' *π -core twisted*' esibiscono migliori proprietà di solubilità rispetto alle loro controparti non sostituite. Inoltre, poiché per essi sono possibili nuove interazioni *π - π stacking*, essi rappresentano utili *building block* per la realizzazione di architetture sopramolecolari con interessantissime proprietà ottiche ed elettriche^{18,19,20}.

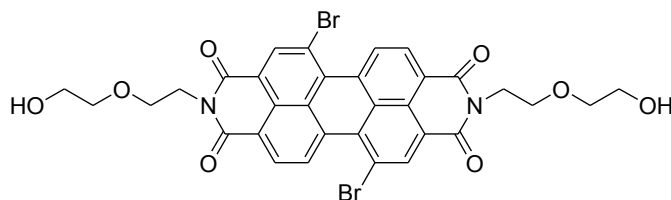


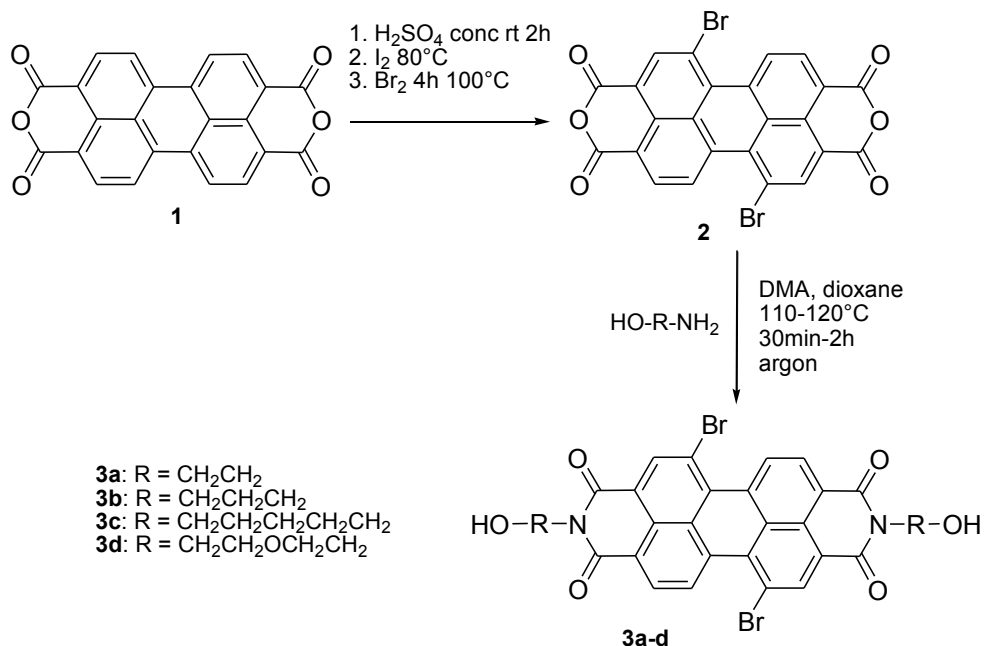
Figura 4.3: 1,7-dibromoperilene-*N,N'*-dietossietanolo (PEOEBr)

Per la coniugazione sono state scelte due sequenze oligonucleotidiche corrispondenti a ripetizioni della sequenza telomerica umana: 5'GGGTTAGGG^{3'} (HTR1) e 5'GGGTTA^{3'} (HTR2). Le caratteristiche strutturali delle sequenze coniugate 5'-PEOEBR-GGGTTAGGG^{3'} (HTRp1) e 5'-PEOEBR-GGGTTA^{3'} (HTRp2) sono state analizzate mediante spettroscopia CD, UV ed elettroforesi.

4.3 Risultati

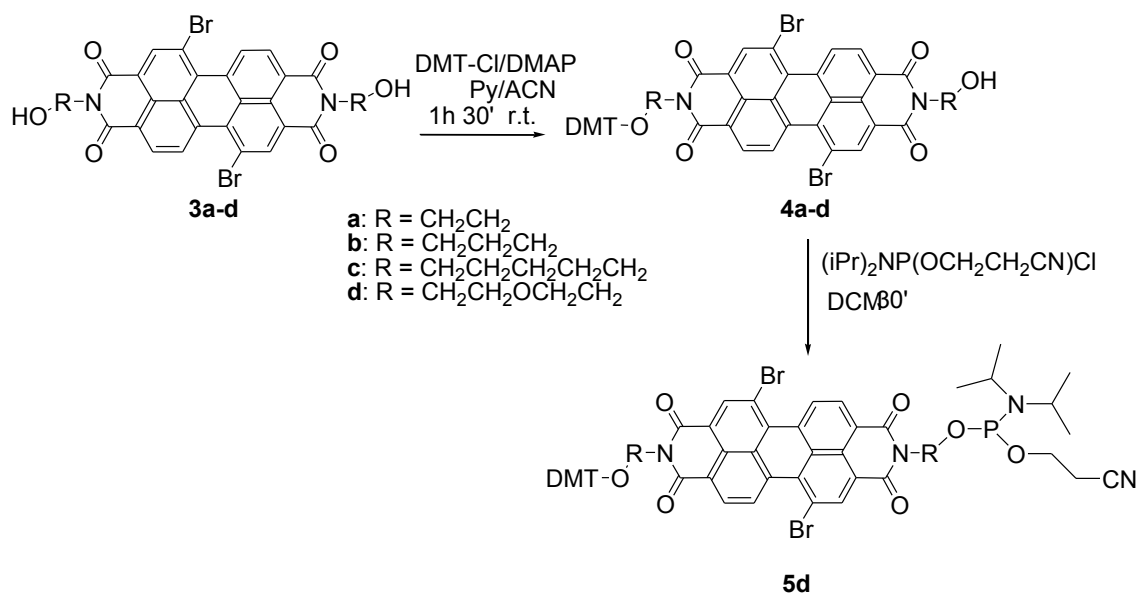
4.3.1 Sintesi

L'anidride dibromo-perilentetracarbossilica (**2**, **schema 4.1**), sintetizzata come precedentemente descritto²¹, è stata trattata con una serie di amminoalcoli commercialmente disponibili per ottenere le diimmidi **3a-d** le quali differiscono per la lunghezza della catena laterale e la presenza o meno dell'ossigeno intra-catena. L'eccesso di reattivo, la temperatura e il tempo di reazione sono stati accuratamente controllati al fine di evitare prodotti secondari dovuti alla reazione dei gruppi idrossilici con l'anidride ciclica.



Schema 4.1: sintesi di derivati bromurati del perilene aventi catene laterali di tipo alcolico.

La solubilità dei prodotti 3a-d è risultata essere strettamente correlata alla lunghezza della catena alcolica laterale, sebbene in tutti i casi superiore rispetto alle diimmidi corrispondenti non bromurate. La reazione di monoprotezione di una funzione ossidrilica con il gruppo dimetossitritile (**schema 4.2**), è stata inizialmente condotta nelle classiche condizioni, ossia impiegando piridina anidra come solvente e in presenza di dimetilamminopiridina come catalizzatore. Tuttavia, in tali condizioni partendo dai derivati 3a-c non è stato isolato nessun prodotto mentre 3d ha dato il corrispondente derivato monoprotetto con rese scarse del 23% (**tab. 4.1**)



Schema 4.2: reazioni di monotrilitazione e fosfitilazione dei derivati dibromoperilenici 3a-d

Substrato	Reazione con DMT-Cl	
	Solventi (v/v)	Resa (%)
3a	Py/ACN 3:1	<20
3b	Py/ACN 3:1	20
3c	Py/ACN 3:1	15
3d	Py	23
	Py/ACN 2:1	35
	Py/ACN 3:1	45

Tabella 4.1: condizioni di reazione (solventi) e rese per la reazione di monotrilitazione.

Rese migliori sono state ottenute utilizzando come solventi una miscela piridina-acetonitrile. In particolare, usando un rapporto Py/ACN 3:1 v/v, **4a-c** sono isolati con rese che vanno dal 15 al 20%. Partendo invece dal

substrato 3d, il prodotto monoprotetto è stato ottenuto con una resa del 45%. Considerando che si tratta di una reazione di protezione selettiva di una funzione alcolica su una molecola con due gruppi equivalenti, tale resa può essere ritenuta più che soddisfacente. Il prodotto 4d è stato quindi convertito nel corrispondente derivato fosforoammidito **5d** usando le classiche procedure (resa del 95%). Prima della coniugazione ad una sequenza oligonucleotidica è stata valutata la stabilità del dibromoderivato fosforammidito nelle condizioni standard della sintesi in fase solida e al contempo, sono state messe a punto le migliori condizioni per lo step di accoppiamento. Il *building block* **5d** è stato fatto reagire manualmente con un supporto solido Icaa CPG *high loading* funzionalizzato con A, C, T o G. Il supporto solido è stato messo in un piccolino reattorino di vetro munito di setto, lavato con ACN anidro e messo a reagire con 5d solubilizzato in DCM anidro in presenza di 5-etiltio-1H-tetrazolo come agente di *coupling*. Le rese di ciascuno step sono state quantificate spettrofotometricamente mediante test del catione tritilico (**tab. 4.2**).

Usando i tempi standard di *coupling* (2 cicli da 2min), sono state ottenute scarse rese di accoppiamento (15%). Tuttavia, incrementando i tempi di reazione (due cicli della durata di 20min ognuno) si sono avute rese comprese tra il 65 ed il 73%.

SEQUENZA (5'→3')	1° CICLO		2° CICLO	
	Tempo (min)	Resa (%)	Tempo (min)	Resa (%)
IcaaCPG- X - PEOEBr (X=A, G, C or T)	2	15	2	17
	10	30	10	45-48
	20	40-45	20	65-73
	40	42-45	60	65-73
IcaaCPG- PEOEBr	20	40-45	20	65-73
IcaaCPG-PEOEBr- X (X=A, G, C or T)	2	80	2	>95

Tabella 4.2: rese quantificate spettrofotometricamente mediante test del catione tritilco dello step di coupling di DMT-PEOEBr-P su un supporto solido funzionalizzato.

Tali rese non migliorano ulteriormente estendendo ancora i tempi di *coupling* (2 cicli della durata di 40 minuto ciascuno). Inoltre è stata valutata la possibilità di inserire il dibromoderivato all'interno di una catena oligonucleotidica. Una volta legato PEOEBr al supporto solido, esso reagisce con i monomeri successivi con tempi e rese del classico protocollo.

Le sequenze scelte per gli studi strutturali, sono state ottenute mediante sintetizzatore automatico ed il metodo del DMT-on. Ciascuna sequenza, ancora legata al supporto solido è stata trasferita in un reattorino di vetro, manualmente deprotetta dal tritile usando la classica soluzione di DEBLOCK, lavata con ACN anidro e anidrificata con argon per 10 min. Tale supporto così preparato è stato quindi messo a reagire con 5d, utilizzando 2 cicli di accoppiamento di 20 min ciascuno. Gli ONs sono

stati distaccati dal supporto solido mediante trattamento con una soluzione ammoniacale al 33% a temperatura ambiente per 48h. Dopo la purificazione HPLC, le sequenze coniugate sono state controllate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

4.3.2 Caratterizzazione spettroscopica

HTRp1. Al fine di valutare se la presenza dell'unità perilenica al terminale 5' avesse compromesso la capacità dell'ON di formare strutture quadruplex, sono stati registrati spettri UV a temperature crescenti da 10 ad 80°C sia in tampone contenente sodio (100mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄, pH 7.0) che potassio (100mM KCl, 10mM KH₂PO₄, pH 7.0). Dalla sovrapposizione di tali profili compare un punto isosbestico a 287nm, ampiamente riconosciuto come tipico della presenza di specie quadruplex in soluzione²² (**fig. 4.4**).

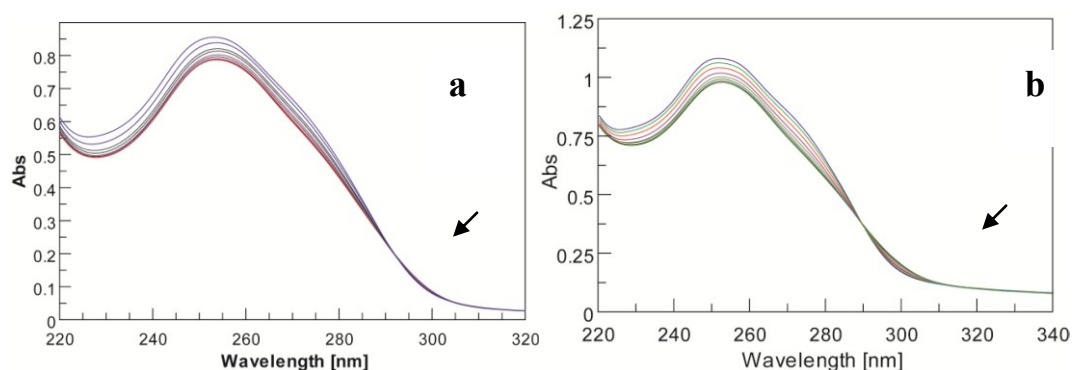


Figura 4.4: profili UV registrati da 10 ad 80°C per HTRp1 in tampone fosfato contenente ioni potassio (a) e sodio (b)

La **figura 4.5** e l'inserto b mostrano, rispettivamente i profili dicroici assunti da HTR1 ed HTR1p a 10°C in presenza di ioni sodio o potassio. Come precedentemente riportato in un eccellente studio sulle strutture secondarie assunte dai filamenti poliG all'interno delle ripetizioni tronche del telomero, HTR1 assume una struttura quadruplex bimolecolare antiparallela in presenza di cationi sodio, mentre in presenza di potassio essa mostra un profilo CD tipico di miscele di due strutture, parallela ed antiparallela^{23,24}. In entrambi i casi la coniugazione non influenza significativamente i profili dicroici, indicando quindi che la tipologia delle quadruplex formate da HTR1 e HTRp1 è la stessa.

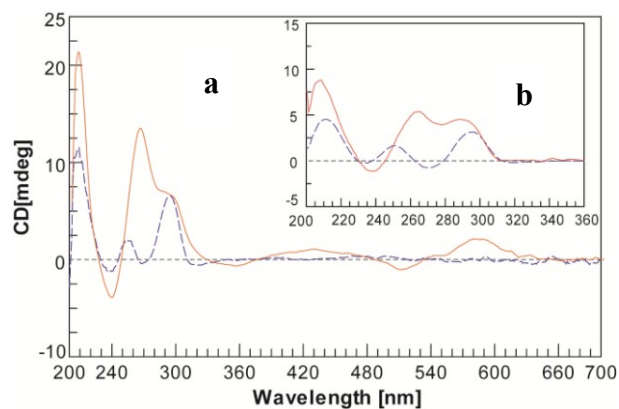


Figura 4.5: spettri CD registrati in tampone sodio (linea blu tratteggiata) e in tampone potassio (linea rossa continua) per HTRp1 (a) e HTR1 (inserto b)

Inoltre come riportato da Vorlikova e coll.²⁵ per HTR1, anche l'ON coniugato HTR1p mostra differenti contributi delle bande dicroiche a 262 e 295nm a seconda del tempo che intercorre dal processo di *annealing* con un costante aumento della forma parallela a spese di

quella antiparallela (**fig. 4.6**). Tuttavia la cinetica dell'isomerizzazione per l' ON coniugato sembra rallentata e il processo appare più complesso con un leggero incremento della banda a 262nm dopo 10 gg dall'*annealing* e senza una diretta conversione tra le due bande come evidente dall'assenza di un punto isoellittico.

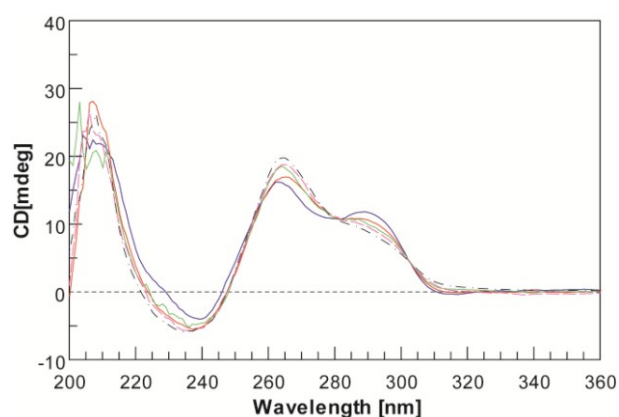


Figura 4.6: spettri CD registrati per HTR1p in tampone fosfato contenente potassio a 25°C, dopo 1 giorno (linea blu), dopo 3 giorni (linea arancione), dopo 5 giorni (linea verde), dopo 7 giorni (linea viola) e 10 giorni (linea nera) dal processo di *annealing*.

La stabilità termica delle strutture quadruplex formate è stata valutata mediante esperimenti di denaturazione termica CD anziché con i classici metodi di UV *melting*^{26,27}. In quest'ultimo caso infatti, il contributo della banda di assorbimento dell'unità perilenica a 260nm avrebbe condotto a dati di difficile interpretazione. Sono state quindi monitorate le intensità delle bande dicroiche a 295nm in sodio e a 262nm in potassio incrementando la temperatura di 0.5°C/min da 10 a 90°C. Come emerge

dal relativo confronto con i profili di fusione dell'ON non coniugato, la presenza del perilene sembra contribuire alla stabilizzazione della struttura quadruplex parallela formata in potassio (**fig. 4.7a**). Infatti, mentre HTR1 ha una temperatura di fusione di 53°C, per l'ON coniugato HTRp1 la temperatura di fusione va oltre i 70°C.

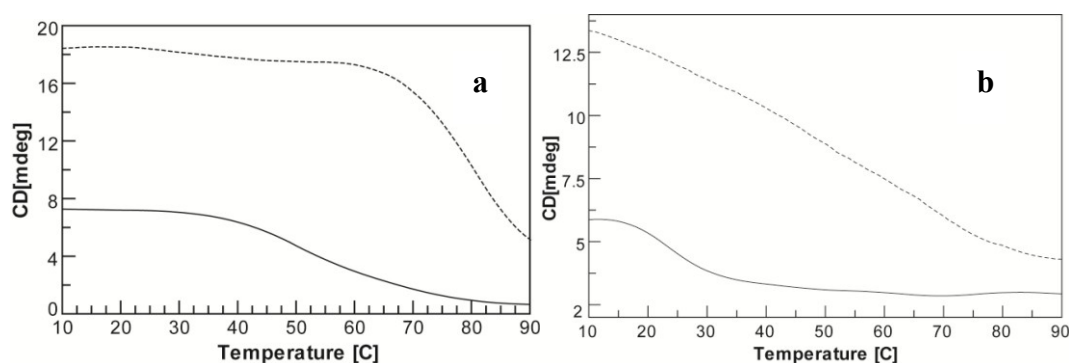


Figura 4.7: profili di fusione ottenuti monitorando a) l'intensità della banda dicroica a 262nm per HTR1 (linea continua) e HTRp1 (linea tratteggiata) in tampone fosfato contenente ioni potassio; b) l'intensità della banda dicroica a 295nm per HTR1 (linea continua) e HTRp1 (linea tratteggiata) in tampone fosfato contenente ioni sodio

Il profilo di fusione ottenuto in sodio appare invece abbastanza particolare in quanto la mancanza di un aspetto sigmoidale sembra indicare un fenomeno di fusione non cooperativo (**fig. 4.7b**).

L'unità di perilene ha dei cromofori con transizioni elettroniche possibili nel visibile, pertanto gli spettri UV e CD sono stati esaminati anche alle lunghezze d'onda alte. Gli spettri UV registrati a 10°C in presenza di sodio e potassio, presentano un'inversione dei due massimi di

assorbimento a 502 e 542nm del monomero perilenico da solo. Ciò sembra indicare un forte fenomeno di *exciton coupling* tra un'unità di perilene, ossia la formazione di aggregati. Cambiamenti negli spettri UV-visibile e negli spettri di fluorescenza sono infatti prodotti dall'interazione tra momenti transienti dipolari di due molecole che interagiscono e che possono produrre essenzialmente due tipi di aggregati²⁸ di tipologia *J* o *H*. Il primo tipo di aggregazione (*J*) è prodotto da una disposizione parallela dei momenti dipolari che induce, negli aggregati dimerici due stati energetici eccitati di cui quello nello stato energetico più alto produce transizione possibili. In questo caso la banda UV-vis più intensa nel monomero subisce un *blu-shift* nel dimero e gli spettri di fluorescenza mancano in risoluzione e in intensità^{29,30}. Gli aggregati di tipo *H* sono invece generati dalla disposizione testa-coda dei momenti transienti dipolari delle molecole ed in questo caso è lo stato energetico più basso a dare origine a transizioni possibili. Di conseguenza, la banda UV-vis avente intensità più alta subisce un *red-shift* e gli spettri di fluorescenza risultano intensi. Quando i momenti transienti dipolari sono disposti rotazionalmente, le bande UV-vis possono subire sia uno *shift* batocromico che ipsocromico.

Riscaldano il campione, si assiste ad un forte effetto ipercromico della banda di assorbimento a 542nm che subisce contemporaneamente un *blu-shift* (**fig. 4.8**).

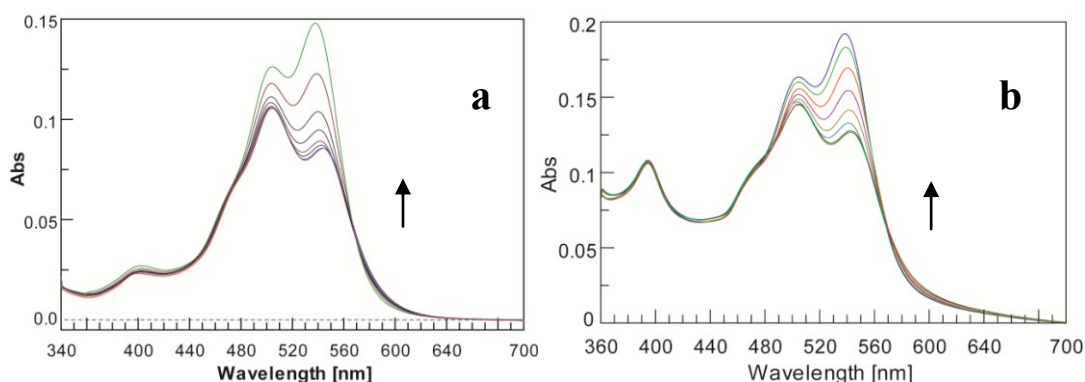


Figura 4.8: spettri UV/visibile ottenuti per HTRp1 in tampone contenente ioni potassio (a) e sodio (b) a temperature crescenti da 10 ad 80°C

Un differente comportamento tra sodio e potassio si riscontra invece per quanto riguarda gli spettri dicroici. In tampone potassio, la regione del visibile dello spettro presenta una banda negativa a 500nm ed una banda positiva a 565nm con un effetto Cotton centrato a 542nm (**fig. 4.9**).

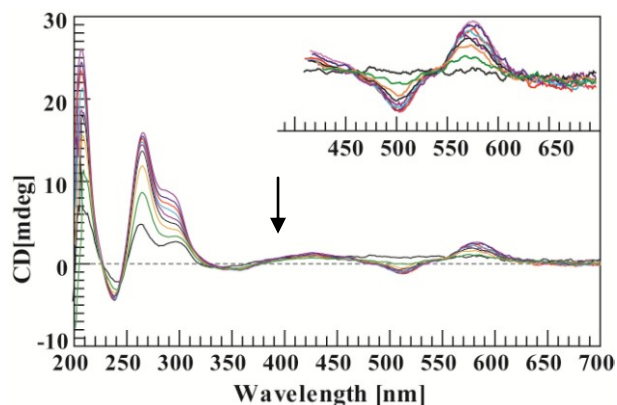


Figura 4.9: Profili CD ottenuti per HTRp1 in tampone fosfato contenente ioni potassio a temperature crescenti da 10° ad 80°C. La regione corrispondente alle bande dicroiche alle lunghezze d'onda alte (inserto) è stata amplificata tre volte.

L'andamento con la temperatura di tali bande, riportato nel grafico in **figura 4.10**, segue lo stesso percorso della bande UV e lo stesso profilo di fusione dell'ON, il che suggerisce una forte interazione tra la struttura quadruplex e le unità di perilene.

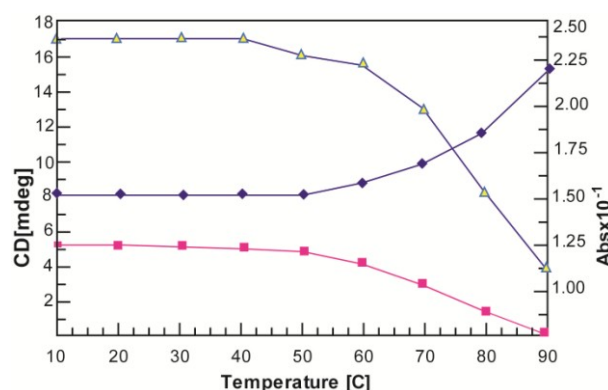


Figura 4.10: profilo grafico ottenuto per HTRp1 in tampone potassio riportando i valori espressi in ellitticità molare delle bande dicroiche a 556 (triangolini blu) e 262nm (quadrantini rosa) e il valore della banda di assorbimento UV/vis a 542nm (quadrantini blu) con l'incremento della temperatura da 10° a 90°C.

Gli spettri CD registrati in tampone sodio mancano invece di segnali dicroici nella regione del visibile indicando che l'ON non induce nessun effetto dicroico sull'unità perilenica (**fig. 4.11**). Inoltre i profili di fusione ottenuti monitorando la struttura quadruplex ed il perilene seguono, dopo i 50°C, percorsi differenti indicando che le unità di perilene sono ancora unite tra di loro da interazioni π - π *stacking* anche quando l'ON è in forma destrutturata (**fig. 4.12**).

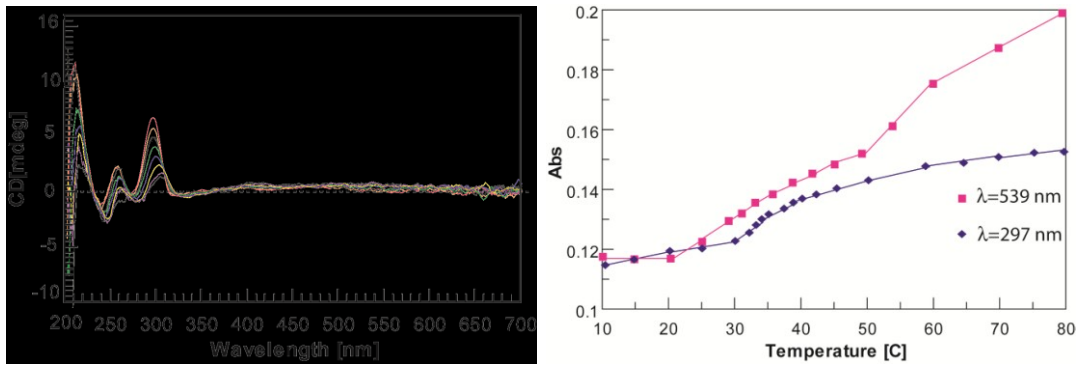


Figura 4.11: Profili CD ottenuti per HTR1p in tampone fosfato contenente ioni sodio a temperature crescenti da 10° ad 80°C.

Figura 4.12: profili di fusione ottenuti monitorando le bande di assorbimento UV a 297nm (blu) e 539nm (rosa) per HTR1p in tampone sodio.

Infine è stata valutata l'abilità di HTR1p di formare strutture quadruplex in acqua priva di sali. Gli spettri CD registrati immediatamente dopo riscaldamento del campione a 80°C e rapido raffreddamento a 10°C mostrano una banda positiva 295nm accompagnata da una banda negativa a 246nm. Dopo 10 giorni la banda a 295nm scompare completamente mentre appare una banda positiva a 263nm indicando pertanto un processo di conversione nel tempo dalla forma antiparallela alla forma parallela (**fig. 4.13**). La regione delle lunghezze d'onda alte dello spettro dicroico mostra due deboli bande negative a 510nm e a 542nm che restano pressoché invariate nel tempo.

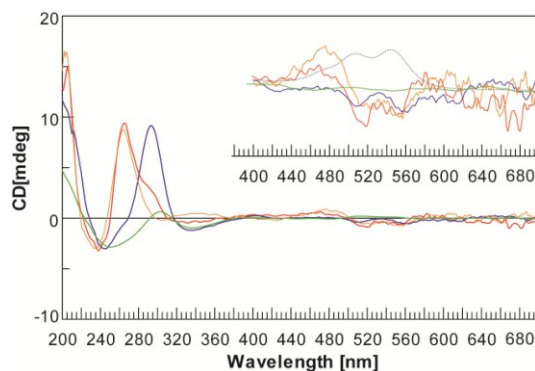


Figura 4.13: spettri CD registrati per HTRp1 in H₂O (in assenza di sali). Profili ottenuti a 10°C immediatamente dopo la preparazione del campione (linea blu), a 80°C (linea verde), dopo 5 gg a 10°C (linea rossa) e 10 gg a 10°C (linea gialla).

I profili UV con la temperatura registrati nel range di lunghezza d'onda 220-360nm, confermano l'effettiva formazione di strutture quadruplex (**fig. 4.14**). E' importante sottolineare che, come precedentemente riportato, HTR1 non è in grado di formare strutture quadruplex in assenza di cationi sodio o potassio e che i profili ottenuti in queste condizioni per l'ON non coniugato corrispondono sempre a quelli di ONs non strutturati.

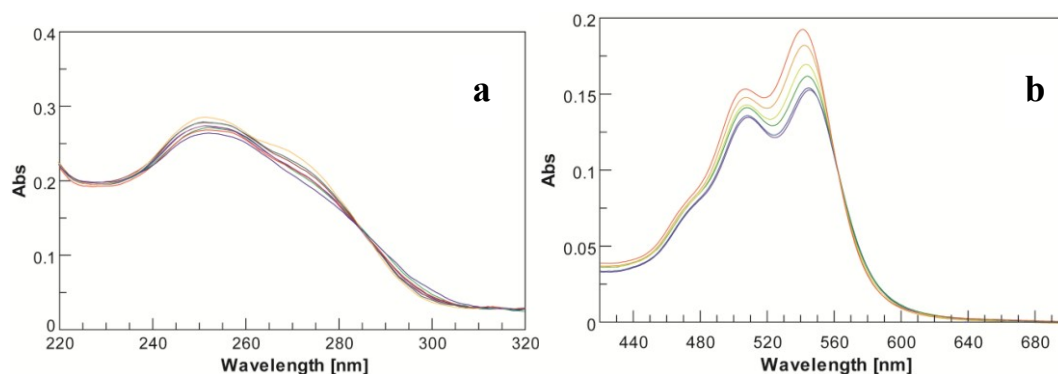


Figura 4.14: profili UV ottenuti per HTRp1 in H₂O a temperature crescenti da 10° ad 80°c nel range 220-320nm (a) e nel range 420-700nm (b)

HTR2 e HTRp2. Allo scopo di valutare le caratteristiche strutturali di HTRp2, è stato necessario prima procedere con la caratterizzazione dell'ON non coniugato. La gran parte dei lavori inerenti le strutture quadruplex formate dalle sequenze del telomero umano^{31,32} $5'(\text{TTAGGG})_4\text{GGG}3'$ riguardano infatti il tratto $5'\text{TTAGGG}3'$ ma mai è stato esaminato il tronco $5'\text{GGGTTA}3'$.

Gli spettri CD ottenuti per HTR2 ad una concentrazione di $2\mu\text{M}$, presentano una banda dicroica poco intensa a 259nm accompagnata da un minimo dicroico a 239nm sia in tampone contenente sodio che potassio. Aumentando la concentrazione dell'ON a $6\mu\text{M}$, il profilo dicroico presenta sia la banda a 260nm che quella 295nm suggerendo la presenza di due tipologie di strutture quadruplex, parallela ed antiparallela rispettivamente. Incrementando la temperatura il profilo cambia significativamente. Infatti a temperature superiori ai 50°C la banda dicroica associata alla struttura antiparallela scompare quasi totalmente (**fig. 4.15**).

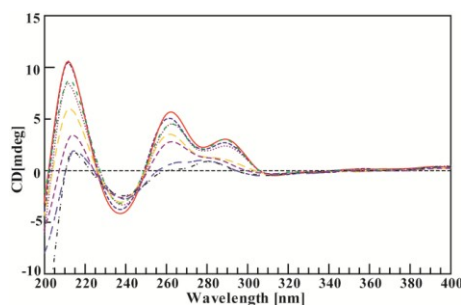


Figura 4.15: spettri CD registrati per HTR2 in tampone fosfato contenente ioni potassio ($10\text{mM KH}_2\text{PO}_4$, 100mM KCl , $\text{pH } 7.0$) a temperature crescenti da 10 ad 80°C . Concentrazione di HTR2 $6\mu\text{M}$.

Lo stesso comportamento strutturale è stato evidenziato da esperimenti ^1H NMR. Nella regione dei protoni imminici dello spettro registrato a 25°C sono presenti due differenti set di segnali attribuibili alle due tipologie di quadruplex formate. Incrementando la temperatura solo una parte di tali segnali persiste sopra i 50°C (**fig. 4.16**). Confrontando i dati relativi alla spettroscopia CD con i risultati degli esperimenti ^1H NMR, il set dei segnali compresi tra 12.4 e 11.45 ppm sono stati attribuiti alla struttura antiparallela, mentre i protoni imminici risonanti tra 11.4 e 10.6ppm sono stati attribuiti alla forma parallela.

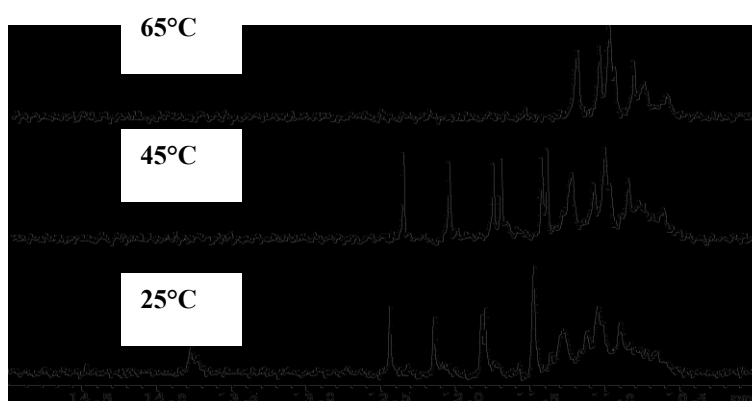


Figura 4.16: regione dei protoni imminici dello spettro ^1H NMR ottenuto per HTRp2 a temperature di 25° , 45° e 65°C .

I valori anomali di *chemical shift* di questi ultimi segnali sono probabilmente dovuti alla formazione di strutture ottameriche parallele. L'associazione di due quadruplex tetramolecolari può avvenire o mediante *stacking* tra i quartetti di dG posti ai terminali 5' (*end to end*

stacking)³³ (**fig. 4.17a**) o più probabilmente mediante slittamento di una guanina³⁴ (*interlocked*) (**fig. 4.17b**)

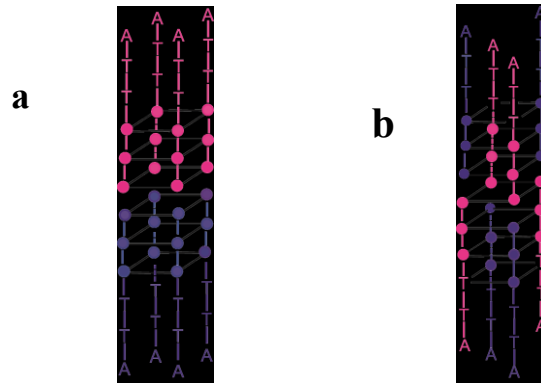


Figura 4.17: strutture quadruplex parallele ottameriche formate per interazioni ‘end to end stacking’ tra i quartetti posti ai terminali (a) o per slittamento di filamenti (b).

La formazione di una struttura quadruplex tetramolecolare antiparallela risulta essere alquanto inusuale. Tuttavia in questo caso la formazione di coppie A-T (identificabili da i segnali imminici a 13.7ppm) alle estremità della quadruplex potrebbe contribuire alla stabilizzazione dell’arrangiamento antiparallelo (**fig. 4.18**).

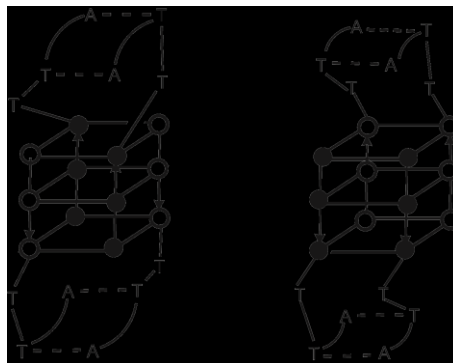


Figura 4.18: arrangiamento quadruplex con filamenti antiparalleli, stabilizzato dalla formazione di coppie A-T Watson-Crick.

Il differente comportamento della sequenza HTR2 rispetto a quello del tronco descritto 5'TTAGGG3' potrebbe essere dovuto proprio alla differente posizione del tratto TTA lungo la sequenza.

La presenza del perilene all'estremità 5' della sequenza (HTRp2) influenza significativamente la tipologia delle strutture quadruplex formate. Gli spettri dicroici mostrano infatti una perdita quasi totale della capacità di formare strutture parallele probabilmente a causa del forte ingombro sterico che si verrebbe a creare se quattro unità perileniche stessero dallo stesso lato della struttura quadruplex. HTRp2 dà luogo infatti, sia in tampone fosfato contenente ioni sodio che ioni potassio, solo ad una banda dicroica a 290nm accompagnata da una banda negativa a 240nm (**fig. 4.19**).

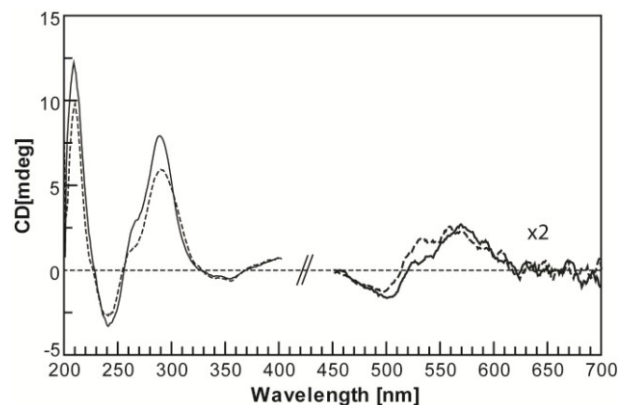


Figura 4.19: profili CD ottenuti per HTRp2 (6μM) in tampone contenete ioni sodio (linea tratteggiata) e potassio (linea continua).

La stabilità termica di HTR2 e HTRp2 è stata valutata mediante esperimenti di CD *melting*, ossia monitorando le intensità delle bande dicroiche a 295nm con l'incremento della temperatura da 10° a 90°C. La

presenza dell'unità perilenica sembra contribuire alla stabilità della struttura quadruplex antiparallela formata (**fig. 4.20**).

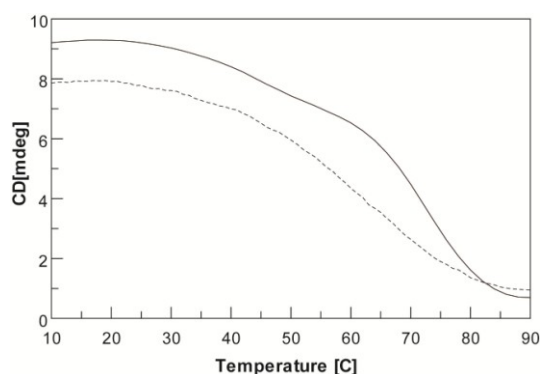


Figura 4.20: profili di fusione ottenuti per HTR2 (linea tratteggiata) e HTRp2 (linea continua) in tampone fosfato contenente ioni potassio monitorando le intensità delle bande dicroiche a 295nm con l'incremento della temperatura da 10° a 90°C

Analogamente a quanto accade per HTRp1, lo spettro dicroico presenta a lunghezze d'onda alte un effetto Cotton centrato a 542nm. Tali bande dicroiche scompaiono completamente intorno a 60°C (**fig. 4.21a**).

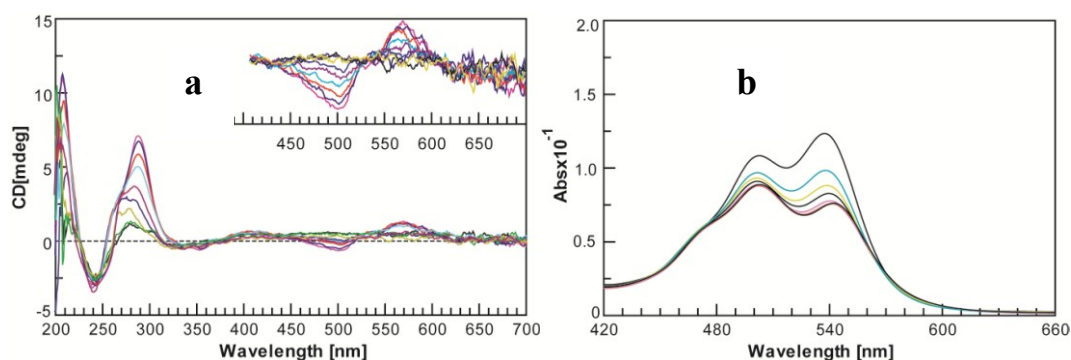


Figura 4.21: profili CD (a) e UV (b) a lunghezze d'onda alte ottenuti per HTRp2 in tampone potassio incrementando la temperatura da 10° ad 80°C.

Come sopra descritto per la sequenza HTRp1, anche in questo caso le bande relative ai massimi di assorbimento del perilene 505 e 542nm negli spettri UV/visibile mostrano intensità invertita sia in tampone sodio che in presenza di ioni potassio. Esse, ed in particolare la banda a 542nm, subiscono un forte effetto ipercromico innalzando la temperatura da 10° ad 80°C (**fig. 4.21b**).

Riportando in un grafico i valori delle bande di assorbimento a 542nm e a 503nm in funzione della temperatura, le curve ottenute si incrociano a 50°C circa. La bande dicroiche associate all'ON scompaiono alla stessa temperatura che a sua volta corrispondente alla temperatura di fusione della struttura (**fig. 4.22**). Ciò sembra suggerire una forte interazione tra i cromofori del perilene e la struttura quadruplex.

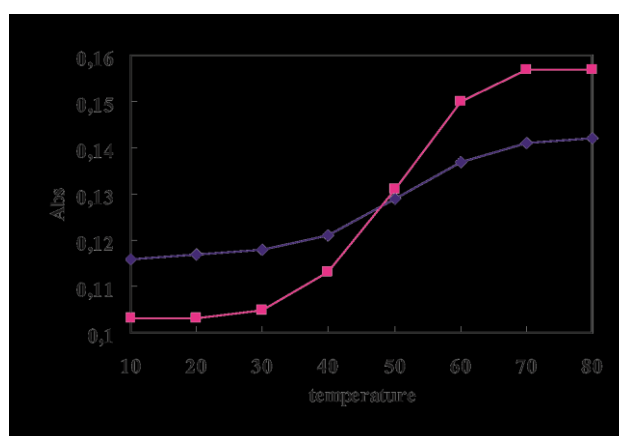


Figura 4.22: profilo grafico ottenuto per HTRp2 in tampone fosfato contenente ioni potassio monitorando le variazioni delle bande di assorbimento UV/vis a 542nm (quadrantini blu) e a 503nm (quadrantini rosa) in funzione della temperatura.

4.3.3 Esperimenti elettroforetici

Per gli esperimenti elettroforetici sono stati preparati gel al 16% (29:1 acrilammide/bisacrilammide). Come standard di riferimento sono stati utilizzati l' ON TG₄T il quale è noto formare una struttura quadruplex tetramolecolare, un dsDNA (^{5'}TCAGTTAGCTCTGTT^{3'} x ^{5'}AACAGAGCTAACTGA^{3'}) ed il filamento *random coil* ^{5'}AACAGAGCTAACTGA^{3'}.

HTRp1, come precedentemente descritto per gli esperimenti dicroici, mostra un differente comportamento a seconda del catione presente in soluzione. Utilizzando ioni potassio sia per l'*annealing* dei campioni che in aggiunta al buffer di corsa TBE (tris-borato-EDTA), HTRp1 mostra due bande a differente mobilità elettroforetica, ma molto vicine analoghe alle due bande presenti per HTR e che in letteratura sono state attribuite alle due tipologie di quadruplex formate, parallela ed antiparallela (**fig. 4.23a**). Gli esperimenti elettroforetici condotti in presenza di sodio mostrano invece per HTRp1 una serie di bande ad elevato peso molecolare, attribuibili a specie di tipo polimerico (**fig. 4.23b**).

a

b

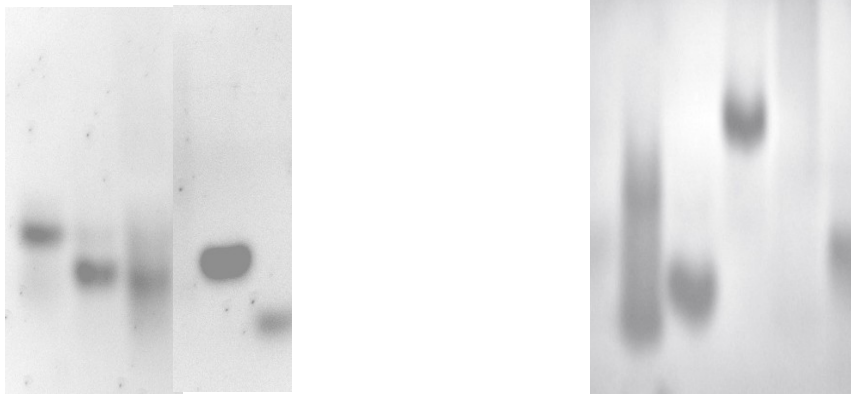


Figura 4.23: Gel di acrilamide/bis acrilamide al 16%. **a)** tampono potassio. linea 1: TG_4T , linea2: $HTR1$; linea3: $HTRp1$; linea4: $dsDNA$ ($5' TCAGTTAGCTCTGTT^3' x^5' AACAGAGCTAACTGA^3'$); linea5: $ssDNA$ ($5' AACAGAGCTAACTGA^3'$). **b)** tampono sodio. Linea1: $Tel21mer$ ($(GGGTTA)_3GGG$); linea 2: TG_4T ; linea 3: $HTR1$; linea 4: $HTRp1$.

Gli esperimenti condotti per HTR2 e HTRp2 mostrano identico profilo sia in presenza di ioni sodio che di ioni potassio. In particolare HTR2 dà origine a tre bande, di cui una ha lo stesso cammino elettroforetico del TG_4T ed è pertanto attribuibile alla formazione di una quadruplex tetramolecolare, una più lenta associabile alla specie ottamerica, ed una più veloce attribuibile al filamento *random coil*, ossia alla forma non strutturata. HTRp2 origina invece solo una banda corrispondente alla specie tetramolecolare, che in questo caso risulta avere una mobilità elettroforetica ritardata a causa del più elevato peso molecolare per la presenza dell'unità perilenica (**fig. 4.24**).

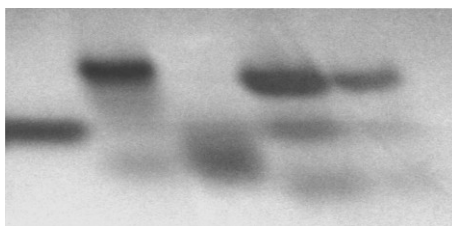


Figura 4.24: Gel di acrilammide/bis acrilamide al 16% in tampono sodio. Linea 1: TG_4T ; linea 2: $HTR2p$; linea 3: colorante di riferimento; linee 4 e 5: $HTR2$ a due differenti concentrazioni.

4.4 Conclusioni

Le diimmidi perileniche mostrano proprietà interessanti che le rendono utili per un gran numero di applicazioni. La loro capacità di interazione con diversi tipi di strutture del DNA (duplex, triplex, quadruplex) ha incoraggiato alla sintesi di coniugati. Tuttavia la scarsa solubilità delle diimmidi perileniche nei solventi organici a causa della formazione di aggregati limita la possibilità di impiego della classica chimica del fosforamidato, la metodica sintetica più efficiente comunemente impiegata per la sintesi oligonucleotidica in fase solida. Con l'obiettivo di ottenere derivati con migliori proprietà di solubilità, abbiamo scelto di lavorare con substrati dibromurati appartenenti quindi alla famiglia dei sistemi ' π -core twisted'. Una parte sintetica del lavoro intrapreso ha riguardato quindi la selezione del tipo e della lunghezza della catena laterale ottimali. Tra i quattro derivati sintetizzati solo 4d ha mostrato avere, oltre che una buona solubilità nei solventi organici, anche una

reattività dei gruppi alcolici in catena laterale tale da consentire la sua conversione nel derivato finale fosforammidito 5d con alte rese. Il derivato 5d è risultato inoltre essere stabile in tutti i cicli della sintesi oligonucleotidica in fase solida.

Per ottenere oligonucleotidi poli G coniugati, due sequenze HTR1 e HTR2 sono state estrapolate dalla ripetizione telomerica umana. Mentre HTR1 era già stata descritta in lavori precedenti, per valutare l'influenza del perilene sulla strutturazione in quadruplex tetramolecolari, è stato necessario prima caratterizzare la sequenza HTR2. Le sequenze 5'-dibromoperilene-coniugate, HTRp1 e HTRp2 sono state sintetizzate scegliendo di accoppiare manualmente 5d all'ossidrilico in 5' della sequenza ancora legata al supporto solido (secondo le procedure descritte nella sezione 'procedure sperimentali'). Cicli di accoppiamento della durata di venti minuti hanno dato rese di accoppiamento soddisfacenti. E' stata quindi valutata la capacità della sequenze HTRp1 e HTRp2 di formare strutture quadruplex mediante esperimenti CD, UV ed elettroforesi. I risultati ottenuti circa la sequenza coniugata HTRp1 mostrano che la presenza del perilene non influenza la tipologia delle strutture quadruplex formate che risulta essere ancora fortemente condizionata dal tipo di catione (sodio o potassio) in soluzione. I dati ottenuti dalla spettroscopia CD e UV suggeriscono la formazione di aggregati in soluzione. Tale dato è anche supportato dagli spettri di

fluorescenza (dato non mostrato) nei quali si osserva un significativo fenomeno di *quenching* dell'emissione in tutte le condizioni utilizzate. In particolare l'intensità degli spettri di fluorescenza si riduce notevolmente alle basse temperature e incrementa con il riscaldamento del campione seguendo lo stesso *trend* delle bande UV associate al perilene. Sulla base della teoria dell'*exciton coupling* si può ipotizzare che in soluzione siano presenti aggregati di tipo H che derivano o dall'associazione tra unità di dibromperilene o dall'interazione tra dibromperilene e quadruplex.

Considerando la propensione dei derivati '*core twisted*' di formare in soluzione dimeri piuttosto che aggregati estesi, abbiamo ipotizzato che HTRp1 esista in soluzione acquosa, con o senza sali, essenzialmente come un dimero nel quale due unità perileniche sono unite da interazioni $\pi-\pi$ *stacking*. Tale dimero, ripiegandosi può originare molto facilmente la struttura quadruplex bimolecolare parallela (**fig. 4.25**) in quanto le unità perileniche si trovano dallo stesso lato della struttura. Inoltre il quartetto di G al terminale 5' risulta libero e accessibile per interazioni $\pi-\pi$ con il dibromo-perilene. Una struttura di questa tipologia spiegherebbe la forte interazione tra quadruplex ed unità di perilene riscontrata dalla presenza di bande dicroiche della regione del visibile degli spettri CD e l'alta stabilità termica della struttura quadruplex parallela formata in presenza di ioni potassio.

Al contrario il ripiegamento del dimero nella quadruplex antiparallela è impedito dal fatto che i terminali 5' si trovano a lati opposti della struttura.

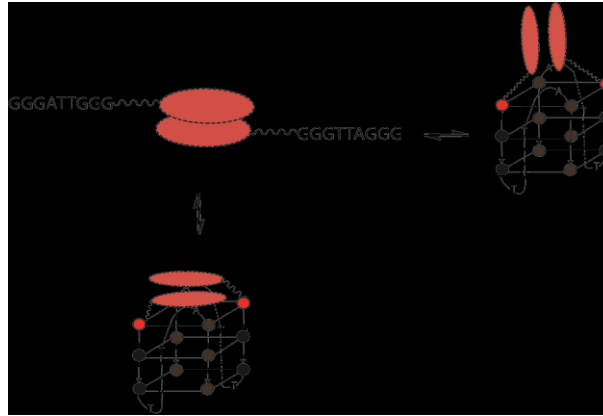


Figura 4.25: possibile formazione di una struttura quadruplex bimolecolare parallela partendo da un dimero nel quale due unità perilene sono unite da interazioni π - π stacking

La quadruplex antiparallela può essere tuttavia generata dall'interazione tra due dimeri (**fig. 4.26**). In questo caso le unità di perilene interagiscono tra di loro ma non direttamente con la struttura quadruplex e ciò giustifica l'assenza di bande dicroiche alle lunghezze d'onda alte degli spettri CD. Inoltre il filamento oligonucleotidico può per nucleazione originare un polimero misto nel quale dimeri del dibromoperilene sono separati da strutture quadruplex bimolecolari. La formazione di polimeri spiegherebbe le bande ad elevato peso molecolare presenti nel PAGE in sodio e il fenomeno di fusione non cooperativo ottenuto monitorando la struttura quadruplex antiparallela formata in sodio.

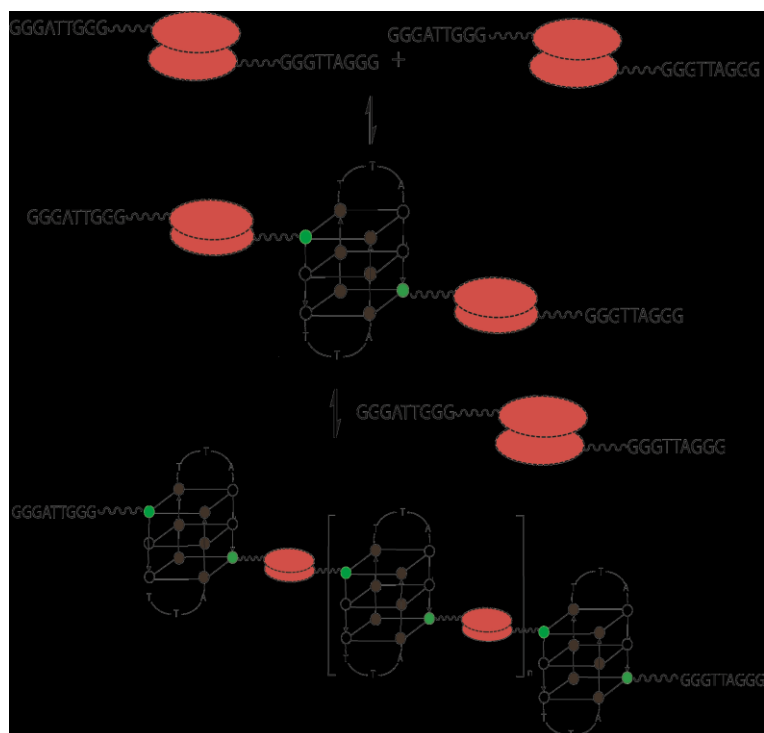


Figura 4.26.: possibile formazione di una struttura quadruplex bimolecolare antiparallela per interazione tra due dimeri e elongazione del polimero per nucleazione

Si può supporre quindi che in una soluzione contenente potassio, i dimeri assumono strutture quadruplex parallele, mentre il singolo filamento può originare indifferentemente strutture quadruplex parallele o antiparallele. Di conseguenza, la lenta isomerizzazione tra le due forme non può essere un processo a due stadi come descritto per HTR1. Ciò è anche evidente dal fatto che mancano punti isoellittici nei profili CD registrati nel tempo. Nella struttura parallela inoltre le unità perileniche sono disposte

per interagire o con il quartetto di G adiacente oppure possono disporsi perpendicolarmente alla quadruplex.

In assenza di ioni sodio o potassio, il dimero forma velocemente la struttura parallela, la quale però converte rapidamente nella forma antiparallela che può essere stabilizzata mediante formazione di specie polimeriche.

Le caratteristiche chimico-fisiche dei polimeri formati saranno studiate mediante l'impiego di altre tecniche quali la microscopia a forza atomica, il *light scattering*, la densitometria.

Per quanto riguarda gli studi strutturali condotti per HTR2, essi indicano che sono possibili due differenti tipologie di strutture quadruplex, parallela ed antiparallela sia in presenza di ioni sodio che potassio. Dal confronto tra i dati relativi alla spettroscopia CD, i dati ¹HNMR ed elettroforetici, è stato ipotizzato che la forma parallela è associabile ad una specie ottamerica formata dall'interazione tra due quadruplex tetramolecolari o mediante slittamento di un filamento o mediante interazione tra i quartetti di G posti ai terminali. Alla luce delle nostre conoscenze, HTR2 è l'unica sequenza formante una quadruplex tetramolecolare con filamenti antiparalleli. Questo inusuale arrangiamento potrebbe essere favorito dalla formazione di coppie Watson-Crick T-A. La presenza dell'unità perilenica, in questo caso, influenza significativamente la tipologia della quadruplex formata. Infatti l'ingombro sterico generato da

quattro unità perileniche allo stesso lato della struttura impedisce quasi completamente l'arrangiamento parallelo favorendo ulteriormente l'insolita disposizione antiparallela dei filamenti.

4.5 Procedure sperimentali

Sintesi derivati 3a-d

L'anidride 3,4:9,10 perilentetracarbossilica, commercialmente disponibile (500mg, 0.91mmol), è stata sottoposta a reazione di bromurazione secondo le procedure precedentemente descritte. Il prodotto disostituito, sottoforma di due possibili isomeri, è stato solubilizzato in 20ml di una miscela N,N-dimetilacetammide e 1,4-diossano 1:1v/v. L'appropriato amminoalcol (2 mmol), commercialmente disponibile è stato aggiunto e la reazione lasciata sotto agitazione elettromagnetica e flusso di argon a 120°C da 30 minuti fino a 2h, a seconda del reagente. Al completamento della reazione il grezzo è stato raffreddato e diluito con H₂O ottenendo i prodotti desiderati 3a-d sottoforma di solidi di colore rosso i quali dopo ripetuti lavaggi con H₂O sono stati recuperati per filtrazione ed anidrificati.

N,N'-Bis(2-idrossietil)-1,7-dibromoperilene-3,4:9,10-diimmide

tetracarbossilica (3a): (Resa: 82%)

¹H NMR (200MHz, CDCl₃): δ =9.46 (d, 2H), δ =8.91 (s, 2H), δ =8.69 (d, 2H), δ =4.50 (m, 8H).

ESI MS *m/z*: 740.9466 [(M+Na)⁺]

N,N'-Bis(3-idrossipropil)-1,7-dibromoperilene-3,4:9,10-diimmide

tetracarbossilica (3b) (Resa: 89%)

^1H NMR (200MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 9:1): δ =9.42 (d, 2H), δ =8.83 (s, 2H), δ =8.61 (d, 2H), δ =4.24 (t, 4H), δ =3.60 (t, 4H), δ =1.90 (m, 4H)

ESI MS m/z : 684.9589 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$

N,N'-Bis(5-idrossipentil)-1,7-dibromoperilene-3,4:9,10-diimmide
tetracarbossilica (3c) (Resa: 92%)

^1H NMR (200MHz, CDCl_3): δ =9.47 (d, 2H), δ =8.91 (s, 2H), δ = 8.69 (d, 2H), δ =4.23 (t, 4H), δ =3.69 (t, 4H), δ =1.8-1.2 (m, 12H)

ESI MS m/z : 741.0234 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$

N,N'-Bis(5-idrossi-3-ossapentil)-1,7-dibromoperilene-3,4:9,10-diimmide
tetracarbossilica (3d) (Resa: 95%)

^1H NMR (200MHz, CDCl_3): δ =9.38 (d, 2H), δ =8.84 (s, 2H), δ = 8.62 (d, 2H), δ =4.49 (t, 4H), δ =3.91 (t, 4H), δ =3.72 (m, 8H)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ =163.2 (C=O), δ =162.8 (C=O), δ =138.3 (ar), δ =133.0 (ar), δ =132.9 (ar), δ =130.3 (ar), δ =129.2 (ar), δ =128.6 (ar), δ =127.1 (ar), δ =123.1 (ar), δ =122.7 (ar), δ =121.0 (ar), δ =72.6, 68.5, 62.0, 40.2 ppm.

ESI MS m/z : 744.9830 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$

UV (CHCl_3) λ max, nm ($\epsilon \times 10^{-4}$, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) : 492 (3.2), 528 (4.7); UV (DMSO) λ max, nm ($\epsilon \times 10^{-4}$, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) : 492 (3.2), 527 (4.6).

Sintesi 4a-d

I composti 3a-d (0.483 mmol), 4,4' dimetossimetilcloruro (0.6 eq) e DMAP (0.05 eq) sono stati solubilizzati in 2ml di ciascun sistema

solvente testato (**tab. 4.1**). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione elettromagnetica e flusso di argon per un'ora. La reazione è stata interrotta per aggiunta di 0,5ml di metanolo anidro.

Dopo circa 10 minuti i solventi sono stati allontanati *in vacuo* ed il grezzo di reazione purificato mediante cromatografia sul gel di silice eluito con DCM:MeOH:TEA (99:1:5 v/v/v). Le rese di reazione ottenute per ciascun substrato e per ciascun sistema eluente sono riportate in tabella 4.1.

4d R_f= 0.4 (92:8 DCM/MeOH). ¹H NMR (CDCl₃): δ=9.45 (d, 2H); δ=8.95 (s, 2H); δ=8,67 (d, 2H); δ=7.35 (t, 2H); δ=7.20 (t, 1H); δ=6.90 (d, 4H); δ=6.80 (d, 6H); δ=4.49 (t, 4H); δ=3.91 (t, 4H); δ=3.80 (s, 6H); δ=3.65 (m, 8H).

ESI MS m/z 1027 [M+H⁺]; 1049 [M+Na⁺]; 1065 [M+K⁺].

Sintesi 5d

Il derivato monotrilitato 4d (0.241 mmol) è stato anidrificato *in vacuo overnight*. È stato quindi solubilizzato in DCM anidro (6 ml) e DIPEA (4 eq). A tale soluzione è stata aggiunto il reattivo fosfitilante 2-cianoetildiisopropilclorofosforammidito (1.5 eq). Dopo 30 minuti sotto agitazione elettromagnetica e flusso di argon, la reazione è stata interrotta per aggiunta di metanolo anidro. Il grezzo di reazione è stato

diluito con acetato di etile (10 ml) e lavato prima con una soluzione al 10% di Na₂CO₃ (10 ml) e successivamente con una soluzione satura di NaCl (10 ml). La fase organica è stata anidrificata su MgSO₄ e concentrata *in vacuo*.

Il residuo è stato purificato su colonna impaccata con gel di silice ed eluita con DCM:EtOAc:TEA (80:10:10 v/v/v).

Resa = 95%; R_f = 0.8 (DCM:EtOAc:TEA 80:10:10 v/v/v).

¹H NMR (CDCl₃): δ=9.45 (d, 2H); δ=8.95 (s, 2H); δ=8,67 (d, 2H); δ=7.35 (t, 2H); δ=7.20 (t, 1H); δ=6.90 (d, 4H); δ=6.80 (d, 6H); δ=4.49 (t, 4H); δ=3.91 (t, 4H); δ=3.80 (t, 2H); δ=3.62 (s, 6H); δ=3.65 (m, 8H); δ=2.97 (m, 2H); δ=2.60 (t, 2H); δ=1.09 (s, 12H).

ESI MS m/z 1228 [M+H]⁺; 1250 [M+Na]⁺.

Sintesi degli oligomeri

Le sequenze ONs sono state ottenute mediante sintetizzatore automatico seguendo il protocollo classico del fosforamidito. Come supporto solido è stato impiegata la resina IcaaCPG *high loading*, funzionalizzata con il nucleotide G. Dopo l'elongazione delle sequenze, i supporti solidi sono stati trasferiti in un piccolo reattorino munito di setto, lavati con ACN anidro e anidrificati con argon (10min). Sono stati quindi messi a reagire con 5d (50mg) solubilizzato in DCM anidro (0.5ml) in presenza

di una soluzione attivante (5-etiltio-1H-tetrazolo 0.1M in ACN) per 20min. I supporti solidi sono stati quindi lavati per 3 volte con una miscela 1:1v/v DCM/ACN per rimuovere l'eccesso di reagenti prima di procedere al successivo ciclo di *coupling* (altri 50mg di 5d in 0.5ml). I successivi cicli di protezione e ossidazione sono stati condotti seguendo le procedure standard. Le rese di tutti gli step di accoppiamento sono state calcolate spettrofotometricamente mediante test del catione 4,4'-dimetossitritile ($\epsilon= 156000$). Il distacco degli oligomeri dai supporti solidi è stato effettuato mediante trattamento con una soluzione acquosa ammoniacale al 33% a temperatura ambiente per 48h. Il filtrati ed i lavaggi con H₂O del supporto solido sono stati uniti, ridisciolti in una soluzione basica di NH₃ al 5% e purificati per HPLC utilizzando una colonna a fase inversa C18 Purospher Star eluita con un gradiente lineare H₂O/ACN. I picchi sono stati identificati seguendo l'assorbimento UV sia a 260 che a 540nm. Il grado di purezza degli oligomeri è stato controllato mediante elettroforesi denaturante su gel di poliacrilammide contenente urea 7M. La concentrazione dei campioni è stata misurata spettrofotometricamente a 90°C usando i coefficienti di estinzione molare calcolati in accordo con il metodo di Gray e coll. Per il dibromoperilene è stato impiegato il coefficiente di estinzione molare calcolato in CHCl₃ ($\epsilon=29500$).

Le sequenze sono state controllate mediante spettrometria di massa usando un apparecchio MALDI-TOF autoflex Brucker e impiegando una miscela acido picolinico/acido 3-idrossipicolinico come matrice.

Spettroscopia UV

I campioni sono stati preparati ad una concentrazione finale di 10 μ M in due differenti tamponi fosfato: 100mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ pH 7.0 e 100mM KCl, 10 mM KH₂PO₄ pH 7.0. Gli spettri sono stati acquisiti sia nella regione delle lunghezza d'onda corte (220-360nm) che alte (360-700nm) a temperature crescenti da 10 ad 80°C., facendo equilibrare i campioni per 30 min a ciascuna temperatura.

Spettroscopia CD

Per l' acquisizione degli spettri è stato utilizzando uno spettropolarimetro JASCO 715 equipaggiato con un sistema di controllo della temperatura PTC-348. Ogni profilo CD è stato ottenuto come media di tre scansioni dalle quali è stato sottratto lo spettro del tampone da solo. Ciascun campione è stato equilibrato per 30 min a ciascuna temperatura prima dell'acquisizione degli spettri. I profili di fusione sono stati ottenuti monitorando l'intensità delle bande dicroiche a 295nm e/o a 262nm incrementando la temperatura da 10 ad 80°C (velocità di scansione 0.5°C/min).

Esperimenti elettroforetici

Gli esperimenti elettroforetici sono stati condotti su gel di poliacrilammide (di dimensioni 14x16x0.1) al 16% (29:1 acrilammide/bisacrilammide), usando un apparecchiatura BIORAD equipaggiata con Power-Pack 3000. I gel, termostatati a 4°C sono stati fatti correre per 6h con un voltaggio costante di 90V (160mA). Come *buffer* di corsa è stato utilizzato TBE (tris-acido borico- EDTA) addizionato di 100mM KCl o NaCl a pH 7.4. I campioni dopo essere stati sottoposti a procedura di *annealing*, sono stati equilibrati a 4°C per 24h. 5µl della soluzione degli ONs sono stati miscelati con 5µl di un buffer di caricamento (TBE 75%, glicerolo 25%) e caricati su gel ad una concentrazione finale di 10µM. I gel, dopo la corsa, sono stati trattati con una soluzione colorante di Syber Green per 30min e visualizzati con un sistema di acquisizione Biorad Gel Doc XR.

Riferimenti bibliografici

- ¹ Wurthner, F. *Chem. Comm.*, **2004**, 1564-1579
- ² Wang, W.; Han, J.J.; Wang, L.Q.; Li, L.S.; Shaw, W.J.; Li, A.D.Q. *Nano Lett.*, **2003**, 3, 455-458
- ³ Wurthner, F. *Angew.Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 1037-1039
- ⁴ Chen, Z.; Stephanenko, V.; Dehm, V.; Prins, P.; Siebbeles, L.D.A.; Seibt, J.; Marquetand, P.; Engel, V.; Wurthner, F. *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 436-449
- ⁵ Cuenca, F.; Greciano, O.; Gunaratnam, M.; Haider, S.; Munnur, D., Nanjunda, R.; Wilson, D.; Neidle, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 1668-1673.
- ⁶ Franceschin, M.; Lombardo, C.M.; Pascucci, E., D'Ambrosio, D.; Micheli, E; Bianco, A.; Ortaggi, G.; Savino, M. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 2292-2304
- ⁷ Franceschin, M. *Eur. J. Org. Chem* , **2009**, 2225-2238
- ⁸ Abballa, M.; Bayer, J., Radler, J.; Muller, K. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 3967-3970
- ⁹ Zheng, Y.; Hai, L.; Schatz, G.C.; Lewis, F.D. *Chem. Comm*, **2005**, 4795-4797
- ¹⁰ Aubert, Y., Asseline, U. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 3496-3503.
- ¹¹ Baumstarck, D.; Wagenknecht, H.A. *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, 6640-6645

- ¹² Zheng, Y.; Hai, L., Schatz, G.C.; Lewis, F.D. *Chem. Comm*, **2006**, 3830-3832
- ¹³ Lewis, F.D.; Zhang, L.; Kelley, R.F.; McCamont, D.; Wasielewsky, M.R. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 3457-3464.
- ¹⁴ Bevers, S.; Schutte, S.; Mc Laughlin, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 122, 5905-5915.
- ¹⁵ Rahe, N.; Rinn, C.; Carell, T. *Chem. Comm*, **2003**, 2120-2121
- ¹⁶ Wagner, C., Wagenknecht, H.A. *Org. Lett.*, **2006**, 8, 4191-4194
- ¹⁷ Chenn, Z.; Baumeisteriu, U.; Tschierske, C.; Wurthner, F. *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 450-465
- ¹⁸ Wurthner, F. *Pure Appl. Chem.*, **2006**, 78, 2341-2349
- ¹⁹ Schmidt, R.; Ling, M.M.; Oh, J.H.; Winkler, M.; Konemann, M.; Bao, Z.; Wurthner, F. *Adv. Mater.*, **2007**, 19, 3692-3697
- ²⁰ Chen, Z.; Debije, M.G.; Debaerdemaeker, T.; Osswald, P.; Wurthner, F. *Chem. Phys. Chem.*, **2004**, 5, 137-140
- ²¹ Franceschin, M.; Alvino, A.; Ortaggi, G.; Bianco, A. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 9015-9020
- ²² Mergny, J.J., Li, J., Lacroix, L., Amrane, S., Chaires, J.B. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, e138
- ²³ Vorlickova, M.; Chladkova, J.; Kejnovska, I.; Fialova, M.; Kypr, J. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 5851-5860

- ²⁴ Kaushik, M.; Bansal, A.; Safena, S.; Kukreti, S. *Biochemistry*, **2007**, 46, 7119-7131
- ²⁵ Kypr, J.; Kejnovska, I.; Renciuik, D.; Vorlickova, M. *Nucleic Acids Res.*, **2009**, 37, 1713-1725
- ²⁶ Mergny, J.L.; Lacroix, L. *Oligonucleotides*, **2003**, 13, 515-537
- ²⁷ Mergny, J.L.; Phan, A.T.; Lacroix, L. *FEBS Letters*, **1998**, 435, 74-78
- ²⁸ Yagai, S., Seki, T.; Karatsu, T.; Kitamura, A., Wurthner, F. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 3367, 3372
- ²⁹ Wurthner, F.; Thalacker, C.; Diele, S.; Tschierske, C. *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 2245-2253.
- ³⁰ Kaiser, T.E.; Stepanenko, V.; Wurthner, F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 6719-6732.
- ³¹ Koto, Y.; Ohyama, T.; Mita, H.; Yamamoto, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 9980-9981
- ³² Wang, Y. Patel, D. *Biochemistry*, **1992**, 31, 8112-8119
- ³³ Sun, H.; Xiang, J.; Tang, Y.; Xu, G. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **2007**, 352, 942-946
- ³⁴ Krishnan-Ghosh, Y.; Liu, D.; Balasubramanian, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 11009-11016

CAPITOLO 5

SINTESI DI MOLECOLE DI NATURA PEPTIDICA ATTE ALLA VEICOLAZIONE DI FARMACI

5.1 Introduzione

Le piene potenzialità terapeutiche di farmaci di natura oligonucleotidica, e peptidica, sono spesso compromesse dalla loro limitata capacità di attraversare le membrane cellulari^{1,2}. Da circa 10 anni prospettive interessanti per la veicolazione di tali molecole vengono dal loro legame o assemblaggio a *carrier* di natura peptidica detti CPPs (Cell Penetrating Peptides).

I CPPs, anche noti come ‘sequenze traslocanti le membrane’ (PTDs) o ‘Trojan peptides’, sono brevi sequenze peptidiche, generalmente meno di 30 residui, caratterizzati da un’alta densità di amminoacidi basici e in grado di offrire grosse opportunità per la traslocazione di carichi di diversa natura e dimensioni come oligonucleotidi, proteine e liposomi fino a 200nm³. La prima scoperta di peptidi di questa famiglia riguarda proprio la proteina TAT del virus dell’HIV-1. In un eccellente studio condotto nei topi, in seguito a iniezione intraperitoneale della proteina β -galattosidasi coniugata ad un CPP oligocationico derivante dalla proteina ‘Tat’ del virus dell’immunodeficienza umana, furono ritrovati alti livelli di tale proteina in tutti gli organi e a livello plasmatico⁴.

Solo dopo qualche anno dall'osservazione che tale proteina ricombinante era in grado di attraversare le membrane cellulari, si scoprì che la sequenza minima responsabile dell'*uptake* era costituita da 11 residui (YGRKKRRQRRR). Durante lo stesso periodo (1994) si scoprì che un frammento derivante dall'omodominio di *Drosophila Antennapedia* (RQIKIWFQNRRMKWKK), anche chiamato 'penetratina' aveva le stesse proprietà^{5,6}. Queste due scoperte aprirono la strada alla ricerca di nuove CPPs sia naturali, come le penetratine, che sintetiche come trasportani, poliarginine e polilisine di diversa lunghezza (**tab. 5.1**).

Name	Origin	Sequence
Tat family		
Tat (48-60)	HIV-1 protein	GRKKRRQRRRPPQQ
Oligoarginine	Tat derivative	R _n
Penetratin family		
pAntp	Antennapedia homeodomain	RQIKIWFQNRRMKWKK
pIsl	Isl-1 homeodomain	RVIRVWFQNKRCCKDKK
Chimeric CPPs		
Transportan	Galanin-mastoparan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
MPG peptides		
Pβ	gp41-SV40	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV
Pα	gp41-SV40	GALFLAFLAAALSMLGLWSQPKKKRKV
Pep-1	Trp-rich motif-SV40	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
Antimicrobial-derived CPPs		
Buforin 2	Toad stomach	TRSSRAGLQWPVGRVHRLLRK
Bac715-24	Bactenecin family	PRPLPFPRPG
SynB(1)	Protegrin 1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR
Other CPPs		
pVEC	Murine VE-cadherin	LLIILRRRIRKQAHASK
VP22	Viral protein (HSV-1)	DAATATRGRSAASRPTE- -RPRAPARSASRPRRPVE
hCT-derived peptides		
hCT(9-32)	Human calcitonin	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP
hCT(9-32)-br	Human calcitonin, SV40	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP
SAP	Modified maize	AFGVGPDEVKRRKKP-NH ₂
Protamin	Salmon roe	VRLPPP-VRLPPP-VRLPPP Mixture of protamin 1-4

Tabella 5.1: Esempi di alcune famiglie di CPPs, loro origine e sequenze minime necessarie per la traslocazione cellulare

Il meccanismo con cui essi penetrano le membrane è tuttora al centro di accese controversie. Alcune evidenze sperimentali sembrano infatti indicare un meccanismo di traslocazione energia-dipendente o fenomeni di endocitosi, altre un meccanismo energia-indipendente. Entrambe le possibilità hanno tuttavia dei problemi concettuali che non hanno finora trovato soluzione⁷. La mancanza di specificità ad esempio non correla bene con l'idea che tali peptidi possano interagire con recettori sulla membrana cellulare. D'altro canto non sembra neppure plausibile l'idea che essi possano diffondere passivamente attraverso la membrana: tali peptidi sono infatti altamente idrofilici e una traslocazione diretta attraverso il *bilayer* fosfolipidico comporterebbe un dispendio energetico elevatissimo. E' noto tuttavia che alcuni peptidi antimicrobici attraversano la membrana plasmatica batterica in maniera energia-indipendente creando dei pori stabili solo per pochi millisecondi. I CPPs potrebbero servirsi di un meccanismo simile. Recentemente Richard e coll⁸. hanno proposto per l'internalizzazione delle penetratine e dei peptidi TAT, un meccanismo di endocitosi. Secondo tale meccanismo, i peptidi interagiscono elettrostaticamente con la matrice extracellulare della membrana cellulare legandosi ai residui di glicosamminoglicano carichi negativamente prima dell'endocitosi.

Il legame dei peptidi alla superficie cellulare induce in ogni caso una distorsione e una redistribuzione dei fosfolipidi di membrana. I peptidi

TAT ad esempio creano delle regioni a maggiore densità con i fosfati della membrana che circondano il peptide e regioni a più bassa densità con i gruppi fosfato lontano dal peptide. Queste perturbazioni producono un assottigliamento del doppio strato fosfolipidico, abbassando pertanto la barriera di energia libera creata dal core idrofobico della membrana⁹. Tenendo conto di ciò, Hence e Garcia hanno recentemente proposto la possibilità di un meccanismo di traslocazione energia indipendente. Esso prevede l'attraversamento di residui carichi attraverso il doppio strato e la diffusione passiva dei peptidi grazie alla formazione di pori acquosi toroidali.

5.2 Obiettivi

Il gruppo di ricerca diretto dalla Prof.ssa Solange Lavielle (Università Pierre e Marie Curie, Parigi), presso cui è stata svolta parte dell'attività formativa del corso di dottorato, da molti anni ha indirizzato le sue attenzioni verso la sintesi chimica e gli studi biofisici di nuovi CPPs^{10,11,12}. In particolare, in un recente lavoro è stato studiato l'impatto delle modifiche della struttura chimica dei CPPs sull'efficienza nella veicolazione. A tale scopo era stata quindi sintetizzata una minilibreria di *carrier* pseudo-peptidici i quali presentavano differenti gruppi funzionali che sono noti promuovere l'*uptake* cellulare dei CPPs (ammonio o

guanidinio e acido miristilico). Utilizzando come *scaffold* di partenza un residuo di 'bis-ornitina'¹³, erano stati sintetizzate strutture lineari e dendrimeriche che consentivano una differente disposizione spaziale dei gruppi funzionali (**fig. 5.1**).

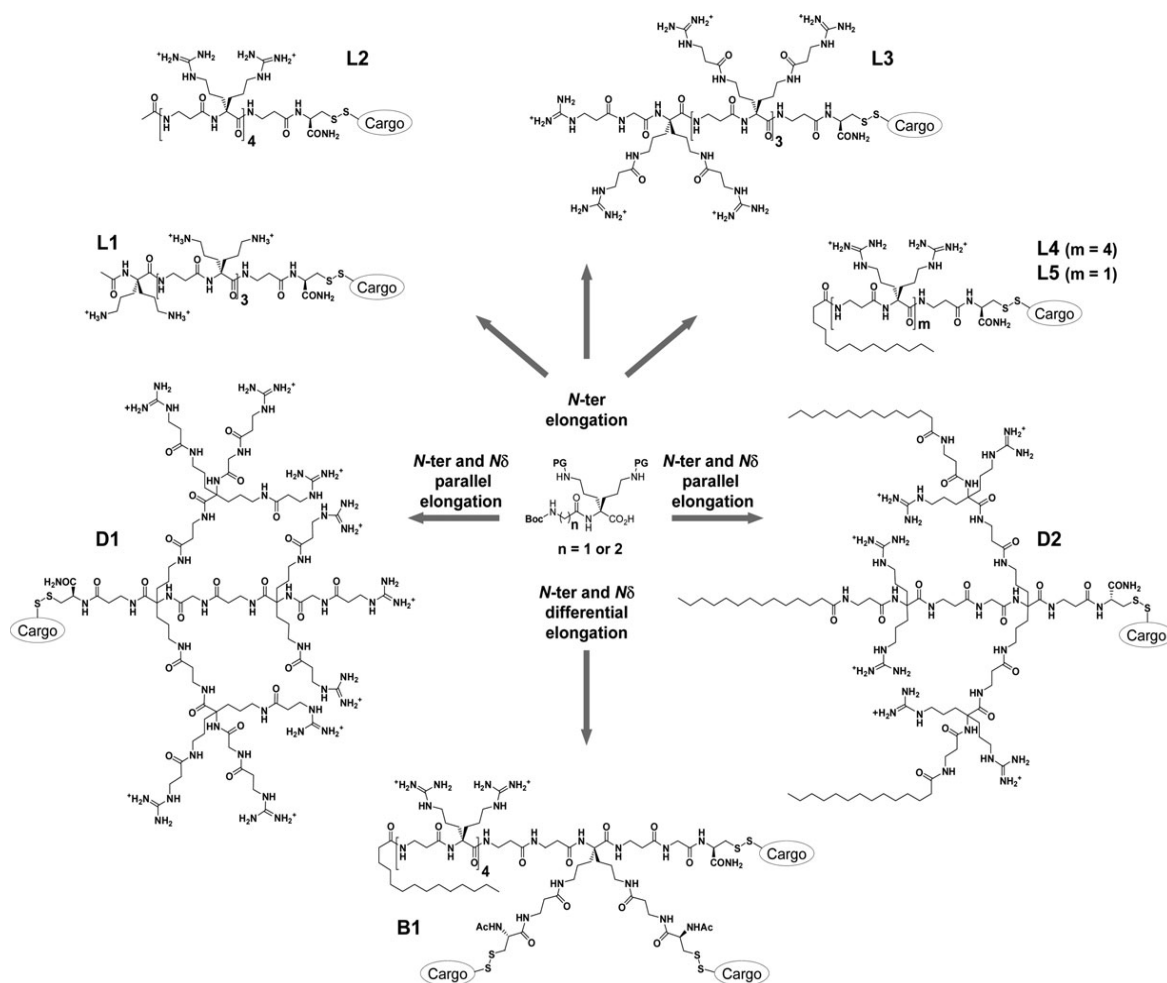


Figura 5.1: carrier pseudo-peptidici con struttura lineare o dendrimerica, assemblati a partire da un residuo di bis-ornitina

Come ‘carico’ da veicolare era stato scelto un peptide idrofilico corrispondente alla proteina-chinasi PKCi, la quale da sola è scarsamente internalizzata. Tale peptide era stato legato ai *carrier* mediante un ponte disolfuro il quale veniva ridotto nei compartimenti intracellulari conducendo al rilascio del peptide. La quantità di carico internalizzato e la sua distribuzione intracellulare erano state esaminate mediante spettrometria di massa MALDI TOF e microscopia confocale.

I dati ottenuti (**fig. 5.2**) indicavano che non vi erano grosse differenze tra i *carrier* L1 ed L2 aventi rispettivamente 4 residui di bis-ornitina e di bis-arginina. Al fine di incrementare la flessibilità del *backbone* cationico erano stati elongate le catene della bis-ornitina (L3) e sintetizzate strutture dendrimeriche (D1). Ma nessuna delle due modifiche aveva mostrato avere un impatto significativo sulla veicolazione dei CPPs. Al contrario l’inserimento di una catena di acido grasso (acido miristilico) aveva significativamente migliorato l’efficienza nel trasporto di PKCi (L4 circa 7 volte più efficiente di L2).

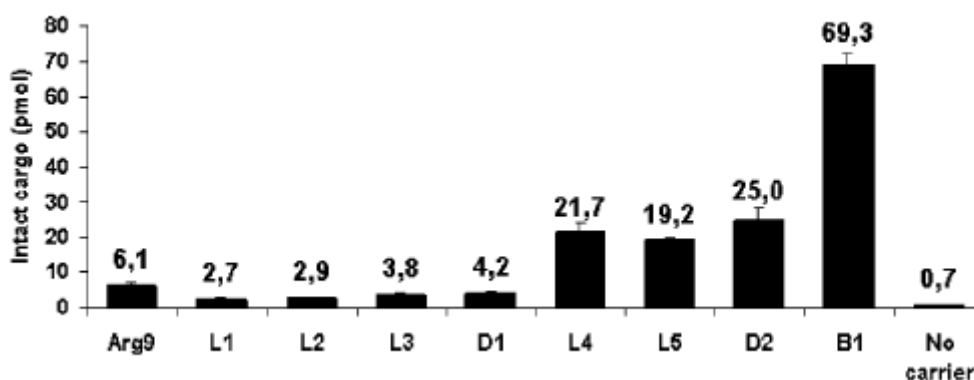


Figura 5.2: *Quantità di peptide internalizzato nelle cellule determinata mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. Le cellule sono state incubate con i coniugati (7.5 μM) per 75min a 37°C. Ciascun dato è la media di tre esperimenti.*

Sulla base dei risultati precedentemente ottenuti, l'obiettivo del lavoro di ricerca svolto in collaborazione con il gruppo diretto della Prof.ssa. Solange Lavielle è stato la messa a punto di una strategia di sintesi per l'ottenimento in soluzione di una nuova minilibreria di *carrier* pseudo peptidici. Tali vettori differiscono per il numero di gruppi protonabili, la distanza tra di essi ed il tipo di acido grasso in catena laterale (**fig. 5.3**). Il composto **I** presenta 4 gruppi carichi positivamente, gruppi guanidinio che sono noti promuovere l'*uptake* cellulare, separati da un residuo di glicina per aumentare la flessibilità del *backbone* e migliorare quindi l'interazione con i gruppi fosfato della membrana cellulare; **II** presenta invece gli stessi gruppi funzionali ma non separati da alcun *linker*; **III** infine rappresenta una struttura minimalista con soli due gruppi carichi positivamente. Tutte le strutture possono essere diversamente

funzionalizzate inserendo catene di acidi grassi di diversa lunghezza e natura (sature e insature).

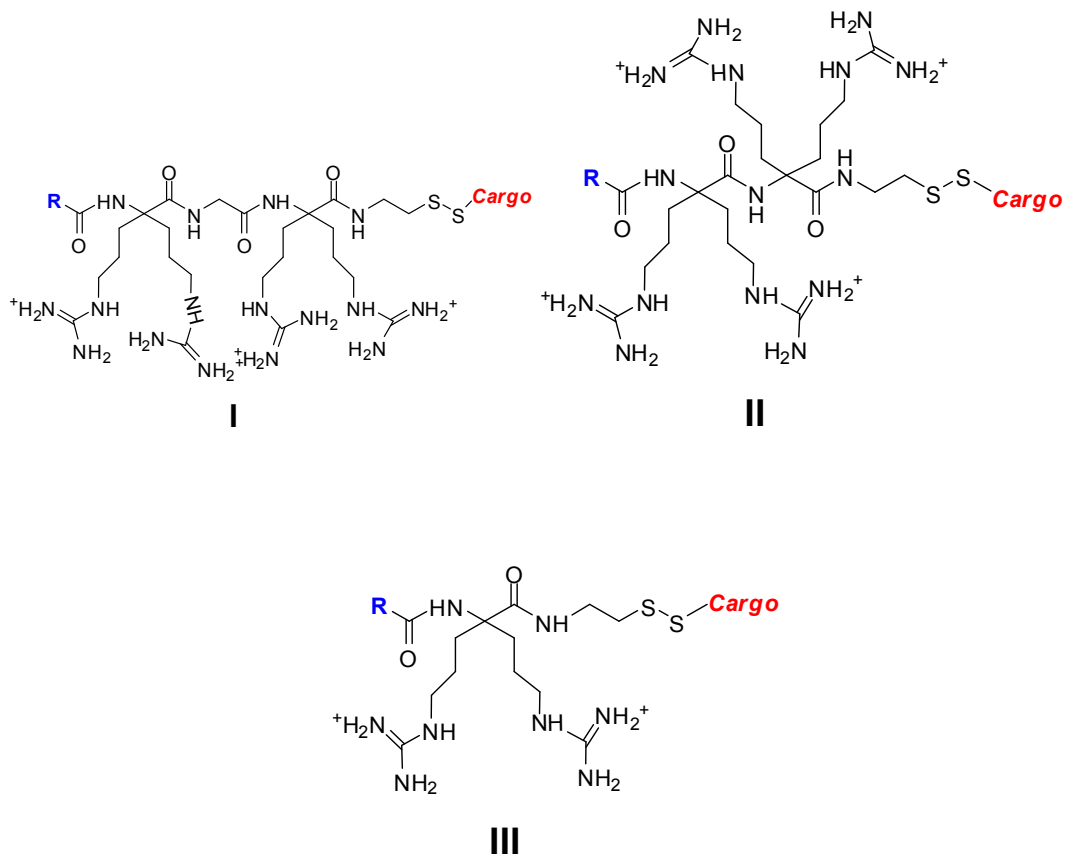


Figura 5.3: obiettivo del lavoro di sintesi: minilibreria di CPPs . $R=(\text{CH}_2)_n$; $n=12$ (acido laurilico), $n=14$ (acido miristilico), $n=16$ (acido palmitico), $n=18$ (acido stearico), $n=18:1$ (acido oleico)

5.3 Risultati

5.3.1 Sintesi

Utilizzando come *scaffold* di partenza un residuo di 2,2-bis(amminopropil)glicina¹³, sono stati ottenuti gli intermedi di sintesi **8a**, **5b** e **3c** (fig. 5.4) i quali opportunamente derivatizzati forniranno i vettori **I**, **II** e **III**.

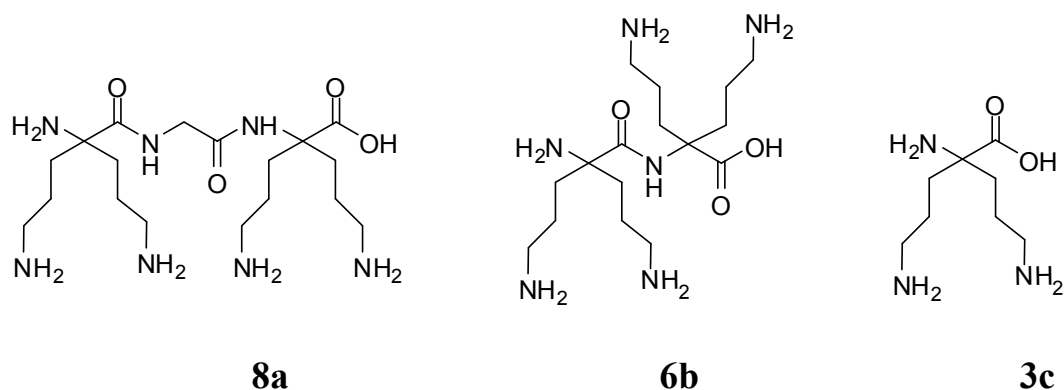
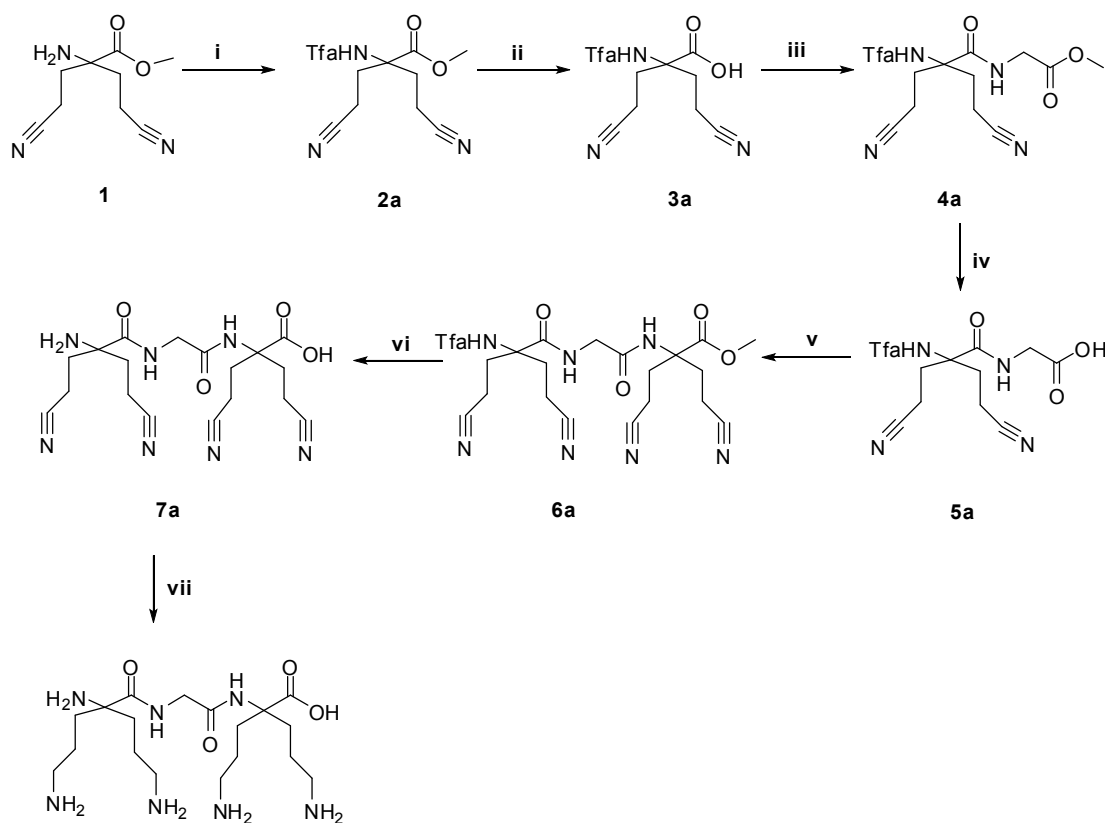


Figura 5.4: Intermedi di sintesi *8a*, *6b* e *3c* precursori rispettivamente dei vettori *I*, *II* e *III*.

L'intermedio **8a** è stato sintetizzato secondo la strategia sintetica riportata nello **schema 5.1**. Per la protezione del gruppo ammino-terminale di tale amminoacido con il gruppo trifluoracetato, sono state esplorate differenti condizioni. La reazione di protezione del residuo di bis-ornitina è stata inizialmente condotta utilizzando anidride trifluoracetica in presenza dell'acido corrispondente¹⁴. Tuttavia in queste condizioni la reazione risulta estremamente lenta e con rese scarse. Il

metodo di trifluoracetilazione proposto da Curphey¹⁵ risulta nel nostro caso altrettanto poco efficiente, conducendo a scarse rese in prodotto desiderato. Tale metodo prevede l'uso di trifluoracetato di etile in presenza di una base terziaria come la TEA. Migliori risultati sono stati invece ottenuti partendo dalla bis-ornitina protetta sul gruppo carbossi terminale con un estere metilico, e utilizzando un forte eccesso di anidride trifluoracetica (5eq).



Schema 5.1: i) $(CF_3CO)_2O$ (5eq), THF; ii) NaH (3eq), THF; iii) $SOCl_2$ (2.2eq), DMF (2.2eq), EtOAc, HCl Gly COOMe (1.5eq), Zn (3eq); iv) LiI (6eq), EtOAc; v) $SOCl_2$ (2.2eq), DMF (2.2eq), EtOAc, 2,2-bis(amminopropil)glicina (1.5eq), Zn (3eq) vi) NaOH (2eq), MeOH/H₂O 9:1 v/v; vii) PtO_2 (0.8eq), MeOH/CHCl₃ 9:1v/v

Dopo 4 ore la reazione è quasi completa e l'eccesso di reattivo può essere facilmente recuperato mediante distillazione, ottenendo il prodotto desiderato **2a**. La successiva reazione di idrolisi selettiva dell'estere metilico è stata condotta utilizzando una soluzione di NaH in THF¹⁶. La base induce la formazione di una forma ciclica (ossazolidone) la quale si apre in seguito al trattamento con una soluzione acquosa acida, conducendo al prodotto di idrolisi **3a** con rese pari al 90%.

La successiva reazione di *coupling* con il residuo di glicina prevede una prima fase di attivazione della funzione carbossilica. Inizialmente come sistema attivante è stata utilizzata una soluzione di HBTU e DIEA in DMF. Tuttavia la forte acidità del protone amminico indotta dall'effetto elettron-attrattore del gruppo Tfa, fa sì che in presenza della base DIEA esso venga facilmente ceduto originando un intermedio ciclico poco reattivo.

Per l'attivazione con cloruro di tionile¹⁷, la miscela di reazione è stata raffreddata in ghiaccio e tenuta sotto agitazione elettromagnetica e flusso di argon per circa 4h. Dopo aver allontanato l'eccesso di cloruro di tionile mediante distillazione, al grezzo di reazione è stata aggiunta l'estere metilico della glicina cloridrata. Per liberare la funzione amminica della glicina dal cloridrato, evitando allo stesso tempo l'aggiunta di basi che, come sopra descritto conducono alla formazione di forma cicliche poco reattive, è stata seguita la procedura descritta da

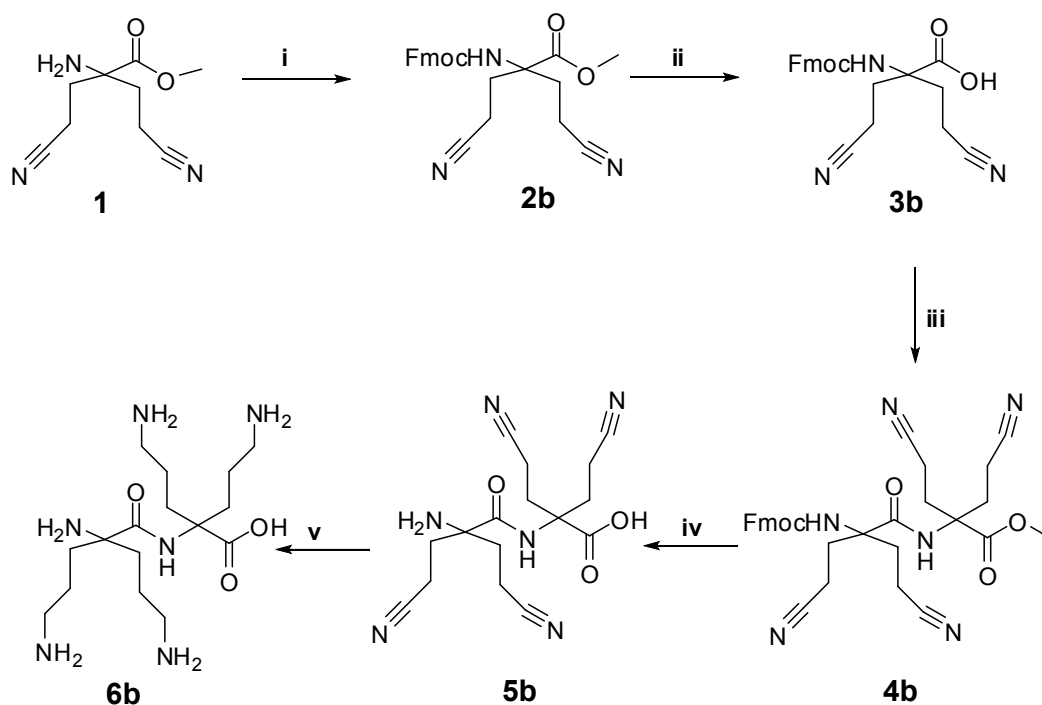
Gopi e Babu¹⁸. Sono stati pertanto aggiunti 2eq di Zinco e la miscela tenuta per circa 45 minuti sotto vigorosa agitazione indotta da un sonicatore. Lo zinco in queste condizioni reagisce con l'acido cloridrico della glicina liberando la funzione amminica e allo stesso tempo neutralizza l'acido liberato in seguito alla reazione di *coupling*. Il prodotto di condensazione **4a** è stato sottoposto a reazione di saponificazione mediante trattamento con ioduro di litio sotto reflusso in acetato di etile anidro¹⁹. Tale reagente è compatibile con molti gruppi protettori della funzione amminica, tra cui il Tfa, e fornisce il corrispondente acido carbossilico libero (**5a**) con rese superiori al 90%.

Le successive reazioni di attivazione e *coupling* con un'altra unità di bis-ornitina per l'ottenimento del derivato **6a** sono state condotte seguendo le stesse metodiche descritte per la sintesi dell'intermedio **4a**. E'importante notare tuttavia che la seconda reazione di *coupling* procede con rese del 45% decisamente più basse rispetto alla prima condensazione.

Mediante trattamento con una soluzione di idrossido di sodio in H₂O/MeOH, entrambi i gruppi protettori Tfa e estere metilico sono stati rimossi, prima della successiva reazione di idrogenazione catalitica per la riduzione dei nitrili in catena laterale. La reazione di idrogenazione catalitica condotta a una pressione di 5PSI utilizzando PtO₂ come catalizzatore si è mostrata tuttavia non quantitativa. Analisi di massa

hanno infatti evidenziato, oltre al principale prodotto di riduzione, anche prodotti ciclici derivanti da reazioni collaterali.

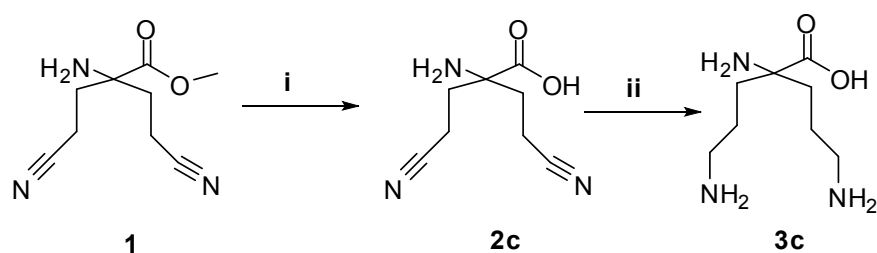
Per la sintesi del derivato **6b**, è stata esplorata una differente via sintetica la quale prevede l'utilizzo del gruppo Fmoc per la protezione del gruppo amminoterminale (**schema 5.2**).



Schema 5.2: i) *Fmoc-Cl* (1eq), *Zn* (2eq), *THF*; ii) *LiI* (6 eq), *EtOAc*; iii) *DAST* (1.1eq), *DCM*, 2,2-bis(amminopropil)glicina (1eq), *Zn* (2eq), *THF*; iv) *LiI* (6eq), *EtOAc*; v) *PtO₂* (0.8eq), *MeOH/CHCl₃* 9:1v/v

Tale gruppo protettore è stato introdotto mediante trattamento con Fmoc-cloroformiato in presenza di zinco. Dopo saponificazione con LiI, la funzione carbossilica è stata attivata mediante trattamento con il reattivo DAST secondo la procedura proposta da Brown e Schafmeister²⁰ per la sintesi di dipeptidi stericamente ingombrati. La reazione di attivazione è stata interrotta dopo un'ora mediante aggiunta di acqua fredda. Successivamente all'amminoacido attivato, è stato aggiunto un'altra unità di bis-ornitina e la reazione tenuta sotto agitazione indotta da sonicatore in presenza di zinco. Il derivato **4b** è stato sottoposto a reazione di idrolisi in presenza di LiI prima della successiva reazione di idrogenazione catalitica.

L'intermedio **3c** necessario per la sintesi della struttura minimalista **III**, è stato molto semplicemente preparato mediante reazione di saponificazione e successiva idrogenazione catalitica (**schema 5.3**)



Schema 5.3: i) NaOH (1eq), MeOH/H₂O 9:1v/v; ii) PtO₂ (0.8eq), MeOH/CHCl₃ 9:1v/v

5.3.2 Spettroscopia CD e UV

I tre *building block* (**8a**, **6b**, **3c**) sintetizzati come *scaffold* di partenza per l'assemblaggio di nuovi CPPs, presentano una notevole analogia strutturale con molecole poliamminiche quali la spermina e la spermidina (**fig. 5.5**). Queste poliammine lineari sono abbondanti nel nucleo cellulare delle cellule viventi dove giocano un ruolo chiave nella stabilizzazione della doppia elica del B-DNA facilitandone l'impacchettamento^{21,22}. Al fine di valutare la capacità di interazione degli intermedi di sintesi poliamminici con un una doppia elica di DNA, è stato scelto un frammento bersaglio dsDNA 15mer (^{5'}TCAGTTAGCTCTGTT^{3'}x^{5'}AACAGAGCTAACTGA^{3'}) e sono stati condotti studi preliminari mediante spettroscopia UV e CD.

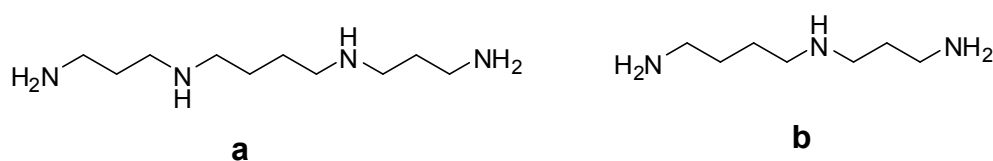


Figura 5.5: strutture della spermina (a) e della spermidina (b)

Gli spettri CD registrati incubando il dsDNA (7μM in tampone fosfato contenente 3mM NaCl) con 5, 10 e 20eq dei ligandi **8a** e **6b** e 10, 20 e 40 eq del ligando **3c**, non mostrano alcuna variazione rispetto allo spettro

di riferimento del DNA da solo (**fig. 5.6**) Ciò indica che non vi è nessuna influenza indotta in queste condizioni dalle poliammine sulla conformazione B del DNA, il cui spettro dicroico è caratterizzato da un massimo positivo a 270-280nm²³.

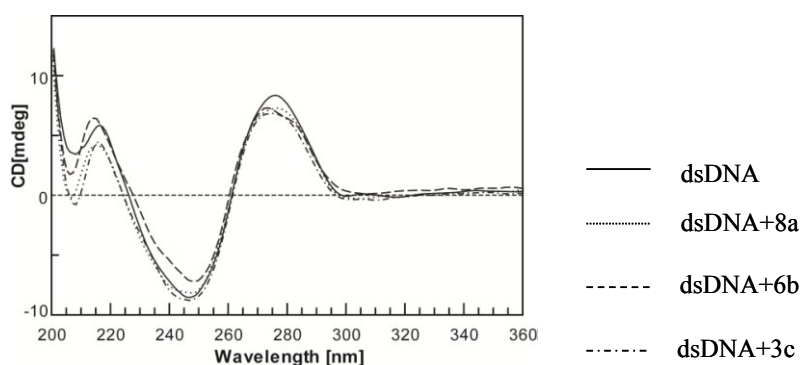


Figura 5.6: spettri CD registrati per il dsDNA di riferimento da solo (7 μ M in tampone fosfato contenente 3mM NaCl, pH 6.5) e dopo incubazione per 24 ore con 20eq di 8a, 6b e 3c.

La stabilità termica della struttura duplex formata dal dsDNA di riferimento in un tampone fosfato contenente 3mM di NaCl, è stata misurata monitorando la banda di assorbimento UV a 260nm con l'incremento della temperatura da 10° ad 80°C. Il valore della temperatura di *melting*, estrapolato dalla curva come derivata prima, corrisponde a 43°C. Incubando il campione per 24ore con 20eq di 8a, 6b e/o 3c, si ottiene un effetto stabilizzante di alcuni gradi centigradi, più pronunciato nel caso del composto 6b (**fig. 5.7**)

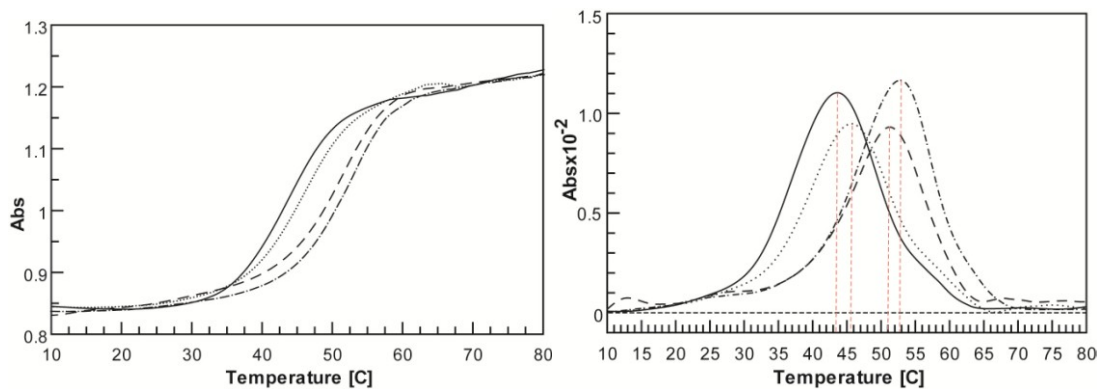


Figura 5.7: profili di fusione ottenuti per il dsDNA ($7\mu\text{M}$ in tampone fosfato contenete 3mM NaCl , $\text{pH } 6.5$, linea continua) e dopo incubazione con 20eq di 8a (linea tratteggiata), 6b (linea tratto-punto) e 3c (linea punteggiata).

Tale effetto stabilizzante risulta essere in ogni caso concentrazione dipendente come evidenziato dall'incubazione di campioni a differente concentrazione di ligando (**fig. 5.8**).

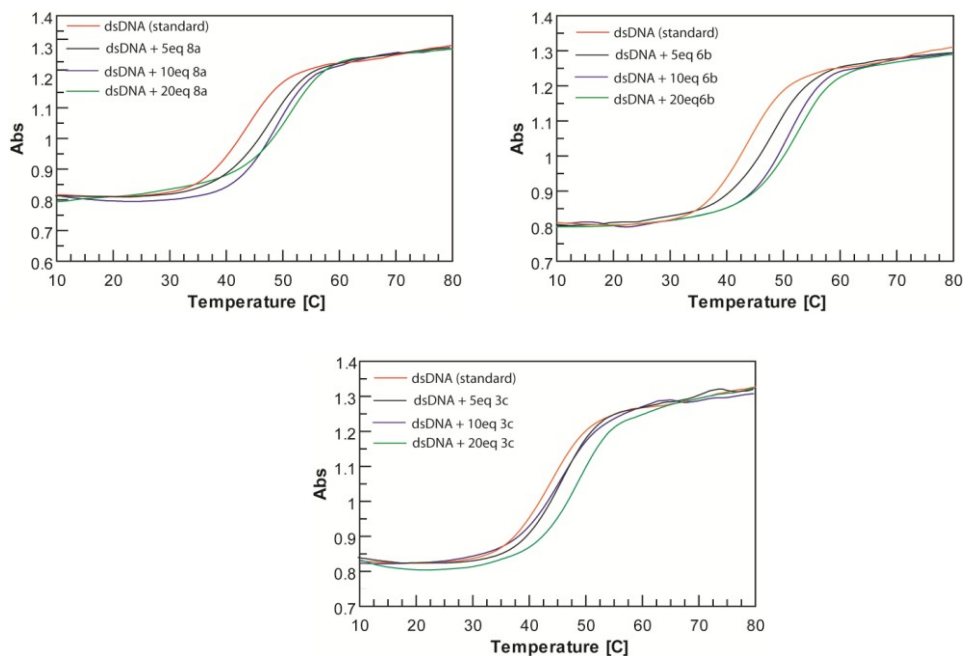


Figura 5.8: profili di fusione ottenuti incubando il dsDNA di riferimento con differenti concentrazione dei ligandi 8a, 6b e 3c.

5.4 Conclusioni

Con l'obiettivo di realizzare una nuova minilibreria di CPPs, durante il periodo trascorso presso i laboratori dell'Università Pierre e Marie Curie (Parigi), è stata realizzata la sintesi di 3 intermedi (**8a**, **6b** e **3c**) utili a tale scopo. Le strategie sintetiche utilizzate si sono mostrate relativamente efficienti, tranne per quanto riguarda l'ultimo *step* di riduzione dei tripli legami in catena laterale. Il grado di purezza non può essere determinato in questo caso mediante HPLC a causa della mancanza di ritenzione delle molecole in colonne RP con diversi sistemi eluenti. Tuttavia le analisi di massa evidenziano in tutti i casi, accanto al prodotto principale, prodotti di ciclizzazione a carico delle catene laterali. Dopo la messa a punto di una metodica di riduzione più efficiente, utilizzando ad esempio un differente catalizzatore quale il Ni Raney, o la messa a punto di un sistema di derivatizzazione (ad esempio proteggendo i gruppi amminici con Boc) per diminuire la polarità del sistema e consentirne la purificazione, gli intermedi saranno utilizzati come punto di partenza per la sintesi di differenti vettori. A tale scopo quindi l'estremità NH₂-terminale sarà agganciata ad acidi grassi di diversa lunghezza con o senza insaturazioni (acido oleico, palmitico, butirrico, miristilico, laurilico, stearico). La porzione COOH terminale servirà invece come punto di aggancio del peptide da internalizzare mediante la creazione di un ponte disolfuro. I vettori che sulla base dei

dati biofisici si mostreranno più efficienti nella traslocazione delle membrane cellulari, saranno utilizzati per studi di veicolazione di oligonucleotidi biologicamente attivi.

Considerata l'analogia strutturale degli intermedi ottenuti con poliammine naturali come la spermina e la sperimidina che sono note per le loro proprietà stabilizzante la doppia elica di DNA, sono stati condotti esperimenti spettroscopici ai fini di verificare una possibile interazione con il DNA. Gli esperimenti di dicroismo circolare hanno evidenziato che anche un forte eccesso di ligandi (20eq) non influenza la conformazione B del DNA utilizzato come bersaglio. Esperimenti di denaturazione termica hanno invece evidenziato, per tutti i ligandi, proprietà stabilizzanti la doppia elica, con un effetto concentrazione dipendente.

I dati preliminari così ottenuti costituiscono il presupposto per uno studio più ampio volto a verificare la capacità di interazione delle molecole sintetizzate con il DNA in altre conformazioni, A-DNA e Z-DNA e con tipi differenti di strutture secondarie come triplex, hairpin e in modo particolare quadruplex.

5.5 Procedure sperimentali

Reagenti e attrezzature

Per le cromatografie su strato sottile sono state utilizzate lastre di silice Merck 60 F₂₅₄ e i prodotti visualizzati mediante una soluzione spray di ninidrina (5g di ninidrina in 500ml di una soluzione BuOH/AcOH 95:5v/v). Per l'analisi di massa degli intermedi di sintesi è stato utilizzato uno spettrometro di massa NERMAG R30-10. Gli spettri NMR sono stati acquisiti utilizzando un apparecchio NMR Brucker ARX 250MHz. Il dsDNA utilizzato per gli studi strutturali è stato acquistato presso la ditta BIOMERS.

Sintesi degli intermedi

2a) 0.020 mol di 1a sono state solubilizzate in THF (14 ml). La soluzione è stata raffreddata in ghiaccio a 0°C e lentamente sono stati aggiunti 5eq di anidride trifluoracetica. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione elettromagnetica per circa 4 ore a temperatura ambiente. A completamento della reazione, l'eccesso di anidride ed il THF sono stati rimossi per distillazione. Il grezzo di reazione è stato ridisciolti in DCM e lavato due volte con una soluzione di acido citrico al 5%. La fase organica è stata successivamente anidrificata su MgSO₄. (Resa 95%); Rf: 0.7 EtOAc / Cicloesano 8:2 v/v

^1H NMR (CDCl_3): $\delta=2.32$ (m, 6H); $\delta=2.84$ (m, 2H); $\delta=3.95$ (s, 3H); $\delta=7.59$ (s, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta=12.55$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CN}$); $\delta=30.21$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$); $\delta=54.76$ ($\underline{\text{C}}$); $\delta=63.49$ ($\text{COO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); $\delta=117$ ($\text{CF}_3\underline{\text{C}}\text{O}$); $\delta=118$ ($\underline{\text{C}}\text{N}$); $\delta=157$ ($\underline{\text{C}}\text{F}_3$); $\delta=171$ ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$). $[\text{M}+\text{Na}^+]=314.07$

3a) Il derivato 2a (0.014mol) è stato solubilizzato in THF (50ml). Lentamente la soluzione è stata aggiunta ad una sospensione di NaH in THF (3eq in 4ml) raffreddata in ghiaccio. La miscela di reazione è stata lasciata a temperatura ambiente, sotto agitazione elettromagnetica e flusso di argon per tutta la notte. 50ml di una soluzione di HCl al 10% sono stati aggiunti per interrompere la reazione. La fase acquosa è stata quindi lavata due volte con DCM. La fase organica è stata quindi anidrificata su MgSO_4 ed il solvente rimosso *in vacuo*. Il prodotto di reazione è stato purificato mediante cromatografia su colonna impaccata con silice flash ed eluita con un gradiente da EtOAc/Cicloesano 1:1 fino al 100% di EtOAc. (Resa: 90%); Rf: 0.3 (DCM/MeOH 8:2)

^1H NMR (CD_3OD): $\delta=2.21$ (m, 2H); $\delta=2.43$ (m, 6H).

4a) 3a (0.0054 mol) è stato disciolto in EtOAc anidro (15ml) e alla soluzione sono stati aggiunti 2,2 eq di DMF anidra per ottenere la completa dissoluzione della miscela. La soluzione è stata quindi raffreddata a -10°C e lentamente è stato aggiunto il cloruro di tionile (2.2eq). La miscela di reazione è stata tenuta a basse temperature (-10°C) in un bagno di ghiaccio e sale per 4ore. L'eccesso di cloruro di tionile è

stato quindi allontanato per distillazione e la miscela ridisciolta in THF. Alla soluzione sono stati aggiunti l'estere metilico della glicina cloridrata (1.5 eq) e lo zinco (3eq). La reazione è stata lasciata sotto agitazione elettromagnetica indotta da sonicatore e flusso di argon per circa 45 minuti. La miscela di reazione è stata quindi filtrata per rimuovere lo Zn e lo ZnCl₂, il THF è stato rimosso *in vacuo* e il grezzo di reazione purificato mediante cromatografia su colonna impaccata con silice flash ed eluita con EtOAc/Cicloesano 1:1 v/v. (Resa: 88%); Rf: 0.7 EtOAc / Cyclo 8:2 v/v.

¹H NMR (CDCl₃): δ=2.32 (m, 6H); δ= 2.90 (m, 2H); δ=3.78 (s, 3H); δ=4.07 (d, 2H); δ=7.30 (t, NH), δ=8.02 (s, NH). [M+Na⁺]= 371.09.

5a) Il dipeptide 4a (0.0034 mol) è stato solubilizzato in EtOAc (50ml) e alla soluzione sono stati aggiunti 6eq di LiI. La miscela di reazione è stata lasciata a refluxo per circa 20 ore fino a completa idrolisi del substrato di partenza. Il prodotto desiderato è stato quindi recuperato mediante lavaggio prima con una soluzione acquosa al 10% di HCl, poi con una soluzione al 5% di Na₂S₂O₃. La fase organica è stata anidrificata su MgSO₄ e il solvente rimosso *in vacuo*. (Resa: 97%); Rf: 0.2 (DCM/MeOH 8:2 v/v).

¹H NMR (CD₃OD): δ=2.22 (m, 2H); δ= 2.44 (m, 4H); δ=2.68 (m, 2H); δ=3.95 (d, 2H).[M+Na⁺]= 357.07.

6a) 5a (0.0027 mol) è stato disciolto in EtOAc anidro (7ml) e alla soluzione sono stati aggiunti 2,2 eq di DMF anidra per ottenere la completa dissoluzione della miscela. La soluzione è stata quindi raffreddata a -10°C e lentamente è stato aggiunto il cloruro di tionile (2.2eq). la miscela di reazione è stata tenuta a basse temperature (-10°C) in un bagno di ghiaccio e sale per 4ore. L'eccesso di cloruro di tionile è stato quindi allontanato per distillazione e la miscela ridisciolta in THF. Alla soluzione sono stati aggiunti il derivato **1a** (1.5 eq) e lo zinco (3eq). La reazione è stata lasciata sotto agitazione elettromagnetica indotta un sonicatore e flusso di argon per circa 45 minuti. La miscela di reazione è stata quindi filtrata per rimuovere lo Zn e lo ZnCl₂, il THF è stato rimosso *in vacuo* e il grezzo di reazione purificato mediante cromatografia su colonna impaccata con silice flash ed eluita con un gradiente di EtOAc/Cicloesano dall'1:1 v/v a 8:2v/v. (Resa: 45%); Rf: 0.6 EtOAc 100%.

¹H NMR (CDCl₃): δ=2.32 (m, 12H); δ= 2.90 (m, 4H); δ=3.90 (s, 3H); δ=4.10 (d, 2H); δ=7.05 (s, NH); δ=7.45 (t, NH); δ=8.07 (s, NH).
[M+Na⁺]= 534.17.

7a) 0.25 mmol di 6a sono state disciolte in una soluzione MeOH/H₂O 1:1v/v contenente 2 eq di NaOH. La miscela di reazione è stata lasciata a temperatura ambiente sotto agitazione elettromagnetica fino a completa scomparsa del materiale di partenza (circa 2 ore). La miscela di reazione

è stata quindi neutralizzata per aggiunta di una soluzione 0.1N di HCl. Il MeOH è stato allontanato *in vacuo* e il prodotto anidrificato mediante processo di liofilizzazione. (Resa : 100%) ; Rf: 0.2 (BAW).

8a) 7a (0.20mmol) è stato sospeso in 10ml di una soluzione MeOH/CHCl₃ 9:1 v/v e sono stati aggiunti 0.8 eq di PtO₂. La miscela di reazione è stata tenuta sotto agitazione vigorosa e pressione di 5PSI. Dopo circa 12 ore la miscela è stata filtrata su celite per allontanare il catalizzatore e lavata più volte con MeOH. Il solvente è stato allontanato *in vacuo* ottenendo il prodotto sottoforma di un solido bianco.

[M+H]: 418,31; [M+Na]: 440, 23.

2b) Il composto di partenza 1 (1mmol) è stato solubilizzato in THF (5ml) e lentamente sono stati aggiunti il reattivo Fmoc-cloroformiato (1eq) e lo zinco (2eq). La reazione è stata lasciata sotto agitazione elettromagnetica per circa 3 ore; dopodiché lo zinco è stato rimosso per filtrazione e il solvente allontanato *in vacuo*. La miscela è stata quindi risospesa in DCM e lavata due volte con una soluzione di acido citrico al 5%. La fase organica è stata quindi anidrificata su MgSO₄. (Resa: 90%); Rf: 0.8 (EtOAc / Cyclo 8:2 v/v).

¹H NMR (CDCl₃): δ=2.30 (m, 6H); δ=2.80 (m, 2H); δ=3.70 (s, 3H); δ=4.17 (t, 1H); δ=4.60 (d, 2H); δ=7.30 (dd, 4H); δ=7.55 (d, 2H); δ=7.84 (d, 2H).

3b) il composto 2b (1mmol) è stato solubilizzato in EtOAc (10ml) e sono stati aggiunti 6eq di LiI. La reazione è stata lasciata a refluxo sotto flusso di argon per circa 4h. Il prodotto di idrolisi è stato quindi recuperato mediante lavaggio prima con una soluzione acquosa di HCl al 10% e poi con una soluzione di Na₂S₂O₃ al 5%. La fase organica è stata anidrificata su MgSO₄ e il solvente rimosso *in vacuo*. (Resa : 97%); Rf: 0.3 DCM/MeOH 8:2 v/v.

¹H NMR (CD₃OD): δ=2.20 (m, 6H); δ=2.40 (m, 2H); δ=4.13 (t, 1H); δ=4.42 (d, 2H); δ=7.30 (dd, 4H); δ=7.55 (d, 2H); δ=7.84 (d, 2H).

4b) 0.8mmol di 3b sono state solubilizzate in DCM anidro. Sono state poi aggiunte alcune gocce (circa 100 µl) di DMF anidro per ottenere la completa dissoluzione del substrato e il reattivo DAST (1.1 eq). La reazione è stata condotta in un tubo di polipropilene sotto flusso di argon. Dopo circa 1 ora, la miscela è stata lavata con H₂O fredda, la fase organica anidrificata su MgSO₄ e il solvente allontanato *in vacuo*.

L'amminoacido attivato è stato quindi ridisciolti in THF anidro e alla soluzione sono stati aggiunti lo zinco (2eq) e la bis-ornitina 1(1eq). La miscela di reazione è stata lasciata sotto vigorosa agitazione al sonicatore per circa 20 minuti e poi per 2ore a 50°C sotto flusso di argon e agitazione elettromagnetica. Lo zinco è stato rimosso mediante filtrazione e il THF rimosso in vacuo. Il grezzo di reazione è stato quindi ridisciolti in DCM e lavato due volte con una soluzione di acido citrico

al 5%, due volte con una soluzione di NaHCO₃ al 5% e infine due volte con H₂O. La fase organica è stata anidrificata su MgSO₄ ed il prodotto è stato purificato mediante cromatografia su colonna impaccata con gel di silice ed eluita con un gradiente Cicloesano/EtOAc (da 7:3v/v al 2:8v/v). (Resa: 34%); Rf: 0.8 (EtOAc/Cyclohexane 8:2 v/v).

¹H NMR (CDCl₃): δ=2.30 (m, 6H); δ=2.80 (m, 2H); δ=3.76 (s, 3H); δ=3.98 (d, 2H); δ=4.20 (t, 1H); δ=4.59 (d, 2H); δ=7.34 (dd, 4H); δ=7.55 (d, 2H); δ=7.76 (d, 2H).

5b) Il derivato 4b (0.22mmol) è stato disciolto in 3ml di EtOAc. Sono stati aggiunti alla soluzione 6eq di LiI e la reazione lasciata a refluxo per 24h. la fase organica è stata quindi lavata due volte con una soluzione di HCl. La fase acquosa è stata quindi recuperata e seccata come miscela azeotropica con aggiunta di toluene.

6b) 5b (0.15mmol) è stato sospeso in 8ml di una soluzione MeOH/CHCl₃ 9:1 v/v e sono stati aggiunti 0.8 eq di PtO₂. La miscela di reazione è stata tenuta sotto agitazione vigorosa e pressione di 5PSI. Dopo circa 12 ore la miscela è stata filtrata su celite per allontanare il catalizzatore e lavata più volte con MeOH. Il solvente è stato allontanato *in vacuo* ottenendo il prodotto sottoforma di un solido bianco.

[M+H]: 361,28; [M+Na]: 383, 23

2c) 0.004mol di 1 sono state sciolte in una miscela 9:1 MeOH:H₂O contenente 1eq di NaOH. La reazione è stata lasciata a temperatura

ambiente sotto agitazione elettromagnetica. Dopo circa 1ora, a completa scomparsa del substrato di partenza la soluzione è stata neutralizzata per aggiunta di acido HCl dil. Il MeOH è stato rimosso *in vacuo*. (Resa: 99%)

3c) 2c (0.003mol) è stato sospeso in 8ml di una soluzione MeOH/CHCl₃ 9:1 v/v e sono stati aggiunti 0.8 eq di PtO₂. La miscela di reazione è stata tenuta sotto agitazione vigorosa e pressione di 5PSI. Dopo circa 12 ore la miscela è stata filtrata su celite per allontanare il catalizzatore e lavata più volte con MeOH. Il solvente è stato allontanato *in vacuo* ottenendo il prodotto sottoforma di un solido bianco.

[M+H]: 190,15.

Spettroscopia CD

I campioni di dsDNA sono stati preparati ad una concentrazione finale di 7μM in un tampone fosfato (10mM NaH₂PO₄, 3mM NaCl, pH 6.5) e sottoposti a procedura di *annealing* mediante riscaldamento a 90°C per 10min e lento ritorno alla temperatura ambiente. Dopo l'aggiunta del ligando i campioni sono stati conservati a 4°C per 24 ore prima dell'acquisizione degli spettri

Spettroscopia UV

I campioni sono stati preparati seguendo le stesse modalità sopra descritte. Gli esperimenti di denaturazione termica sono stati effettuati usando uno spettrofotometro JASCO 530 equipaggiato con un sistema di

controllo della temperatura ETC-505T monitorando la banda di assorbimento UV a 260nm con l'incremento della temperatura. (velocità di scansione: 0.5°C/min).

Riferimenti bibliografici

- ¹ Juliano, R.L.; Alahar, S.; Yoo, H.; Kole, R.; Cho, M. *Pharm. Res.*, **1999**, 16, 494-502
- ² Gerwartz, A.M.; Sokol, D.L.; Ratajczak, M.Z., *Blood*, **1998**, 92, 712-736
- ³ Foerg, C.; Merkle, H. *Journal of Pharmaceutical Science*, **2008**, 97, 144-162
- ⁴ Schawarze, S.R.; Ho, A.; Vocero-Akboni, A.; Dowdy, S.F. *Science*, **1999**, 285, 1569-1572
- ⁵ Derossi, D.; Calvet, S.; Trembleau, A.; Brunissen, A.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 18188-18193
- ⁶ Derossi, D.; Joliot, A.H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 10444-10450
- ⁷ Herce, H.D., Garcia, A.E. *J. Biol. Phys.*, **2007**, 33, 345-356
- ⁸ Richard, J.P.; Melikov, K.; Vives, E.; Ramos, C., Verbeure, B.; Gait, M.J., Chernomordik, L.V.; Lebleu, B. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 585-590
- ⁹ Alves, I.D.; Goasdoue, N., Correia, I.; Aubry, S.; Galant, C.; Sagan, S.; Lavielle, S.; Chassaing, G. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2008**, 1780, 948-959

- ¹⁰ Delaroche, D.; Aussedat, B.; Aubry, S.; Chassaing, G.; Burlina, F.; Clodic, G.; Bolbach, G.; Lavielle, S.; Sagan, S. *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 1932-1938
- ¹¹ Dupont, E.; Sagan, S.; Joliot, A.; Lavielle, S.; Chassaing, G.; Burlina, F. *Chem. Commun.*, **2008**, 1398-1400
- ¹² Burlina, F.; Sagan, S.; Bolbach, G.; Chassaing, G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 4244-4247
- ¹³ Aussedat, B.; Chassaing, G.; Lavielle, S.; Burlina, F. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 3723-3726
- ¹⁴ Gordon-Wylie, S.W.; Teplin, E.; Morris, J.C.; Trombley, M.I.; McCarthy, S.M.; Cleaver, W.M.; Clark, G.R. *Crystal Growth & Design*, **2004**, *4*, 789-797
- ¹⁵ Curphey, T. *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 2805-2805
- ¹⁶ Boger, D.L.; Yohannes, D. *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 2498-2502
- ⁷ Cherevin, M.S.; Gulevich, T.G.; Popova, L.A.; Zubreichuk, Z.P.; Knizhnikov, V.A. *Russian Journal of Organic Chemistry*, **2007**, *43*, 1427-1431
- ¹⁸ Gopi, H.N., Babu, V.V.S. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 9769-9772
- ¹⁹ Mayato, C., Dorta, R.L.; Vazques, J.T. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 1396-1398
- ²⁰ Brown, Z.Z., Schafmeister, C.E. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 14382-14383

²¹ Deng, H.; Bloomfield, V.A.; Benevides, J.M.; Thomas, G. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 3379-3385

²² Rubin, R.L.; *J. Bacterial*, **1977**, 129, 916-925

²³ Kypr, J.; Kejnovska, I.; Renciuik, D.; Vorlickova, M. *Nucleic Acids Res.*, **2009**, 37, 1713-1725

Abbreviazioni

ACN	Acetonitrile
AcOH	Acido acetico
DAST	Dietilamminosolfotetrafluoride
DCE	Dicloroetano
DCM	Diclorometano
DIPEA	Diisopropiletilammina
DMAP	4-N,N'-dimetilamminopiridina
DMF	N,N'-dimetilformammide
DNA	Acido deossiribonucleico
EtOAc	Acetato di etile
EtOH	Etanolo
Fmoc	9-fluorenilmetossicarbonile
G	Guanina
HMDS	Esametildisilazano
HOBT	Idrossibenzotriazolo
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight
MeOH	Metanolo
ON	Oligonucleotide
PPTS	Piridinio <i>p</i> -toluen solfonato
TEA	Trietilammina
Tfa	Trifluoracetammide
THF	Tetraidrofurano
TMSOTf	Trimetilsililtrifluorometansolfonato

Procedure generali

Reagenti e attrezzature

I prodotti chimici ed i solventi anidri sono stati acquistati presso la ditta Fluka-Sigma-Aldrich. Per le cromatografie su strato sottile sono state utilizzate lastre di silice Merck 60 F₂₅₄ e i prodotti visualizzati mediante lampada UV o utilizzando una soluzione spray di KMNO₄. Per le cromatografie su gel di silice è stata utilizzata silice gel 60 (0.063-0.200mm) acquistata presso la ditta Merck. Per l'analisi di massa degli intermedi di sintesi è stato utilizzato uno spettrometro di massa API 2000 (Analist NT Applied Biosystem ESI-MS) salvo nei casi dove diversamente indicato. I reattivi, le resine ed i fosforammiditi per la sintesi degli oligomeri sono stati acquistati presso la ditta Glenn Research. La sintesi in fase solida degli ONs è stata condotta utilizzando un sintetizzatore automatico PerSeptive Biosystem Expedite. Le purificazioni HPLC degli oligonucleotidi sono state condotte utilizzando un apparecchio Thermo Finningan Spectra SYSTEM P4000 e colonne Nucleogen SAXel. Gli ONs sono stati desalificati mediante cromatografia ad esclusione molecolare condotta su BIORAD BioLogic LP System. Per la spettrometria di massa degli oligomeri è stato utilizzato un apparecchio Brucker Autoflex 1 MALDI-TOF usando una micela di acido picolinico e acido 3-idrossi picolinico come matrice.

Prima dell'acquisizione di spettri UV e CD i campioni degli ON sono stati sottoposti a procedura di annealing mediante riscaldamento a 90°C per 10 min e lento ritorno alla temperatura ambiente. Gli esperimenti UV sono stati condotti utilizzando uno spettrofotometro JASCO 530 equipaggiato con un sistema di controllo della temperatura ETC-505T. Per gli esperimenti dicroici è stato utilizzato uno spettropolarimetro JASCO 715 equipaggiato con un sistema di controllo della temperatura PTC-348

Gli spettri ^1H NMR dei prodotti di sintesi sono stati acquisiti, salvo dove diversamente indicato, con uno spettrometro VARIAN 400MHz. Gli spettri NMR mono e bidimensionali degli oligonucleotidi sono stati acquisiti con spettrometri VARIAN Unity INOVA 500 e 700MHz e processati con un software Varian VNMR. Gli spettri bidimensionali sono stati acquisiti con un tempo di riciclo di 1.0 s a temperature comprese tra 2 e 50°C. Per la soppressione del segnale dell'acqua è stata utilizzata una sequenza di impulsi DPFGE.