



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MOLECOLARI
INDIRIZZO: SCIENZE CHIMICHE
CICLO XX**

**SINTESI SU FASE SOLIDA, VALUTAZIONE CATALITICA
E DI RICONOSCIMENTO MOLECOLARE
DI SISTEMI TRIPODALI**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Supervisore: Ch.mo Prof. Paolo M. Scrimin

Dottorando: Cristian Guarise

31 Gennaio 2008

A Sara e alla mia famiglia

INDICE

CAPITOLO 1. *Introduzione generale: I sistemi tripodali*

1.0 Introduzione generale	2
1.1 Applicazioni delle strutture molecolari tripodali nello sviluppo di recettori e sensori	3
1.2 Applicazioni delle strutture molecolari tripodali nella chimica biomimetica	9
1.3 Applicazioni delle strutture molecolari tripodali nella catalisi	16
1.4 Applicazioni delle strutture molecolari tripodali nelle nanotecnologie	20
1.5 Strategie sintetiche	24
1.5.1 Sintesi di strutture tripodali in soluzione	24
1.5.2 Sintesi di strutture tripodali su fase solida	28
1.6 Scopo della tesi	33
Bibliografia	34

CAPITOLO 2. *Sintesi di strutture tripodali su fase solida*

Risultati e discussione

2.0 Funzionalizzazione di scaffold tripodali in fase solida	38
2.1 Miglioramento della procedura sintetica	41
2.1.1 Sintesi di scaffold molecolari eterofunzionalizzati	42
2.1.2 La posizione del residuo Asp	44
2.1.3 Ottimizzazione della resa	46
2.2 Conclusioni	49

Parte sperimentale

2.3 Materiali e strumentazione	50
2.4 Procedure sintetiche generali	50
2.5 Sintesi e Caratterizzazione	52

Bibliografia	58
---------------------	----

CAPITOLO 3. *Valutazione catalitica di sistemi tripodali*

3.0 Studio di molecole tripodali con attività catalitica	60
---	----

Introduzione

3.1 Meccanismo enzimatico delle proteasi (ed esterasi) seriniche	60
3.2 Studio di strutture multivalenti come modelli artificiali delle esterasi seriniche	61

Risultati e discussione

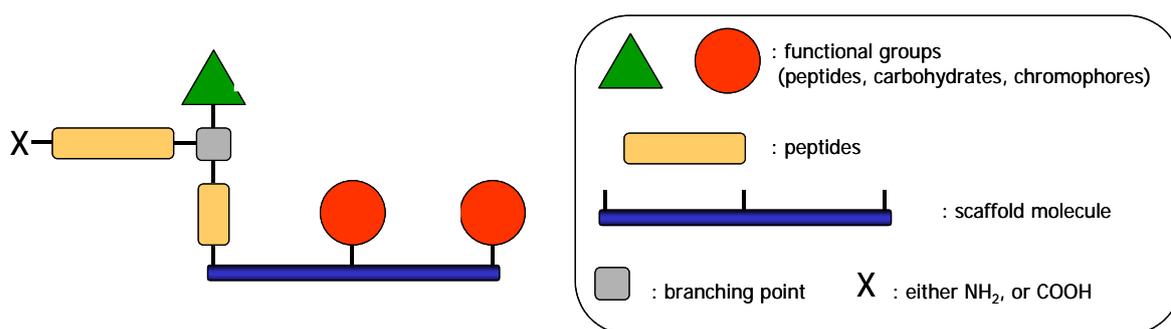
3.3 Molecole multivalenti dotate di simmetria C_3 come modelli artificiali di esterasi seriniche.	65
---	----

3.3.1 Sintesi di modelli artificiali di esterasi seriniche	66
3.3.2 Studio dei modelli artificiali di esterasi seriniche mediante reazioni di idrolisi di esteri attivati.	70
3.3.3 Sviluppo dei catalizzatori esterasi mimetici	75
3.3.3.1 Utilizzo di un calix[4]arene come scaffold multivalente	76
3.3.3.2 Capsule ed emi-capsule peptidiche	78
3.4 Studio di un sistema tripodale nella reazione di condensazione aldolica stereospecifica	80
Introduzione	
3.4.1 Studio di modelli artificiali di Aldolasi	80
Risultati e discussione	
3.4.2 Sintesi di un sistema tripodale come modello artificiale di Aldolasi	84
3.5 Conclusioni	86
Parte sperimentale	
3.6 Caratterizzazione	87
3.7 Cinetiche	90
Bibliografia	92
CAPITOLO 4. Studio di un sistema tripodale nel campo del riconoscimento molecolare	
4.0 Sintesi e studio di un inibitore multivalente progettato per bloccare la fusione del virus dell'HIV-1 con i linfociti	94
Introduzione	
4.1 Meccanismo di fusione del virus dell'HIV con la cellula target	94
Risultati e discussione	
4.2 Progettazione di un piccolo inibitore multivalente in grado di bloccare la fusione dell'HIV-1	96
4.3 Sintesi del peptide mimetico della sequenza N-HR della glicoproteina gp41	100
4.4 Analisi al dicroismo circolare del peptide [1]	105
4.5 Attacco del peptide mimetico della sequenza N-HR della gp41 [1] allo scaffold su fase solida	106
Sviluppi futuri	
4.6 Sintesi dei peptidi da utilizzare per gli studi di attività	108
Parte sperimentale	
4.7 Materiali e strumentazione	109
4.8 Procedura sintetica generale per la sintesi del peptide [3] e [3P]	110
4.9 Caratterizzazione	110
Bibliografia	112

ABSTRACT

Solid phase synthesis of tripodal systems and study of their catalytic and molecular recognitions properties

Tripodal molecular structures are increasingly applied in the fields of catalysis, recognition, sensing, and biomimetics. The problem is that the combinatorial approach, that gives access to large amounts of heterofunctionalized receptors, uses orthogonally protected scaffolds and requires a very laborious synthesis. In this research project, a versatile synthetic approach for the functionalization of tripodal scaffold molecules on solid support, was developed. The generality of this approach was illustrated by the functionalization of three structurally diverse **A₃**-type scaffold molecules containing multiple amino-groups (**1a**, 1,3,5-tris(aminoethyl)-2,4,6-triethylbenzene; **1b**, tris(2-aminoethyl)amine; **1c**, triazacyclononane) with a variety of different functional groups. Advantages of this approach are its simplicity and the freedom to functionalise any desirable scaffold molecule, without the use of protecting groups or special functionalisation patterns (for instance **AB₃**). Intrinsic problems related to the attachment of tripodal scaffolds to a resin (for example mono- *versus* polyadducts and intramolecular cyclizations) were studied and solutions were provided. Importantly, protecting groups on the scaffold molecule were never used, which significantly facilitates scaffold variation, for instance for combinatorial studies.

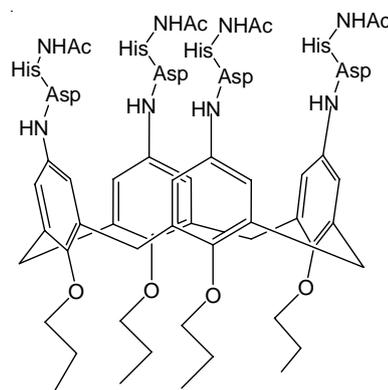


Schematic representation of the versatility of the synthetic procedure

The synthetic approach was used in order to obtain multivalent C₃-symmetrical molecules as artificial models of enzymes catalytic site. The general goal was to understand whether the scaffold structure influenced the cooperativity between the functional groups.

First, we have synthesized an artificial model of a serine protease (or esterase), by connecting to scaffold **1a** different combinations of peptides, based on the amino acids of the active site of the proteolytic enzyme: Asp, His and Ser. Studies of these compounds in the hydrolysis of activated esters revealed catalytic activity for the scaffold **1a** functionalized with the active sequence –CO-Asp-His-H.

Subsequently, we have functionalized a Calix[4]arene scaffold with the same active sequence for which a significant 86-fold rate enhancement compared to that of the uncatalyzed background reaction has been observed. This study showed cooperativity between the functional groups only in the hydrolysis reactions performed with excess of catalyst, likely because the catalyst does not provide a well defined

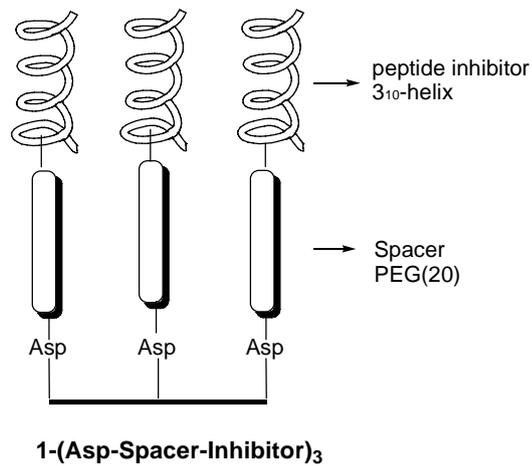


active site. Second, a tripodal scaffold functionalized with the –CO-Asp-Pro-Pro-H sequence, active in aldol asymmetric condensations, has been studied. Catalytic studies, performed with excess of catalyst, show that also for this catalyst the presence of the scaffold does not result in an increase in the enantioselectivity with respect to the monomeric unit. In these tripodal catalysts show a prevailing divergent structure that does not allow high cooperativity between the functional groups. Consequently we shifted our attention to tripodals structures for application in the field of molecular (bio)recognition.

For this purpose, we have chosen to study multivalent HIV-1 fusion inhibitors based on small 3_{10} -helical foldamers.

HIV-1 entry into target cells is a multistep process involving a series of proteins and cofactors. Glycoproteins gp41, decorating in the surface of HIV-1 play key roles in this process. The ectodomain (extraviral) of gp41 consists of three important regions: an N-terminal fusion sequence that inserts into the target cell membrane, and two helical regions containing two hydrophobic heptad repeat units (denoted as the N- and C-helical regions, respectively). The N-HR regions of three gp41 molecules form a trimeric α -helical coiled-coil. Upon dissociation of gp120 from the complex, a six-helix bundle forms, in which the C-helical regions wrap around the inner coil in an antiparallel fashion. We have studied a series of strategies for the synthesis of small peptide inhibitors, based on small 3_{10} -helical foldamers. These molecules have been designed for the inhibition of HIV-1 replication by binding to the inner trimeric coiled coil, thus preventing the formation of the six-helix bundle,

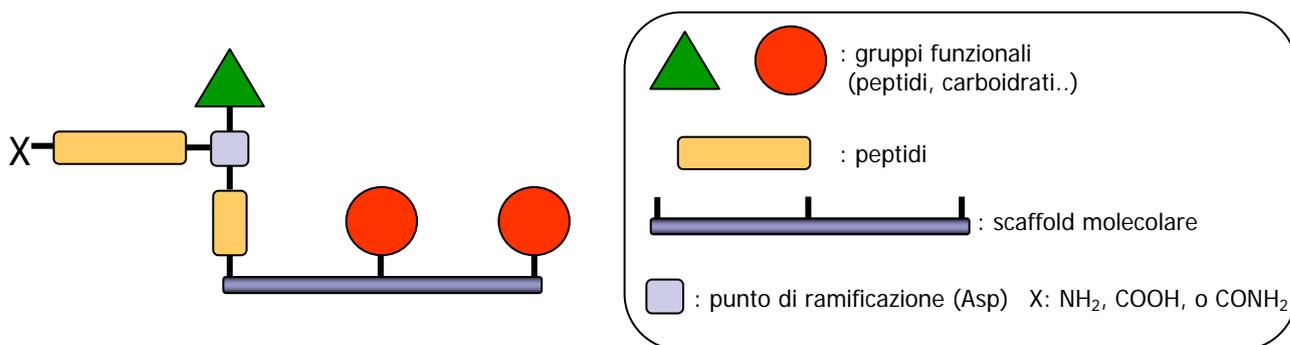
which is essential for the complete fusion of the virus to target cell membranes. The 3_{10} -helix conformation is induced with the introduction of 5 Aib-residues in the peptide inhibitor sequence. In that way the amino acids Trp, Trp, and Ile (the WWI epitope) of the peptide are placed in the same positions of the N-HR helix regions of gp41 molecules. Currently we are studying a synthetic strategy in order to covalently link this foldamer to a tripodal scaffold (with oligoPEG spacers).



RIASSUNTO

Sintesi su fase solida, valutazione catalitica e di riconoscimento molecolare di sistemi tripodali

Lo studio di molecole eterofunzionalizzate è al centro di un notevole interesse sia chimico che farmaceutico. Questo tipo di architetture molecolari ha un notevole potenziale applicativo anche nel campo della catalisi e del riconoscimento biomolecolare. In questo progetto di ricerca è stata messa a punto una innovativa procedura sintetica per la sintesi di scaffold multivalenti funzionalizzati in modo simmetrico su fase solida. Il protocollo sintetico consente di avere una completa flessibilità nella modificazione della piattaforma come pure dei gruppi funzionali senza la necessità di ricorrere a gruppi protettori. Per illustrare la versatilità di questo approccio, sono stati funzionalizzati tre scaffold molecolari (1,3,5-tris(amminometil)-2,4,6-trietilbenzene, tris(2-amminoetil)-ammina, e triazociclonano) con diversi gruppi funzionali, con elevata resa e grado di purezza. Nel procedere del lavoro la procedura è stata sviluppata aumentandone la versatilità al fine di migliorare la resa ed il grado di purezza e permettere la sintesi di strutture eterofunzionalizzate oltre che la sintesi di molecole con una conformazione particolarmente rigida (capsule peptidiche).

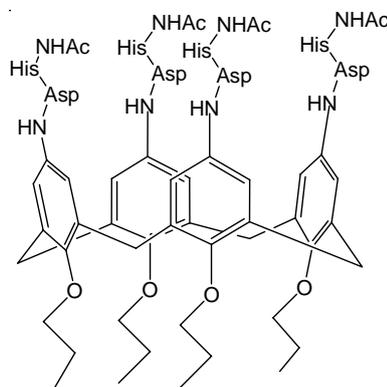


Rappresentazione schematica della struttura generale accessibile con la procedura sintetica descritta.

La procedura sintetica descritta è stata applicata alla sintesi di strutture tripodali dotate di simmetria C₃, allo scopo di studiare se fosse possibile funzionalizzare uno scaffold con diversi gruppi funzionali, con orientazione convergente, in modo da realizzare una cavità mimetica del sito catalitico presente in alcuni enzimi.

Nella prima parte sono stati descritti una serie di piccoli catalizzatori tripodali come modelli artificiali delle esterasi seriniche, costituiti da uno scaffold (1,3,5-tris(amminometil)-2,4,6-trietilbenzene) funzionalizzato con diverse combinazioni

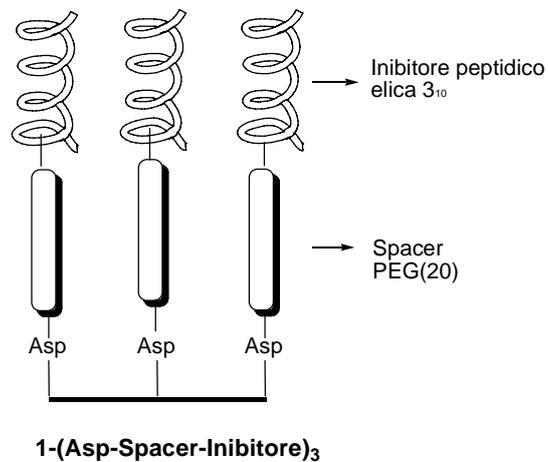
degli amminoacidi della triade catalitica Asp, His, Ser. Lo studio ha accertato un'attività catalitica nell'idrolisi di esteri da parte dello scaffold funzionalizzato con la sequenza -CO-Asp-His-H. Nella parte successiva è stato funzionalizzato un calix[4]arene con la stessa sequenza verificando una accelerazione di circa 86 volte superiore rispetto al bianco. L'analisi dei risultati sperimentali, mette in evidenza come l'effetto cooperativo tra i gruppi funzionali di questi semplici sistemi tripodali, si verifichi solo in presenza di un eccesso di catalizzatore. Questo fenomeno è dovuto al fatto che questi catalizzatori non presentano un sito di riconoscimento definito e l'interazione con il substrato è basata solo su interazioni idrofobiche aspecifiche.



Nella seconda parte è stato invece studiato uno scaffold tripodale funzionalizzato con una sequenza, riportata in letteratura, attiva nella reazione di condensazione aldolica stereospecifica. Anche da questa indagine preliminare si nota che nelle reazioni studiate, in eccesso di substrato (rispetto al catalizzatore), lo scaffold non sopprime l'attività dei gruppi funzionali legati, ma non induce un apprezzabile variazione dell'effetto catalitico, per quanto riguarda l'induzione asimmetrica rispetto all'unità monomerica.

Essenzialmente dagli studi effettuati è emerso che questi sistemi tripodali presentano una struttura prevalentemente divergente con un numero elevato di gradi di libertà rotazionale. Ciò limita l'attività cooperativa che si può esplicare tra i gruppi funzionali. Tuttavia una più precisa progettazione dei siti di riconoscimento presenti potrebbe permettere di utilizzare queste strutture nel campo del riconoscimento molecolare, dove la divaricazione dei gruppi funzionali potrebbe costituire un vantaggio. Per questo motivo sono state utilizzate le conoscenze sintetiche acquisite per la sintesi e lo studio di un inibitore multivalente progettato per bloccare la fusione del virus dell'HIV-1 con le cellule target. L'inibitore è stato progettato per complessarsi stabilmente alla tripla elica N-terminale della glicoproteina gp41 presente sulla membrana del virus dell'HIV-1. Il primo scopo di questo progetto era la sintesi di un piccolo peptide (10 residui) con una struttura ad elica 3_{10} che presentasse l'epitopo WWI con la conformazione corretta, in modo da legare fortemente la regione C-HR della gp41, impedendo la formazione del complesso di fusione attivo a 6 eliche, responsabile della fusione dell'HIV-1 nella membrana cellulare target. La struttura ad elica 3_{10} del peptide viene ottenuta

introducendo nella sequenza degli amminoacidi tetrasostituiti (Aib) In secondo luogo questo target trimerico ad α -elica (C-HR) è interessante anche dal punto di vista della multivalenza, infatti sono presenti 3 siti uguali di legame per l'epitopo WWI. L'idea era di funzionalizzare uno scaffold con tre piccoli peptidi mimetici della regione N-HR per verificare se forma possibile ottenere un significativo guadagno nell'affinità del binding utilizzando copie multiple del peptide inibitore connesso ad uno scaffold. Sono state confrontate diverse strategie per la sintesi del peptide, mentre è in fase di sviluppo la sintesi dell'inibitore multivalente e lo studio dell'attività del peptide sintetizzato.



CAPITOLO 1

Introduzione generale:

I sistemi tripodali

1.0 Introduzione generale

Si definiscono strutture tripodali molecole di medie dimensioni con tre bracci legati ad una piattaforma molecolare (scaffold) e caratterizzati da una grande varietà chimica di gruppi funzionali (acido/ base, siti per legare metalli, donatori/ accettori di legami a H, ecc.). Lo studio di queste strutture è al centro di un notevole interesse sia chimico che farmaceutico in quanto esse hanno un notevole potenziale per applicazioni nel campo della catalisi,¹ del riconoscimento (bio)molecolare,² in quello dei sensori³ e della biomimetica⁴ (Figura 1).

L'orientazione dei gruppi funzionali verso una cavità centrale può permettere la formazione di una struttura simile al sito attivo degli enzimi consentendo di sfruttare interazioni cooperative. Al contrario, un'orientazione divergente dei gruppi esposti permette il riconoscimento di grandi superfici proteiche (es. recettori).

In questa introduzione vengono riportati diversi esempi presenti nella letteratura recente dove queste strutture tripodali trovano applicazioni nello sviluppo di recettori e sensori molecolari, nel campo della biomimetica, della catalisi e delle nanotecnologie.

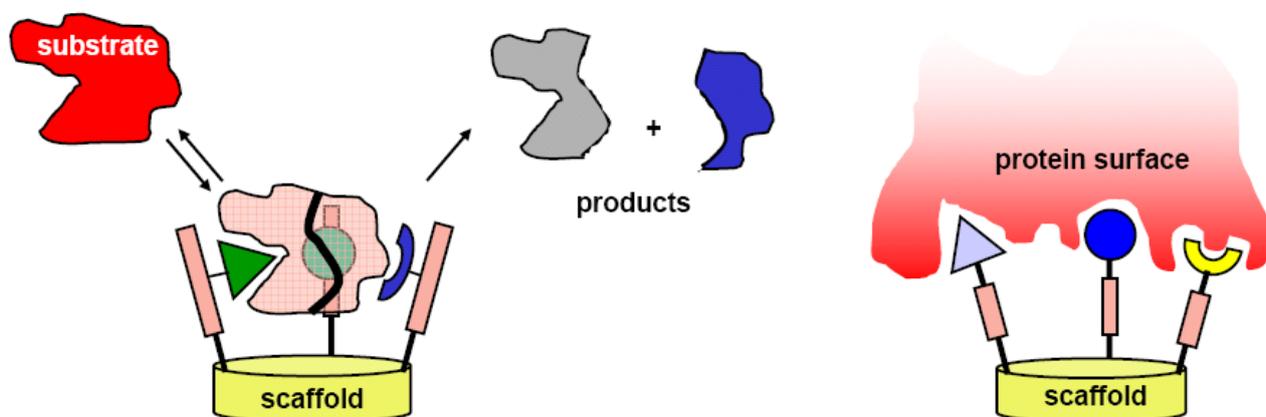


Figura 1. Rappresentazione schematica di strutture tripodali eterofunionalizzate impegnate in attività di catalisi (a sinistra) e di riconoscimento di superfici proteiche (a destra)

1.1 Applicazioni delle strutture molecolari tripodali nello sviluppo di recettori e sensori

Nello studio di recettori artificiali, coinvolti nel riconoscimento molecolare di strutture di interesse biologico, i recettori tripodali, dotati di simmetria C_3 , risultano particolarmente attraenti, in quanto semplificano i possibili modi di coordinarsi del recettore con la molecola target. Inoltre la possibilità di queste molecole di ottenere interazioni multi-point con un substrato ha fortemente accelerato lo sviluppo di recettori tripodali per una grande varietà di substrati inclusi cationi, anioni, peptidi e carboidrati.

Ad esempio il gruppo di Roelens⁵ ha riportato l'applicazione di un recettore tripodale nel riconoscimento molecolare di diversi monosaccaridi. Nel lavoro citato è stato utilizzato come scaffold un 2,4,6-trietilbenzene 1,3,5-trisostituito con tre funzionalità t-ottilurea, dove i tre gruppi ureidici convergenti, formano dei legami a H con gli ossidrili dei monosaccaridi target. La formazione del complesso (recettore-monosaccaride, con stechiometria 1:1) è stata seguita con degli esperimenti di $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 . Sono stati studiati una serie di glicosidi biologicamente rilevanti, funzionalizzati con una catena ottile, per consentirne la solubilità in solvente organico. Dai risultati ottenuti si rileva una certa specificità di riconoscimento per i diversi ottil-glicosidi. Ad esempio il valore di affinità dell'interazione del recettore per il βGal è 5 volte superiore rispetto a quello per il βMan .

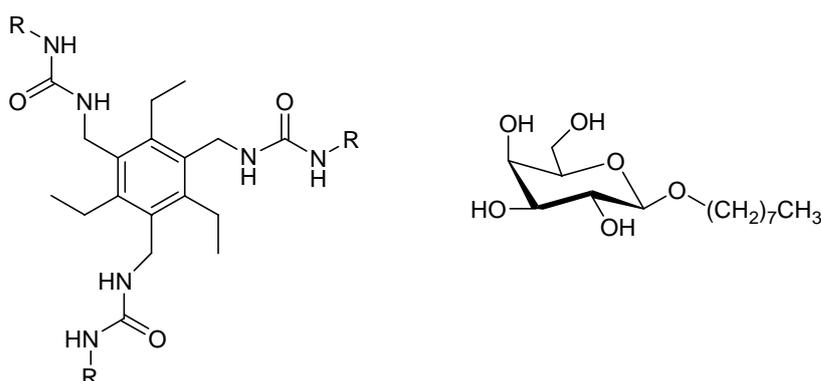


Figura 2. A sinistra è riportato il recettore tripodale tris-t-ottilurea ($R = t\text{-ottil}$), a destra un ottilglicoside (1-O-ottil- β -galattosio), studiato come molecola target.

Partendo dalla struttura di un antibiotico naturale quale la Nonactina, è stata sviluppata una classe di recettori artificiali tris(ossazoline) in grado di riconoscere selettivamente sali di ammonio (come l' NH_4^+ rispetto ad altri ioni come il K^+)^{2a}.

Nel 2003 lo studio di questi recettori tripodali con bracci ossazolinici⁶ è stato esteso ad ammine primarie (protonate) con centri chirali in posizione β e da questi studi è emerso che le ammine target con una funzionalità ossidrilica in quella posizione, agiscono da accettori di legami a H da parte del recettore (dove sono presenti tre centri chirali) che, grazie alla formazione di queste interazioni deboli, riconosce con una buona enantioselettività l'ammina target.

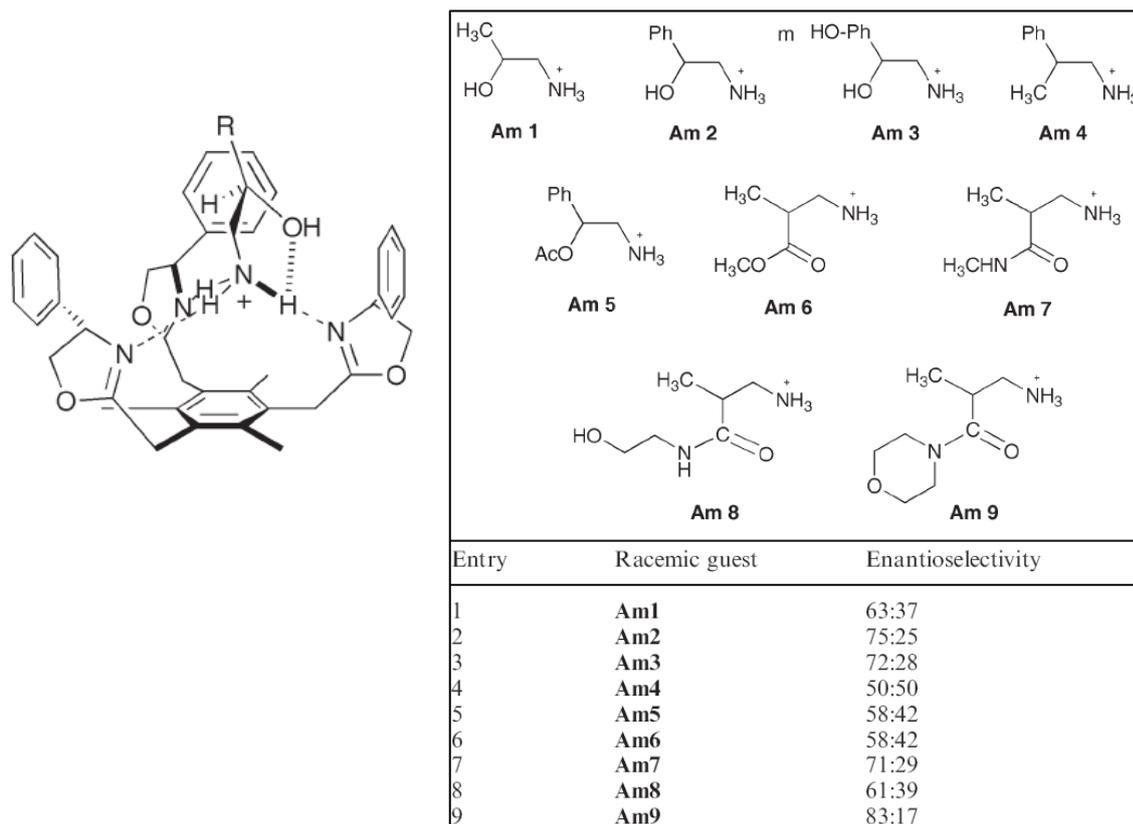


Figura 3. A sinistra è riportata la struttura del recettore tris(ossazolina) complessato ad una ammina primaria protonata. A destra è riportata una lista dei ligandi testati: si noti che per ottenere un riconoscimento enantioselettivo è richiesta la presenza di un gruppo accettore di legami a H in posizione β nelle ammine protonate (ad esempio sostituendo l'ossidrilico dell'ammonio Am2 con un metile Am4 si ottiene la perdita completa di enantioselettività nel riconoscimento da parte del recettore tris(ossazolina)).

La possibilità di applicazioni analitiche spinge verso lo studio di architetture molecolari, in grado di associare questi recettori a sistemi "reporter", con lo scopo di studiare il binding direttamente per via spettrofotometrica (UV-Vis, fluorescenza..). Esistono diverse strategie che consentono di convertire un recettore sintetico in un sensore molecolare detto chemosensore. Tuttavia i vari metodi possono essere

ricondotti a due approcci: il primo è detto indicatore-spacer-recettore, il secondo è basato sulla sostituzione dell'indicatore da parte dell'analita.

Il primo approccio, è basato sulla sintesi di un recettore legato covalentemente, tramite uno spacer, ad un indicatore. L'introduzione dell'analita che si lega al recettore induce un cambiamento in assorbanza o fluorescenza dell'indicatore (Figura 4)^{3b}.

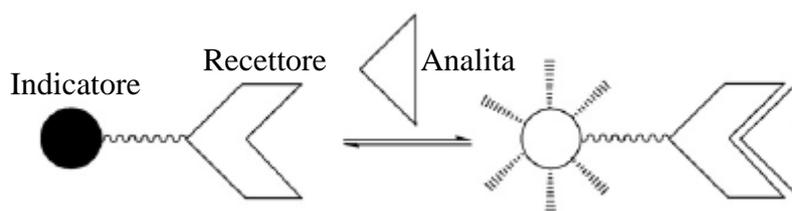


Figura 4. Approccio indicatore-spacer-recettore per il disegno di un chemosensore.

Ad esempio il gruppo di Anslyn⁷ ha utilizzato questo approccio per progettare una libreria di chemosensori selettivi per un substrato anionico (ATP) rispetto ad altri come GTP ed AMP. Questi chemosensori per anioni sono stati ottenuti funzionalizzando uno scaffold tripodale, legato su un supporto solido, con due gruppi guanidinici (responsabili dell'interazione con la specie anionica) seguiti da una sequenza tripeptidica (modificata in modo combinatoriale) che consente l'interazione specifica con l'analita. Le tre estremità dello scaffold sono state funzionalizzate in modo covalente con dei fluorofori. L'interazione del chemosensore con il substrato anionico provoca un cambiamento locale del pH che causa un aumento di fluorescenza facilmente misurabile. In questo modo è stato possibile misurare le costanti di complessazione dalla cui analisi è emerso che lo scaffold funzionalizzato con la sequenza Ser-Tyr-Ser ha una costante di binding di $3.4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$, circa 10 volte superiore alla stessa struttura priva della sequenza peptidica.

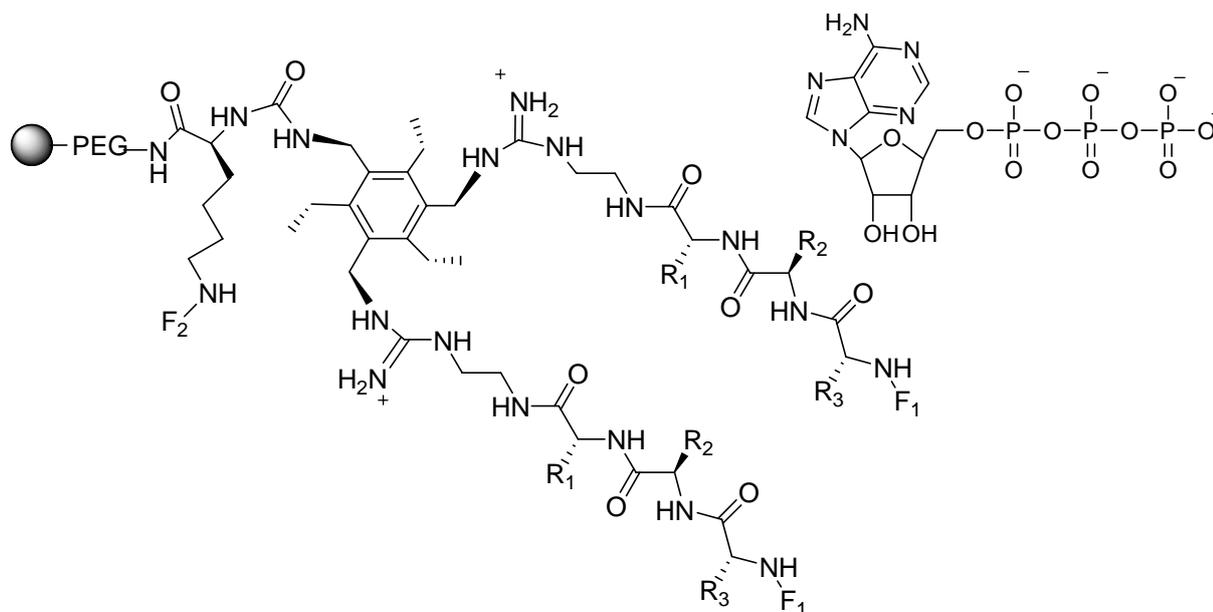


Figura 5. A sinistra è riportata la struttura del chemosensore su supporto solido (Tentagel) per anioni; F_1 ed F_2 sono dei fluorofori, F_1 = 7-Dietilamminocumarina; F_2 = 5-Carbossifluorisceina. A destra, la struttura del substrato anionico (ATP).

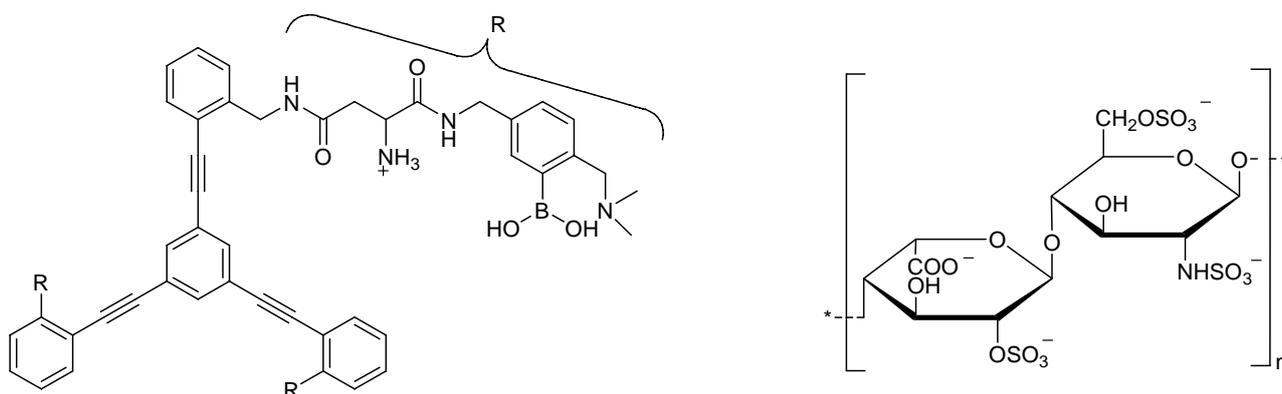


Figura 6. A sinistra è riportato il recettore per l'eparina la cui struttura è riportata a destra.

L'affinità e la selettività di questi recettori trivalenti è stata anche sfruttata per progettare un test per rilevare la concentrazione di bioanaliti complessi, come l'eparina, direttamente nel sangue. L'eparina è un anticoagulante la cui struttura consiste in un'alternanza di unità disaccaridiche, composte da residui di acidi exuronici (acido D-glucuronico o L-iduronico) e di D-glucosammina, legate tra loro da legami glicosidici 1→4. A livello operatorio e post operatorio è molto importante monitorare la concentrazione di questo anticoagulante per prevenire complicanze come emorragie. Il gruppo di Anslyn⁸ ha realizzato un recettore tripodale (Figura 6)

con un'ampia cavità centrale in grado di massimizzare l'affinità e la specificità delle interazioni dell'acido boronico (presente alle estremità del recettore) con l'elevata superficie dell'oligosaccaride (eparina). In questo caso l'utilizzo di uno scaffold fluorescente (1,3,5-trifeniletinilbenzene) ha permesso di ottenere una curva di calibrazione (misurando la fluorescenza in emissione) per l'eparina direttamente nel siero, ai dosaggi clinicamente rilevanti.

Nel secondo approccio viene utilizzato un indicatore che si lega reversibilmente al recettore mentre l'analita introdotto e va a competere con l'indicatore per il binding con il recettore, provocandone il distacco^{3b}. Il segnale ottenuto dalla liberazione dell'indicatore può essere seguito via colorimetrica o per fluorescenza. L'interazione tra il recettore e l'indicatore o l'analita è dovuta alla formazione di legami a H, interazioni elettrostatiche o alla complessazione con centri metallici. Il vantaggio di questo approccio è che non richiede di legare covalentemente il recettore all'indicatore, facilitandone quindi la sintesi e permettendo, inoltre, di utilizzare diversi indicatori per lo stesso recettore, sia in solvente organico che in solvente acquoso.

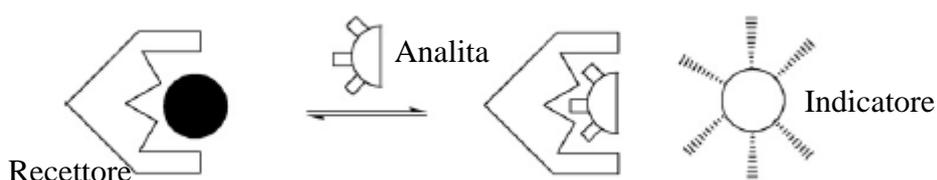


Figura 7. Chemosensore ottenuto per sostituzione dell'indicatore da parte dell'analita.

Anche in questo caso è stato il gruppo di Anslyn^{3d} che ha portato un notevole contributo nello sviluppo di questi sensori. Nel 2005, sono state sintetizzate delle librerie combinatorie di recettori tripodali su resina Tenatagel (strutturalmente simili a quelli riportati in figura 5 ma privi di gruppi fluorofori legati covalentemente) rilevando direttamente su resina la affinità, di questi recettori, per substrati anionici come ATP e GTP⁹. In questo caso è stato utilizzato un test di sostituzione dell'indicatore quale la fluoresceina. Il binding dell'analita induce lo spostamento del "probe" fluorescente facilmente rilevabile, ad esempio, mediante la misura del decremento della fluorescenza. Se il sistema di analisi è costituito da un array di recettori diversi con differenti costanti di affinità per i vari analiti si ottiene un pattern di segnali specifico per ciascuno di essi che può essere utilizzato come

un sorta di impronta digitale diagnostica per ogni singolo substrato. Con questa tecnica non è necessario avere una specifica interazione analita-substrato, ma è sufficiente avere un pattern di interazioni di diversa affinità tra l'analita e la libreria di recettori.

Lo stesso concetto è stato usato sempre dal gruppo di Anslyn¹⁰ per creare un pattern diagnostico per varie (glico)proteine (Figura 8). In questo caso sono state sintetizzate librerie di recettori tripodali su fase solida, dove le estremità peptidiche permettono di ottenere un binding specifico di diverse proteine (Lisozima, Elastina, Albumina Bovina), mentre l'estremità con l'acido boronico permette di differenziare l'interazione con proteine da quella con glicoproteine (Ovalbumina, Fetuina). Come indicatore è stato utilizzato il Rosso bromopirogallolo.

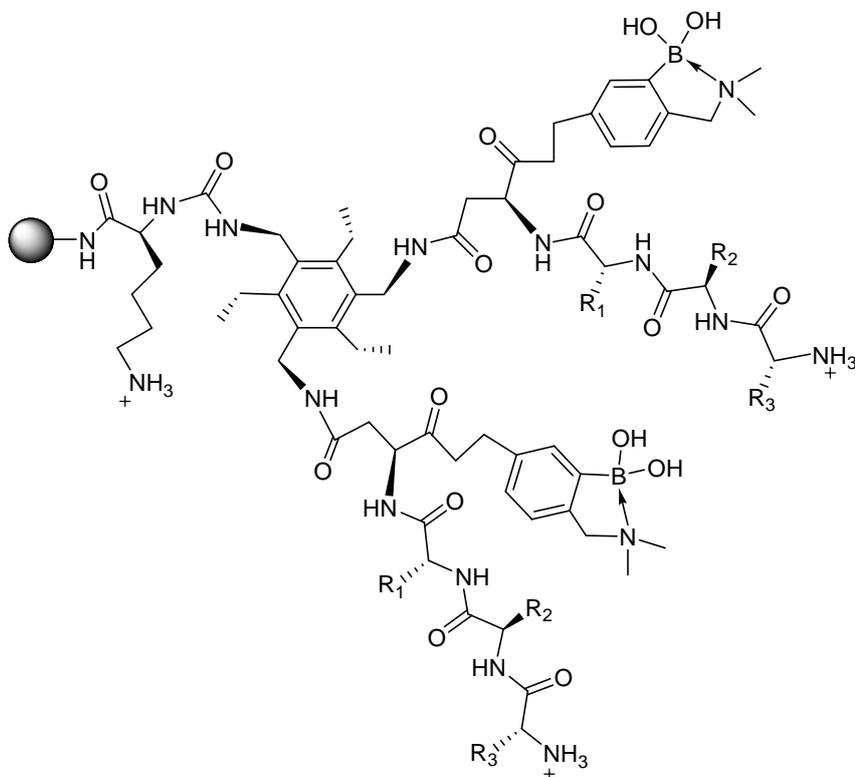


Figura 8. Chemosensore su supporto solido (Tentagel) per proteine e glicoproteine.

Questo tipo di approccio può essere anche utilizzato per recettori complessati a metalli^{3b}. Ad esempio in un lavoro del 2003 di Anslyn¹¹ è stato sintetizzato un recettore tripodale, dotato di simmetria C_3 , che una volta complessato al Cu^{2+} può legare un indicatore come la Carbossifluorisceina. L'aggiunta di un fosfato inorganico o di un fosfoestere, provoca il distacco dell'indicatore in seguito alla coordinazione dell'analita con il complesso recettore-metallo. Le costanti di binding

rilevate per il fosfato inorganico e per la fosfotirosina sono rispettivamente di 1.5×10^4 e $1.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

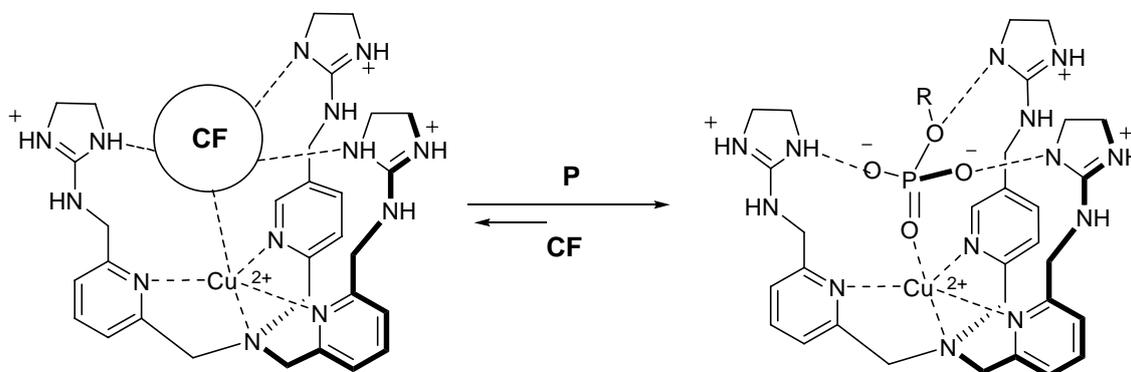


Figura 9. A sinistra chemosensore chelato al Cu(II) e complessato all'indicatore (CF= Carbossifluorisceina) e a destra con un fosfoestere (P), es. fosfotirosina.

1.2 Applicazioni delle strutture molecolari tripodali nella chimica biomimetica

Nel campo della chimica organica queste strutture tripodali sono state impiegate per mimare superstrutture biologiche come la tripla elica dell'unità strutturale del collagene (tropocollagene). Le tre catene sono costituite da un'unità tripeptidica caratteristica, $(\text{Gly-X-Y})_n$, che implica quindi la presenza della glicina (Gly) ogni tre residui e dove X e Y sono spesso la prolina (Pro) e l'idrossiprolina (Hyp). Il gruppo del compianto Prof. Goodman¹² ha funzionalizzato il triacido di Kemp (1,3,5-trimetil-1,3,5-tricarbossi cicloesano) con tre differenti sequenze peptidiche quali Gly-Pro-Hyp, Gly-Pro-Nleu, e Gly-Nleu-Pro (dove Nleu è la N-isobutilglicina) dimostrando che quest'ultima ha una maggiore propensione nell'indurre la formazione della tripla elica (Figura 10). Dal confronto delle misure di dicroismo circolare e degli spettri di NMR bidimensionale è emerso che la connessione covalente del peptide $(\text{Gly-Nleu-Pro})_n$ (con $n=5,6$) ad uno scaffold molecolare flessibile come il tren (tris(amminoetil)ammina) stabilizza significativamente la superstruttura coiled-coil, rispetto all'utilizzo di uno scaffold più rigido come il triacido di Kemp. Dagli studi di denaturazione al dicroismo circolare si nota che la funzionalizzazione del tren con peptidi più corti ($n=3$) non è sufficiente ad indurre una struttura secondaria in soluzione.

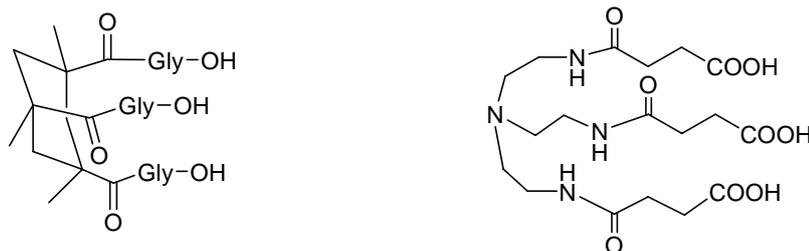


Figura. 10. Scaffold funzionalizzati con il peptide (Gly-Nleu-Pro)_n (con n=5,6) per mimare la struttura del collagene.

Queste strutture biomimetiche artificiali possono essere sistematicamente studiate in una grande varietà di condizioni con protocolli relativamente semplici che non possono essere utilizzati per le strutture biologiche di origine naturale. Per esempio, la progettazione di un modello biomimetico della tripla elica del nucleo centrale di gp41, proteina di fusione dell'HIV-1, può consentire di studiare potenziali inibitori della fusione del virus con le cellule umane. Nel lavoro di Quitao Yu¹³ viene riportata la sintesi di due strutture tripodali a tripla elica che costituiscono la porzione N e C terminale della proteina di fusione gp41. Nell'esempio citato è stato utilizzato uno scaffold tripodale con 3 gruppi aldeidici alle estremità, funzionalizzato su fase solida con 2 Cys-peptidi che corrispondono, alternativamente, alla sequenza N-terminale (Cys-N36) o C-terminale (Cys-C34 e Cys-DP178) di gp41. L'attività di queste strutture come inibitori della fusione dell'HIV e vaccini sintetici non è stata studiata.

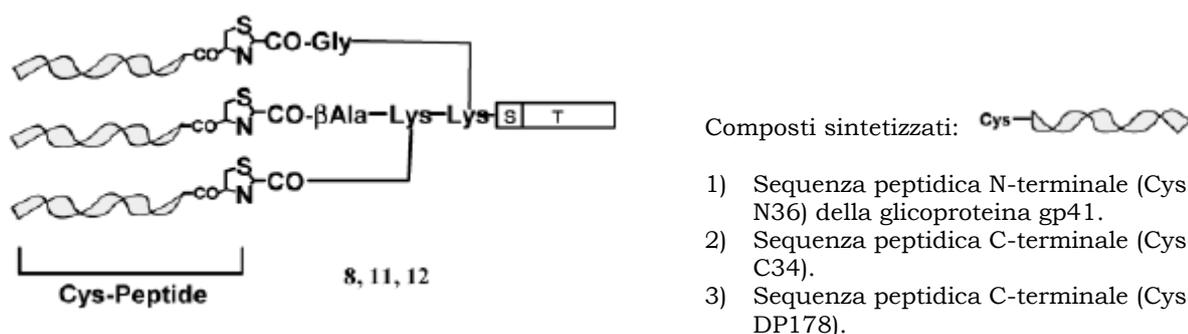


Figura 11. Scaffold funzionalizzato con le 3 eliche peptidiche. T corrisponde alla sequenza peptidica helper e S alla sequenza spacer.

Il gruppo di Guichard¹⁴ ha recentemente realizzato una serie di ligandi tripodali, con lo scopo di mimare la glicoproteina CD40L. In natura questo ligando di 39 KDa viene riconosciuto dal recettore CD40, un membro della superfamiglia delle TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptors). L'attivazione di questo recettore, in vivo, permette di amplificare la risposta immune contro patogeni o cellule tumorali.

Questi piccoli ligandi (Figura 12) sono stati ottenuti funzionalizzando diversi scaffold con una sequenza peptidica (H-Lys-Gly-Tyr-Tyr-Ahx-) contenente i siti aminoacidici della proteina CD40L che interagiscono con il recettore CD40, precedentemente individuati mediante studi di modeling partendo dalle strutture ai raggi X del complesso CD40L-CD40 e da mutagenesi sito diretta (l'Ahx, acido 6-amminoesanoico, è stato inserito come spacer). I ligandi ottenuti sono stati valutati con 2 serie test. Il primo è costituito da un esperimento SPR (surface plasmon resonance) che permette di studiare la loro attività nel competere con la glicoproteina naturale CD40L in soluzione, nei confronti del recettore RshCD40:mIg (una proteina ricombinante costituita dal recettore CD40 fuso al dominio Fc dell'Atc murino IgG legata ad una matrice di destrano ricoperta di anticorpi Anti-mIg). Nel secondo test, viene valutata l'attività di questi ligandi nell'indurre l'apoptosi nella linea cellulare BL41 del linfoma umano B. I dati, riportati in figura 13, dimostrano come le strutture con lo scaffold costituito da un peptide ciclico, quali A-1 e B-1, risultano attive nei due test, suggerendo che per il binding sia richiesta una distribuzione radiale delle unità responsabili del riconoscimento con il recettore CD40. Alcuni scaffold (ad esempio C-0 e D-0) non possono essere utilizzati a causa della loro scarsa solubilità in solvente acquoso.

Sempre nello stesso lavoro di Guichard^{14b}, il sistema trivalente A-1 è stato confrontato con il sistema -mono- di- e tetravalente, dimostrando che la struttura trivalente è un fattore critico per mimare la glicoproteina CD40. Sono stati sintetizzati anche una serie di ligandi partendo dalla struttura di B-1 e modificando la lunghezza del linker Ahx (costituito da $-(CH_2)_7-$). I dati, riportati per le prove di induzione di apoptosi, indicano che i composti attivi presentano un linker costituito da catene carboniose $-(CH_2)_n-$ dove n va da 3 ad 8 (la lunghezza ottimale è con n=6,7), in accordo con le misure ricavate dai cristalli ai raggi X del ligando CD40L (Figura 14). La sostituzione del linker con delle unità PEG (polietilenglicole) porta a dei composti inattivi. In seguito è stato riportato uno studio dove, nel composto B-1, è stata modificata la sequenza responsabile del binding H-Lys-Gly-Tyr-Tyr-, caratterizzata da una conformazione a β -turn invertita. I dati dimostrano che la presenza della Lys e delle Tyr sono critiche, mentre la Gly può essere sostituita con altri residui (es. Ala, D-Pro) senza perdere l'attività del ligando. Si è osservato che l'introduzione di un legame metilene amminico ($\psi(CH_2-N)$) o etilene amminico ($\psi(CH_2CH_2-N)$) al posto di quello peptidico è associato ad un forte aumento della capacità nell'indurre apoptosi da parte dei ligandi sintetici, con una significativa

diminuzione della costante di dissociazione ($K_D=2.8$ nM per il composto B-14, in confronto al composto B-1 dove $K_D=120$ nM).

Infine, tramite esperimenti di mutagenesi sito diretta, nello stesso lavoro è stato identificato un nuovo motivo (compreso tra l'Arg²⁰³ e l'Arg²⁰² del CD40L) critico per il legame del ligando al recettore CD40. In particolare, in una nuova struttura tripodale che presenta la sequenza H-Arg-Leu-Leu-Ile-Arg- viene riportato un significativo aumento del binding per il CD40 ($K_D=4.4$ nM) rispetto al composto B-1 ($K_D=120$ nM).

In questo lavoro si nota chiaramente come un approccio razionale alla sintesi di questi piccoli ligandi tripodali, permetta di ottenere composti con interessanti applicazioni nel campo terapeutico.

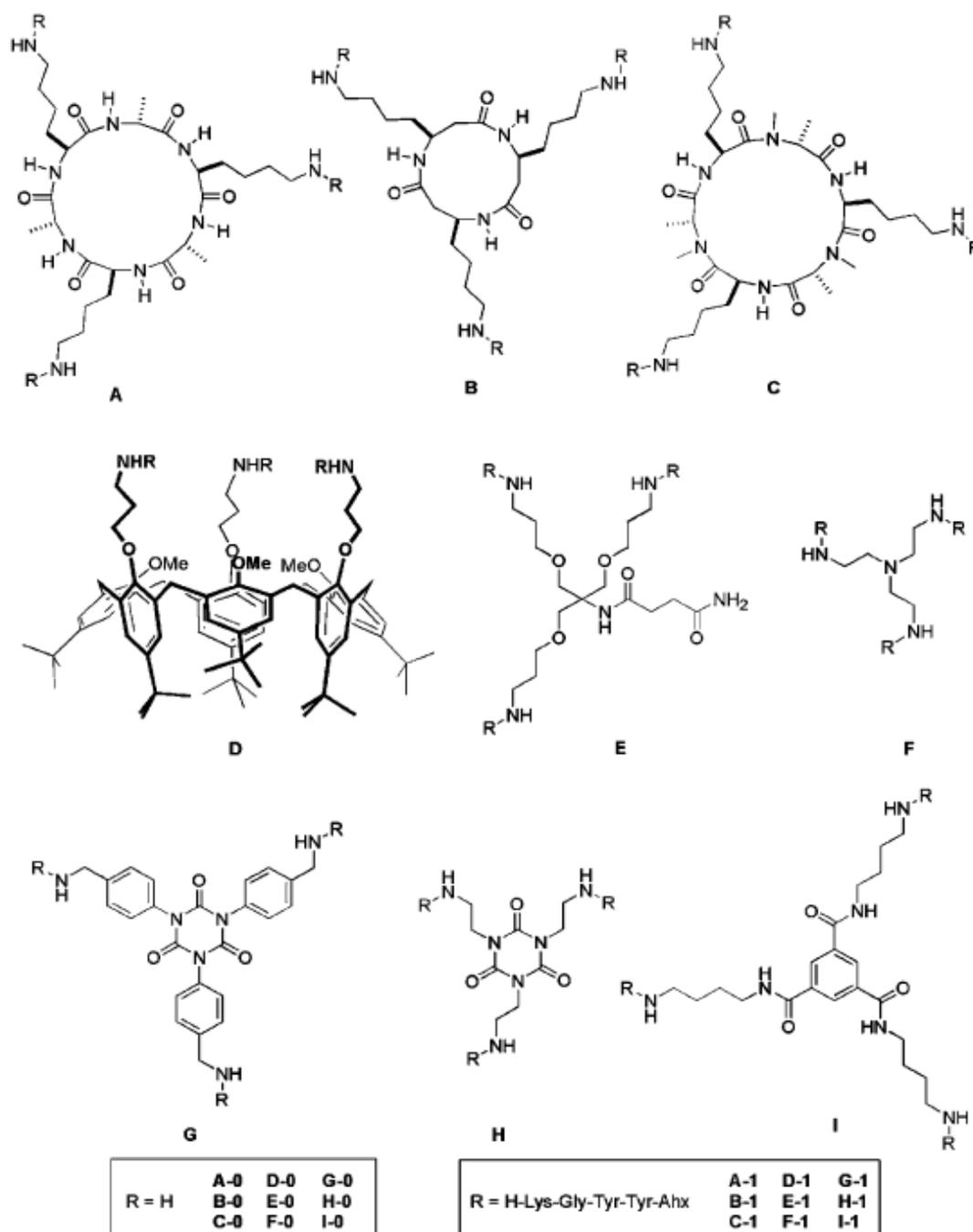


Figura 12. Composti trimerici sintetizzati, mimetici del ligando C40L. R corrisponde al motivo di binding della glicoproteina CD40L, legato ai diversi scaffold per mezzo di uno spacer (es. acido 6-amminoesanoico, Ahx).

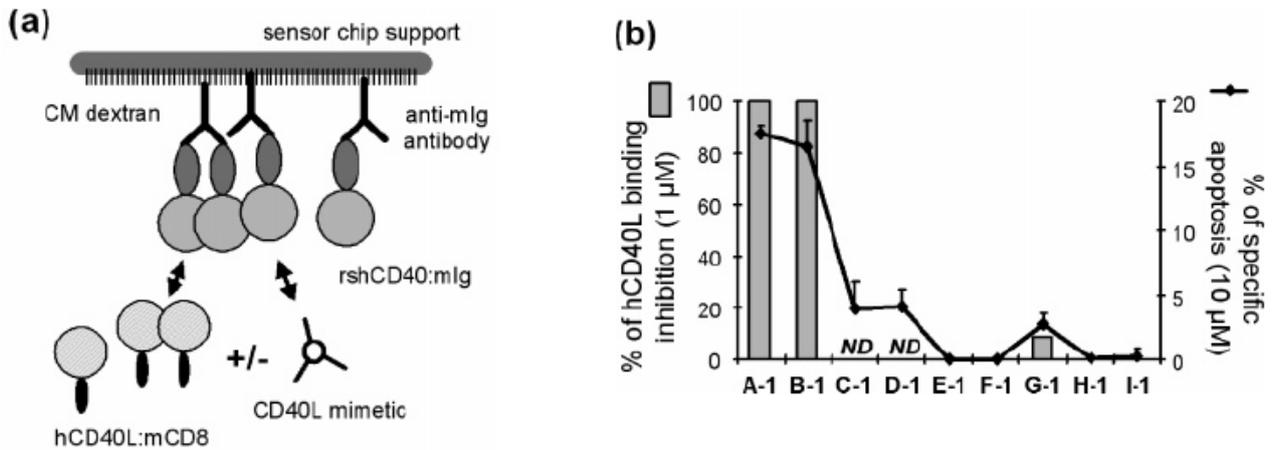


Figura 13. A sinistra (a) è riportato lo schema dell'esperimento SPR (surface plasmon resonance) per studiare la attività dei ligandi nel competere con la glicoproteina naturale CD40L per il legame al recettore CD40, ancorato su una superficie di destrano. A destra (b) sono riportati i dati ottenuti per i vari ligandi tripodali sintetizzati nel test SPR confrontati con la loro capacità di indurre l'apoptosi nella linea cellulare BL41 del linfoma umano B. Non sono riportati i dati delle misure SPR per i ligandi C-1 e D-1, a causa della loro scarsa solubilità nelle condizioni sperimentali.

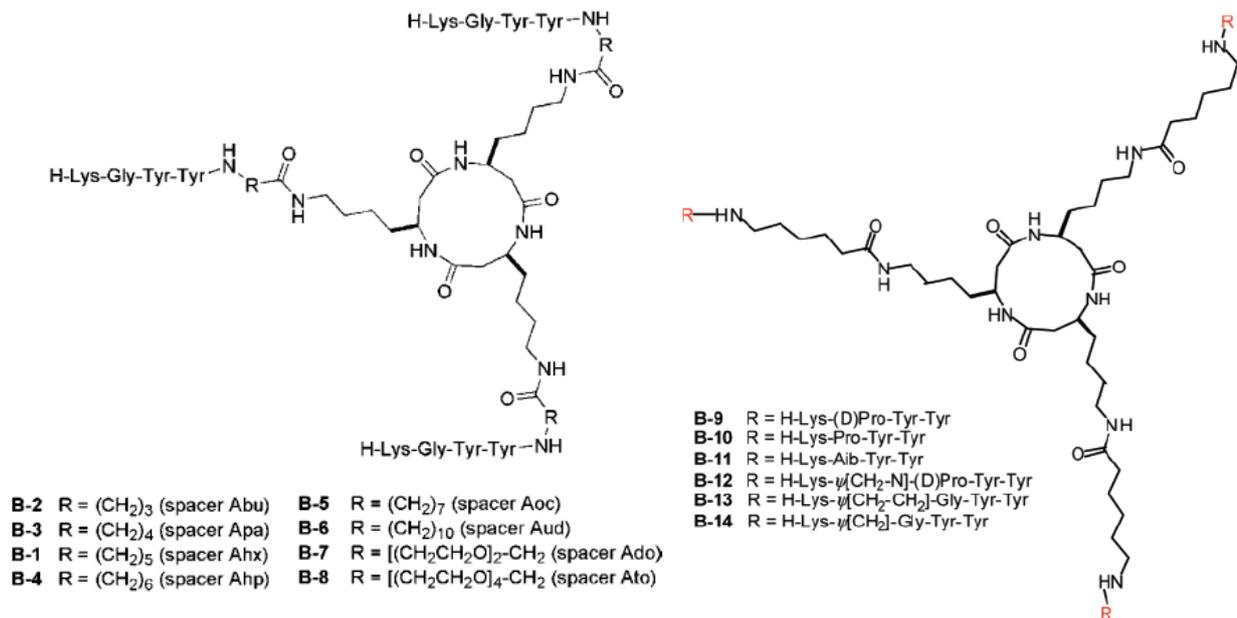
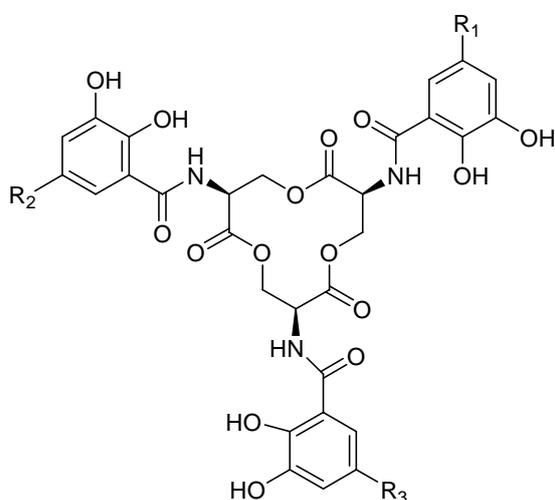


Figura 14. Strutture dei ligandi tripodali studiati a partire dallo scaffold B-0: i composti a sinistra sono stati ottenuti modificando lo spacer, mentre nei composti a destra sono state fatte delle modifiche alla sequenza peptidica responsabile del binding.

E' interessante notare che in natura sono note alcune strutture tripodali assai interessanti. L'enterobactina, ad esempio, è un catecolato ciclico prodotto da alcuni batteri (es. *E.Coli* e *Salmonella typhmirium*) in grado di formare un complesso esacoordinato ottaedrico con lo ione ferrico (Fe³⁺). Nel processo biologico

l'enterobactina viene glicosilata, all'interno dei batteri, da parte di un enzima quale la C-glicosiltransferasi IroB, e successivamente viene trasportata all'esterno della cellula dove è in grado di chelare lo ione ferrico, presente nel siero in concentrazione estremamente bassa (10^{-24} M) e di trasportarlo all'interno della membrana dei batteri, permettendone la sopravvivenza. Il gruppo di Walsh¹⁵ si è ispirato a questo sistema tripodale naturale per sintetizzare una serie di varianti sintetiche dell'enterobactina in grado di competere per la complessazione dello ione Fe^{3+} con la C-glicosiltransferasi IroB. Gli inibitori di questo enzima bloccano la glicosilazione della enterobactina favorendone il sequestro nel sangue da parte delle proteine Lcn 2 dei neutrofilo nei mammiferi. Da questi studi è emerso che le modifiche del centro e dei gruppi ossidrilici degli anelli 2,3-diidrossibenzoilici (DHB) della struttura dell'Ent portano a dei composti inattivi, che non vengono riconosciuti dall'enzima. Invece la bromurazione della singola posizione C5 dell'anello DHB porta ad un incremento del binding con l'IroB di circa 60 volte mentre la bromurazione del sito dove avviene la glicosilazione blocca l'attività dell'enzima. Seguendo questa strategia sono stati sintetizzati tre potenti inibitori costituiti dall'Ent con una, due o tre funzionalità DHB bromurate, particolarmente interessanti per lo sviluppo di nuovi antibiotici.



Enterobactina: $R_1, R_2, R_3 = H$.

Inibitore 1: $R_1, R_2 = H; R_3 = Br$.
 $K_i = 23$ nM; $K_d = 34$ nM.

Inibitore 2: $R_1 = H; R_2, R_3 = Br$.
 $K_i = 7.0$ nM; $K_d = 12$ nM.

Inibitore 3: $R_1, R_2, R_3 = Br$.
 $K_i = 3.3$ nM; $K_d = 9$ nM.

Figura 15. Struttura dell'Enterobactina (dove $R_1, R_2, R_3 = H$). Gli inibitori sono stati ottenuti dalla struttura dell'Enterobactina dove vengono bromurate le posizioni R_1, R_2, R_3 .

Infine, nei bioconiugati chimici, trovano applicazione strutture multivalenti che coinvolgono la connessione di ligandi multipli (come peptidi ciclici, o carboidrati) ad uno scaffold, allo scopo di aumentare l'affinità per un target biologico. Il gruppo di Dumy¹⁶ ha funzionalizzato uno scaffold decapeptidico ciclico (RAFT) con 2 domini funzionali indipendenti: un cluster di ligandi peptidici RGD (Arg-Gly-Asp) ciclici,

altamente selettivi per il riconoscimento dei recettori $\alpha v \beta 3$ della famiglia delle integrine, e dei gruppi funzionali progettati per verificare e caratterizzare il binding integrine-ligando (es. Fluoresceina, Biotina). Le integrine giocano un ruolo importante nella metastasi e nell'induzione dell'angiogenesi nei tumori. L'utilizzo di questi scaffold funzionalizzati con unità RGD cicliche permette la formazione di interazioni multiple con le integrine, migliorando il binding e favorendo l'endocitosi cellulare integrina-dipendente.

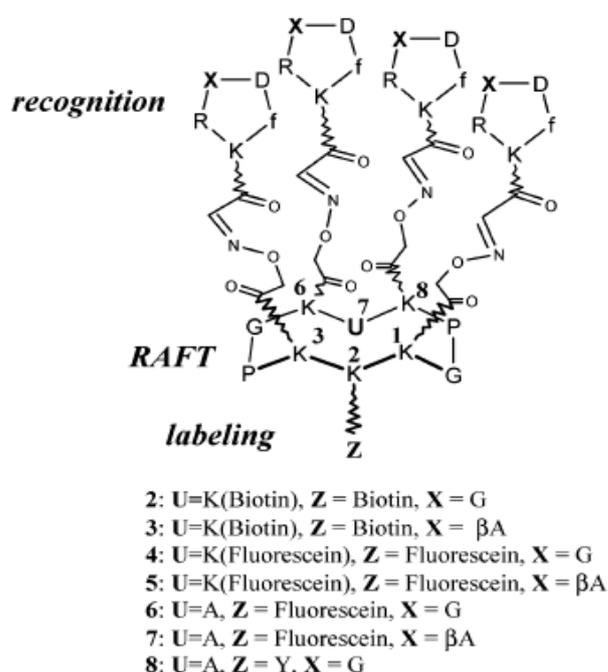


Figura 16. Scaffold RAFT funzionalizzato con peptidi ciclici contenenti la sequenza RGD. (*f* = D-Phe).

1.3 Applicazioni delle strutture molecolari tripodali nella catalisi

Nel campo della ricerca biomimetica è rivolta una forte attenzione verso lo studio di strutture tripodali, mimetiche del sito attivo degli enzimi. Nella catalisi, l'uso di ligandi tripodali chelanti di metalli di transizione che formano complessi termodinamicamente molto stabili permette di utilizzare i catalizzatori in concentrazioni molto basse.

In aggiunta, la completa occupazione dei siti di coordinazione dei metalli, riduce la possibilità di avere, nelle condizioni di reazione, la formazione di specie metalliche multimeriche non definite. Nell'utilizzo di strutture tripodali nel campo della catalisi si possono distinguere due applicazioni: da una parte è possibile progettare la

piattaforma tripodale in modo che ciascuna estremità si coordini ad un solo ione metallico, ottenendo un complesso con stechiometria 1:1 (tra legante e metallo); dall'altra parte è possibile utilizzare uno scaffold per legare tre gruppi funzionali ciascuno intrinsecamente in grado di chelare un metallo, in modo che il complesso abbia stechiometria 1:3 (rispettivamente legante e metallo). Il gruppo della prof. Licini¹⁷ ha recentemente riportato (2007) un esempio di un catalizzatore tripodale dotato di simmetria C_3 , costituito da una trifenolammina complessata ad un catione Ti(IV) (che origina un complesso Cat/Me con stechiometria 1:1, figura 17), attivo nella reazione di solfoossidazione del tioanisolo al corrispondente solfoossido (in presenza di acqua ossigenata), dimostrando una conversione selettiva del 50% del substrato a prodotto in soli 4 minuti ed un n° di turnover (TON) superiore ad 8000.

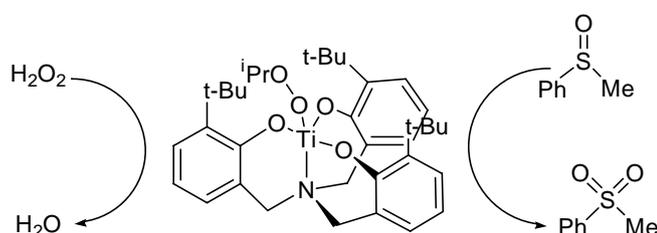


Figura 17. Catalizzatore tripodale dotato di simmetria C_3 , costituito dalla trifenolammina complessata al catione Ti(IV) attivo nella reazione di solfoossidazione, in presenza di acqua ossigenata.

Mentre in questo caso l'attività catalitica del complesso è determinata direttamente dalla piattaforma utilizzata, nel caso in cui siano presenti tre ioni metallici chelati alle estremità dello scaffold tripodale, l'accelerazione è data dagli effetti cooperativi tra di loro. Per esempio, nel nostro²¹ ed in altri gruppi¹⁸⁻²⁰ sono stati studiati leganti tripodali complessati a metalli quali Zn(II) e Cu(II) (con una con stechiometria legante/metallo 1:3) attivi nell'idrolisi di diesteri fosforici, come sistemi mimetici degli enzimi metallonucleasi.

Nel 1999 il gruppo di Reinhoudt¹⁸ ha sintetizzato dei Calix[4]areni in grado di formare complessi di- e tri-nucleari con lo Zn(II) ed attivi nell'idrolisi di esteri fosforici, in particolare di HPNP (2 idrossipropil-p-nitrofenilfosfato) usato come substrato modello dell'RNA. Questi composti, costituiti da uno scaffold calix[4]arenico funzionalizzato con 2 o 3 ligandi 2,6-bis(amminometil)piridinici, nella reazione di transesterificazione danno luogo, rispettivamente, ad un fattore di accelerazione di 23000 e 32000 volte ($k_{cat} = 24 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $K_m = 0.83 \text{ mM}$) rispetto alla reazione non catalizzata. In un lavoro più recente, sempre nel gruppo di

Reinhoudt¹⁹, sono stati studiati dei calix[4]areni funzionalizzati con una due o tre unità di triazociclonano (Tacn) chelate al Cu(II), su reazioni di transesterificazione di diverse sequenze di ribonucleotidi. I risultati dimostrano che le molecole sintetizzate idrolizzano con una buona selettività il legame fosfodiesterico tra due ribonucleotidi, dove è presente una pirimidina (preferenzialmente la citosina) in posizione 5' (ad es. Cp(3'-5')A). Generalmente si nota un aumento della costante di idrolisi osservata (di 42 volte) passando dal Calix[4]arene mono-nucleare ($k_{\text{oss.}}=7.1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) al Calix[4]arene tri-nucleare ($k_{\text{oss.}}=300 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$). Inoltre si nota che il complesso di-nucleare che presenta i gruppi triazociclonano legati in posizione 1,2-vicinale risulta più attivo rispetto a quello con i gruppi funzionali in posizione 1,3-distale, ad indicare la necessità di avvicinare i gruppi funzionali per ottenere un miglior andamento cooperativo. In un altro lavoro riportato nel 2002 dal gruppo di Anslyn²⁰ è stato sintetizzato un sistema tripodale (N,N,N',N',N'',N''-esa[(2-piridil)metil]-1,3,5-tris(amminometil)benzene) che complessa tre ioni Cu(II). Questo composto, studiato nell'idrolisi di diribonucleotidi, dimostra una spiccata selettività (56 volte maggiore: $k_{\text{cat}}=27 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $K_{\text{m}}=0.21 \text{ mM}$), nell'idrolisi della sequenza nucleotidica Up(2'-5')U rispetto all'isomero 3'-5'. La reazione catalizzata da questo sistema tripodale risulta inoltre 47 volte maggiore rispetto al ligando di-nucleare (usando lo stesso numero di equivalenti). Questo risultato conferma che sono necessari tre ligandi per avere un apprezzabile effetto cooperativo. Il catalizzatore dimostra inoltre una selettività di 48 volte maggiore ($k_{\text{cat}}=210 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $K_{\text{m}}=17 \text{ mM}$), per l'idrolisi della sequenza nucleotidica Ap(3'-5')A rispetto all'isomero 2'-5'.

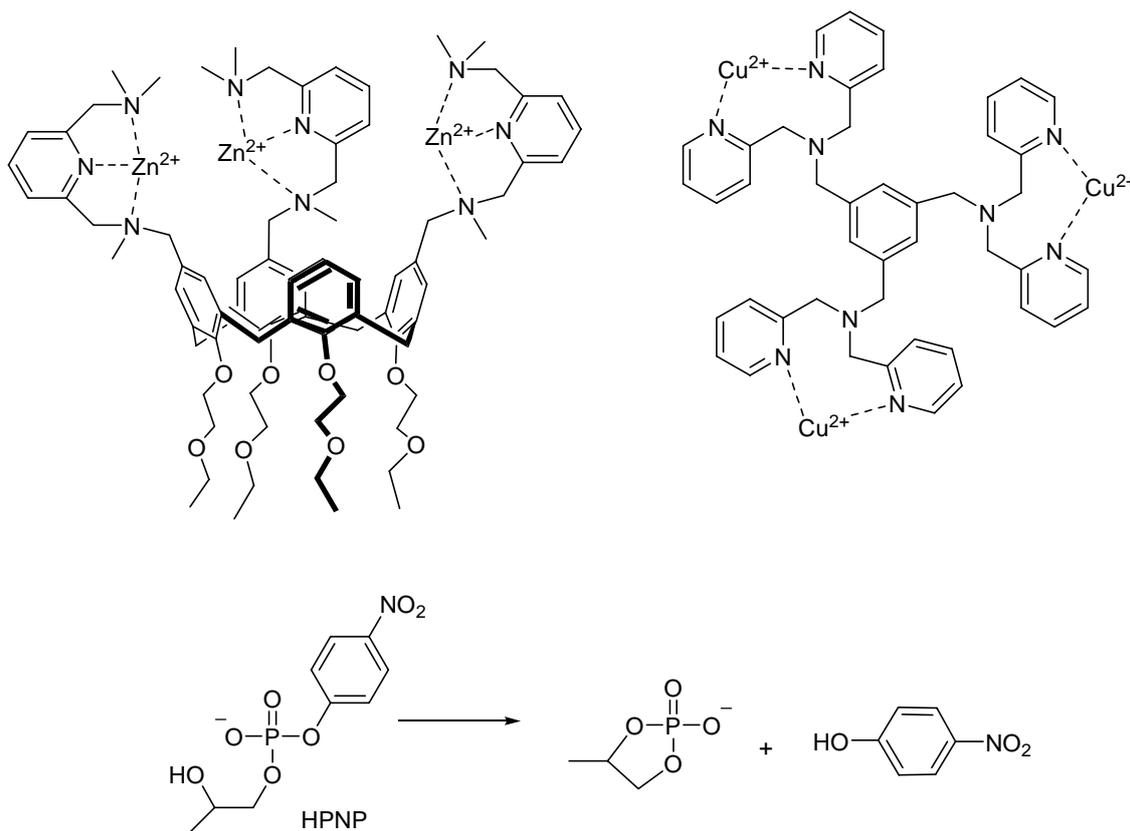


Figura 18. In alto a sinistra: calix[4]arene tri-nucleare complessato allo Zn(II), a destra il ligando tripodale (*N,N,N',N',N'',N''*-esa[(2-piridil)metil]-1,3,5-tris(amminometil)benzene) complessato al Cu(II); in basso: la reazione di idrolisi dell'HPNP.

Nel 2002 il nostro gruppo²¹ ha riportato un esempio di catalizzatore tripodale attivo anch'esso nella transfosforilazione di HPNP che complessa lo Zn (II) con una stechiometria 1:4 (legante/metallo). Il catalizzatore progettato^{21a} (Figura 19) è costituito da una piattaforma Tris(2-amminoetil)ammina (Tren) connessa a tre eptapeptidi. Ciascun peptide è costituito da 6 amminoacidi α -tetrasostituiti (Iva: (S)-Isovalina ed Api: 4-ammino-4-carbossipiperidina) che conferiscono una struttura ad elica 3_{10} in soluzione acquosa, ed un settimo amminoacido ATANP ((S)-2-ammino-3-[1-(Tacn)]acido propionico) posto in posizione 4 dell'eptapeptide. In questo caso l'attività del catalizzatore nella reazione di idrolisi dell'HPNP è data dalla cooperatività tra i 3 complessi Zn(II)-ATANP e da un controllo allosterico di un quarto ione Zn (II) in grado di coordinarsi alla piattaforma e di promuovere un cambiamento conformazionale che tende a chiudere le estremità dei bracci inducendo l'avvicinamento dei rimanenti tre ioni metallici. Nel caso specifico il catalizzatore tripodale risulta 50 volte più veloce ($k_{\text{cat}} = 3.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $K_m = 3.9 \text{ mM}$)

rispetto al singolo eptapeptide, con lo stesso numero di equivalenti. Il composto è stato testato anche nell'idrolisi di un oligomero costituito da 29 residui di RNA lineare, ma in questo caso è emerso un ruolo di controllo allosterico negativo da parte dello ione $Zn(II)$, in quanto la conformazione rigida dello scaffold impedisce alle estremità peptidiche (con il residuo ATANP), di legare e idrolizzare questo substrato naturale, molto più esteso.

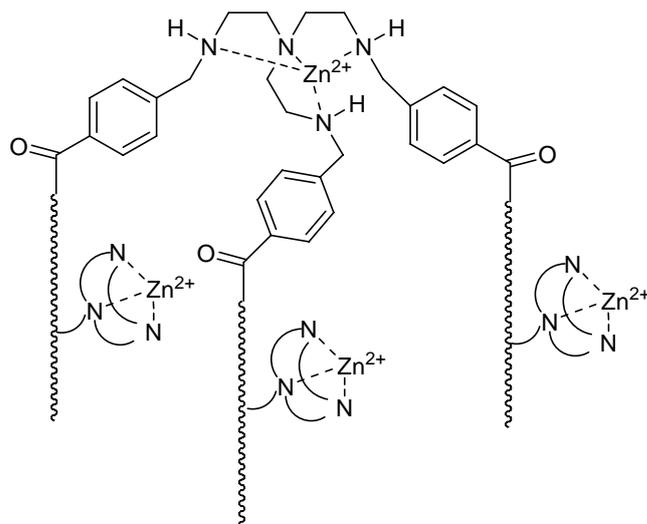


Figura 19. Tris(2-amminoetil)ammina connessa a tre eptapeptidi di sequenza: *N-Iva-Api-Iva-ATANP-Iva-Api-Iva-NHCH₃* chelata a 4 ioni $Zn(II)$.

Come si può notare, la combinazione su uno scaffold molecolare di strutture chelanti ioni metallici, costituisce una nuova classe di molecole per lo sviluppo di enzimi sintetici.

1.4 Applicazioni delle strutture molecolari tripodali nelle nanotecnologie

Le caratteristiche delle strutture tripodali, in particolar modo l'interazione tra strutture multivalenti con simmetria C_3 , trovano notevoli applicazioni anche nel campo delle nanotecnologie, per la costruzione di nuove strutture supramolecolari. Un primo esempio è stato riportato nel 1998 in un lavoro di Whitesides²², dove viene dimostrato come la tris(vacomicina carbossammide) lega un ligando trivalente costituito da tre copie di un peptide di sequenza D-Ala-D-Ala con una affinità eccezionale: infatti la costante di binding risulta di circa 25 volte maggiore rispetto a quella dell'interazione Biotina-Avidina (una delle interazioni più forti tra i sistemi

biologici). In questo lavoro il gruppo di Whitesides ha osservato che il binding tra i due sistemi trivalenti ($K_{d_{\text{trimero}}} = 4 \times 10^{-17} \text{ M}$) è fondamentalmente diverso dal sistema monovalente ($K_{d_{\text{monomero}}} = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$), e che la dissociazione del sistema trivalente, che avviene con un processo a stadi, può essere accelerata dall'aggiunta di un ligando competitore monovalente, aggiungendo un'ulteriore flessibilità per potenziali applicazioni del sistema.

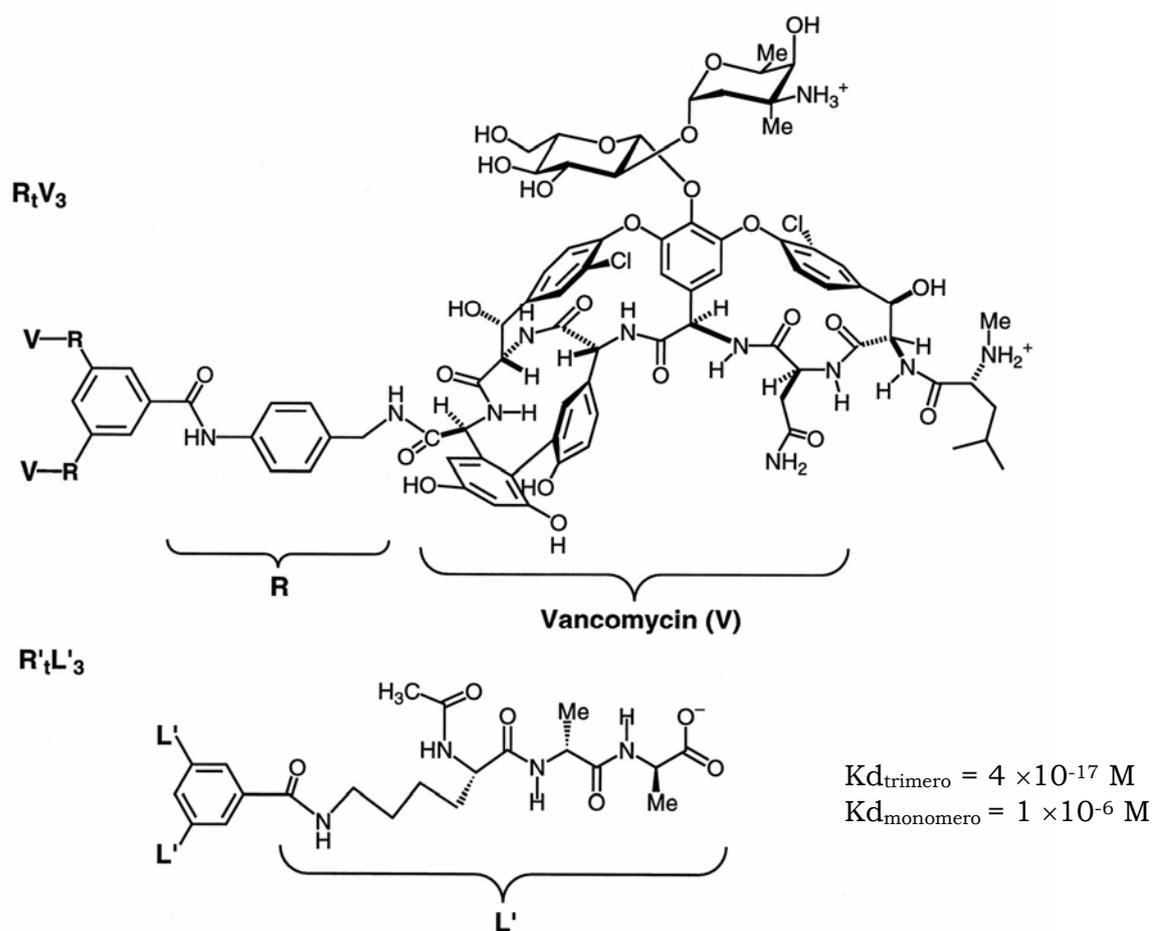


Figura 20. In alto è riportata la Tris(Vancomicina carbossammide) ed in basso il ligando trivalente derivato dalla sequenza D-Ala-D-Ala.

I gruppi di Stoddart e Balzani, nel 2004²³, hanno utilizzato l'interazione tra due sistemi tripodali con simmetria C_3 , detti "Rotaxani", per la costruzione di una macchina molecolare in grado di sviluppare una forza di circa 200 piconewton (Figura 21). Il sistema descritto comprende un primo sistema tripodale con un nucleo centrale costituito da trifenilbenzene che presenta su ciascuna estremità un gruppo dialchilammonio seguito da un gruppo biperidinio. Ciascuna estremità viene

inserita all'interno dei tre eteri corona che costituiscono i gruppi funzionali di un secondo sistema tripodale con al centro un trifenilene, e bloccata con l'aggiunta di un gruppo ingombrante all'estremità terminale. Il sistema tripodale risultante è in grado di spostarsi verso l'alto o verso il basso, in funzione al pH. In ambiente acido il gruppo dialchilammonio del sistema tripodale con nucleo centrale trifenilbenzenico, sarà protonato e formerà dei forti legami a H con gli O dell'etere a corona dell'altro sistema tripodale; viceversa a pH basico questa interazione verrà a mancare e il sistema tripodale con l'etere a corona si sposterà verso il bipyridinio, dove la struttura verrà stabilizzata dall'interazione di stacking di nuclei aromatici. Questo sistema costituisce un interessante esempio di "ascensore" molecolare.

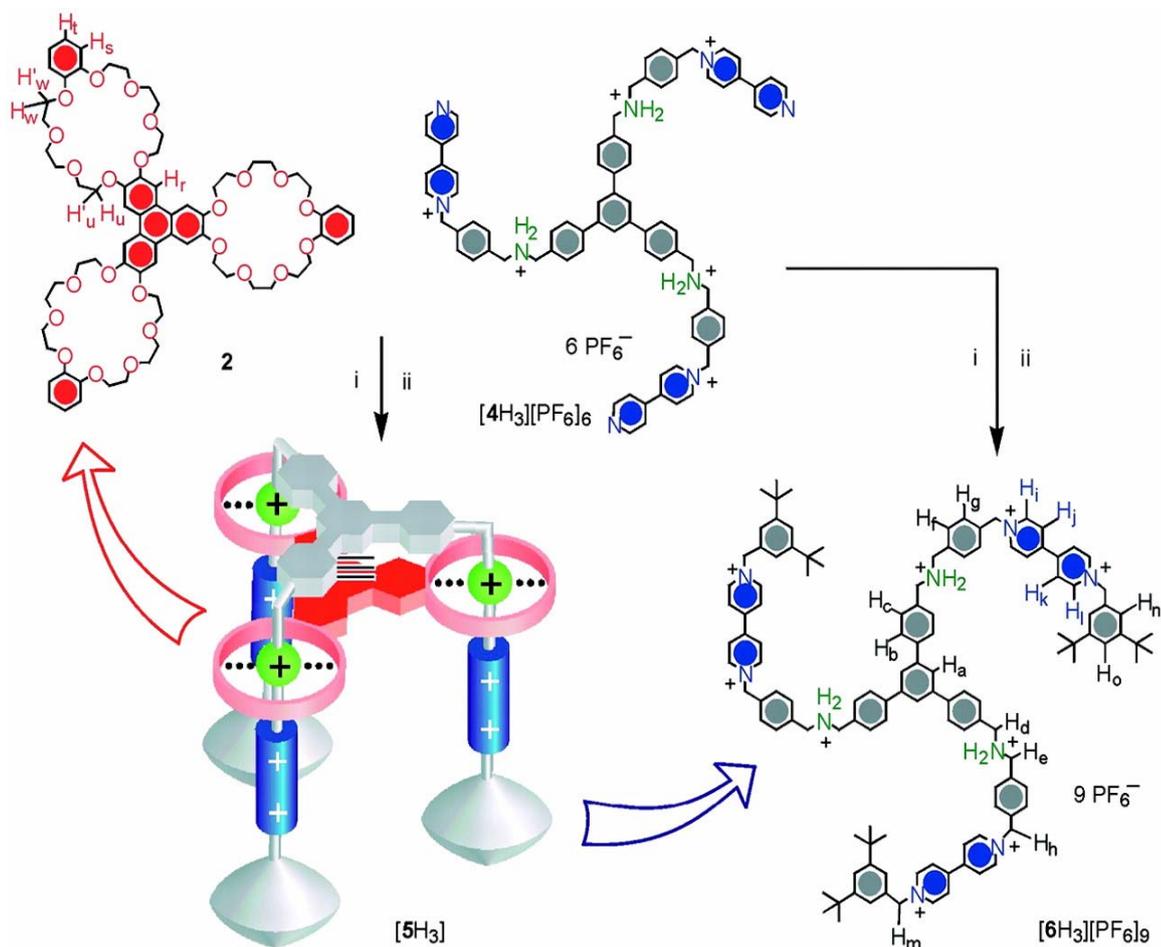


Figura 21. Struttura del "Molecular elevator".

Un terzo esempio dove vengono sfruttate interazioni tra due sistemi multivalenti per sviluppare applicazioni nel campo delle nanotecnologie è stato riportato dal gruppo di Tampè²⁴. In questo caso è stata studiata l'interazione tra l'istidina e il Ni^{2+} chelato

all'N-Nitrilotriacetato (NTA). Il gruppo ha sintetizzato dei sistemi bis-, tris-, e tetrakis-NTA (Figura 22) chelanti il Ni^{2+} , coniugati ad una estremità con un fluoroforo (carbossifluoresceina). Studiando l'interazione con dei sistemi multivalenti costituiti da sequenze di 6 o 10 istidine coniugate ad un secondo fluoroforo, hanno osservato un forte aumento dell'affinità e della specificità del binding passando dal sistema mono-NTA (Ni^{2+}) al sistema tetrakis-NTA (Ni^{2+}). Un aspetto interessante risiede nella possibilità di controllare queste interazioni ad esempio rimuovendo lo ione Ni^{2+} (con aggiunta di EDTA) o aggiungendo alte concentrazioni di un competitore (es. imidazolo). Queste strutture, opportunamente funzionalizzate con una estremità costituita da un alchiltiolo, possono essere immobilizzate su superfici di oro, formando dei monolayer auto assemblanti di bis- e tris-NTA (Ni^{2+}), che possono servire, ad esempio, per immobilizzare in modo non covalente proteine ricche di istidine sulla superficie. Questa tecnologia può trovare applicazione nella cromatografia di affinità e in processi di nanolitografia.

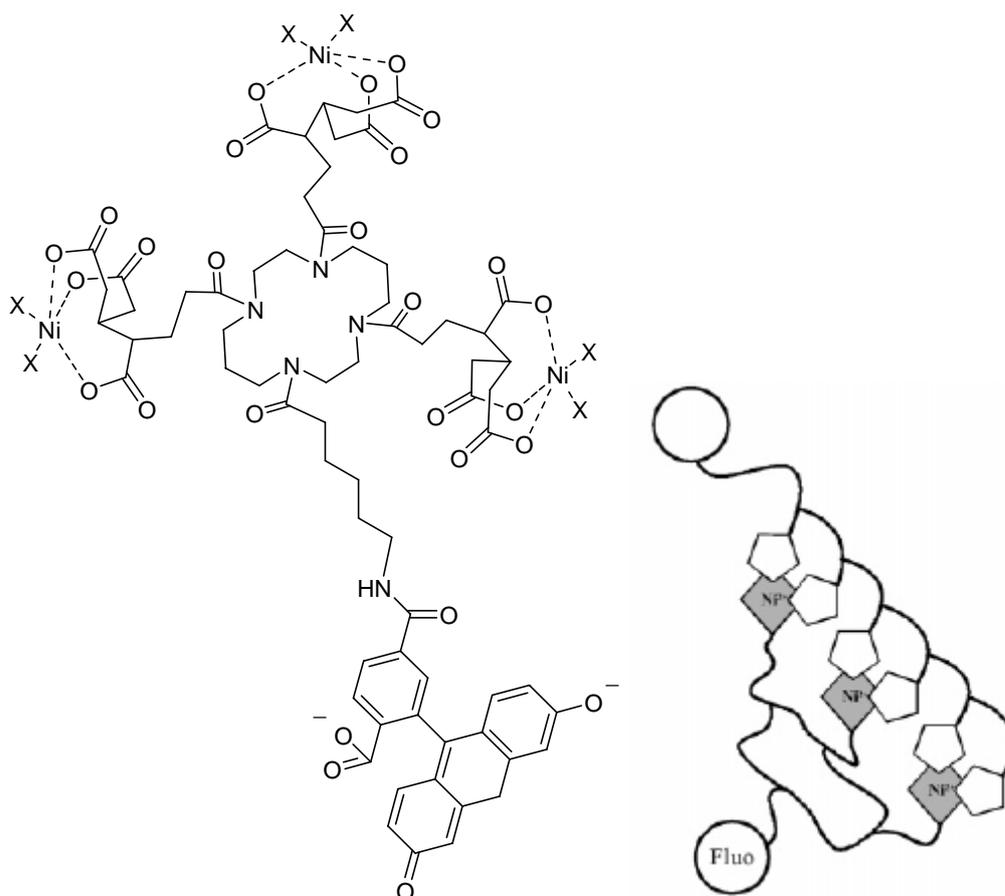


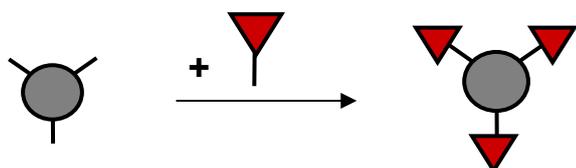
Figura 22. A sinistra è riportata la struttura di un chelate del Ni^{2+} (tetrakis-NTA) coniugato alla carbossifluoresceina, a destra l'interazione multivalente del sistema tripodale con una sequenza di 6 istidine.

1.5 Strategie sintetiche

E' facile notare come in quasi tutti questi studi la scelta di utilizzare strutture tripodali sia fortemente basata su un progetto razionale. E' sorprendente notare come solo in pochi casi sia stato studiato l'effetto dello scaffold utilizzato per la realizzazione delle strutture tripodali, anche se questo può giocare un ruolo cruciale nell'organizzazione spaziale dei gruppi funzionali. Presumibilmente la difficoltà a realizzare studi di questo tipo dipende dalla scarsa accessibilità sintetica di queste strutture tripodali.

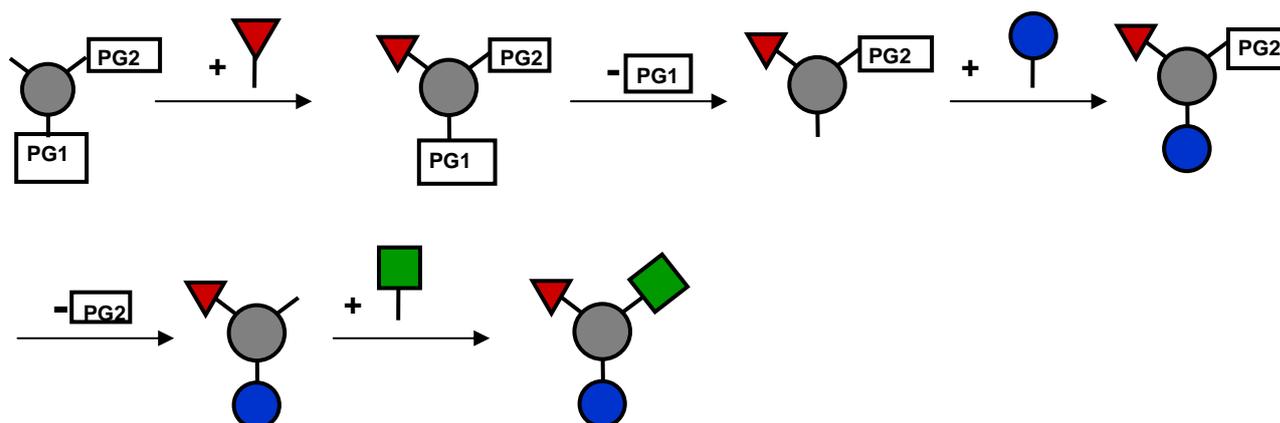
1.5.1 Sintesi di strutture tripodali in soluzione

Generalmente, le strutture tripodali sono sintetizzate in soluzione mettendo a punto uno specifico schema sintetico per la struttura progettata. Di fatto queste strategie sintetiche spesso non permettono di modificare in modo flessibile lo scaffold. Attualmente esistono diversi approcci per la sintesi di strutture tripodali: essi sono elencati e discussi brevemente di seguito.



1° Approccio: Sintesi di strutture tripodali simmetriche

L'approccio sintetico più semplice (1° Approccio) permette di preparare in un solo step strutture dotate di simmetria C_3 , via triplice introduzione di un gruppo funzionale allo scaffold. Queste strutture possono essere studiate e caratterizzate facilmente e trovano numerose applicazioni nel campo della catalisi e del riconoscimento molecolare (vedi esempi precedenti). La limitazione di questi sistemi è costituita dal fatto che essi comprendono un solo tipo di gruppo funzionale. Questo è in forte contrasto con quanto si osserva nelle proteine, dove un'elevata varietà di gruppi funzionali sono coinvolti nel binding e nella trasformazione del substrato.



2° Approccio: Sintesi di strutture tripodali eterofunzionalizzate, utilizzando gruppi protettori ortogonali

D'altra parte la sintesi di molecole eterofunzionalizzate asimmetriche richiede un approccio sintetico lungo e laborioso in quanto l'introduzione di una differente funzionalità richiede una chimica di protezione ortogonale, con l'utilizzo di gruppi protettori compatibili con i punti di ancoraggio sullo scaffold.

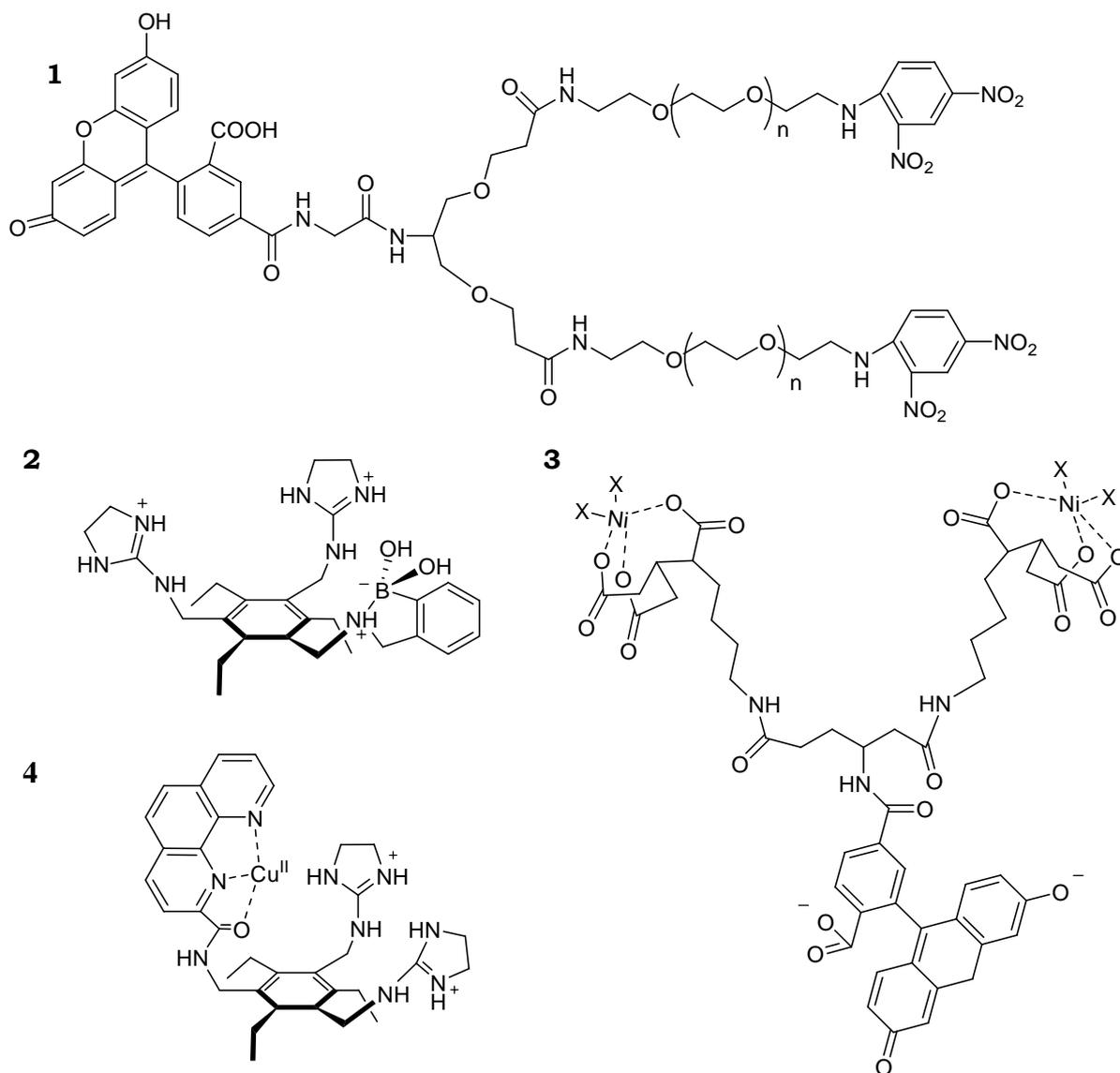
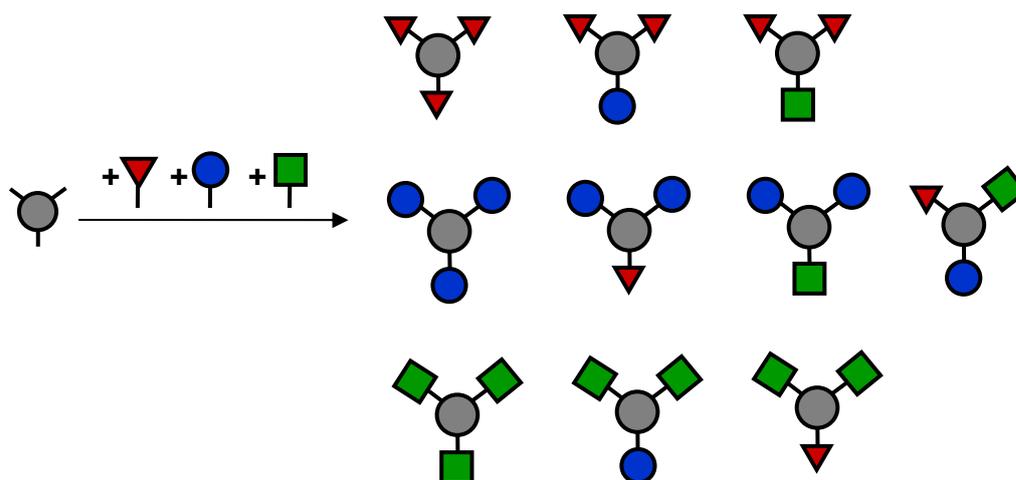


Figura 23. Strutture tripodali eterofunzionalizzate sintetizzate in soluzione. 1. Riporta la struttura di un antigene divalente per attivare la degranulazione delle Mast cellule²⁵. Le strutture 2. e 4. rappresentano dei recettori per anioni^{3b}, la struttura 3. è un chelante del Ni²⁺ (tris-NTA) coniugato alla carbossifluoresceina, con una elevata affinità per sequenze ricche di istidina²⁴.

Infine questi composti tripodali eterofunzionalizzati possono essere preparati in soluzione anche con un approccio di tipo combinatorio (3° approccio).



3° Approccio: Sintesi combinatorio di strutture tripodali eterofunzionalizzate

Recentemente nel nostro gruppo²⁶, è stato dimostrato che è possibile determinare l'attività catalitica di strutture tripodali eterofunzionalizzate direttamente da piccole miscele, ottenute semplicemente con una sintesi one-pot, senza utilizzare alcun gruppo protettore. In questo studio preliminare, è stata studiata una piccola libreria di 4 componenti (con attività catalitica nella reazione di transesterificazione di esteri fosforici), dove la distribuzione statistica dei catalizzatori nella libreria viene determinata e controllata variando il rapporto iniziale dei reagenti. In tal modo possono essere sintetizzate una serie di librerie dove la distribuzione dei catalizzatori viene sistematicamente variata. Una volta studiata l'attività catalitica di ciascuna libreria, il profilo di reattività risultante può essere deconvoluto al fine di ottenere l'attività di ciascun catalizzatore presente nella miscela. Questo approccio permette di ottenere dei buoni risultati con piccole librerie, ma la possibilità di estendere il protocollo a librerie più vaste è ostacolata dalle limitazioni della chimica in soluzione.

27000 membri e sottoposte a screening per il binding di Fe^{III} e piccoli peptidi, dimostrando l'elevato potenziale di questo approccio. Nella figura 26 sono riportate le strutture di altri scaffold di tipo AB_3 , riportate in letteratura, funzionalizzate con gruppi protettori ortogonali.

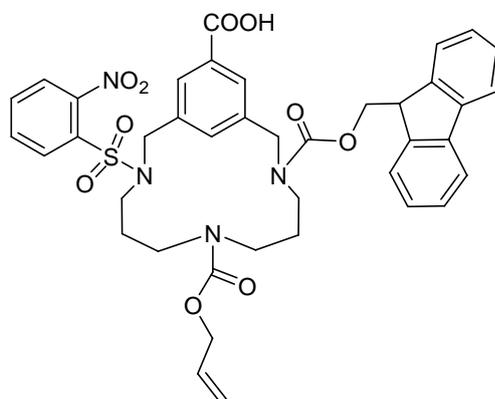


Figura 25. Struttura dello scaffold trazaciclofanico protetto selettivamente. Il gruppo carbossilico una volta attivato può essere utilizzato per ancorare lo scaffold alla resina (ad es. resina di Rink). Il gruppo Fmoc viene rimosso in piperidina, senza alterare gli altri gruppi protettori. Il gruppo *o*-NBS (nitrobenzene sulfonammide) può essere rimosso con $\text{HS}-(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ in presenza di base (DBU) con una chimica ortogonale rispetto al gruppo Aloc (allilossicarbonile). Infine, l'ammina protetta dal gruppo Aloc viene liberata in condizioni riducenti ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) in presenza di base (*N*-metil morfolina).

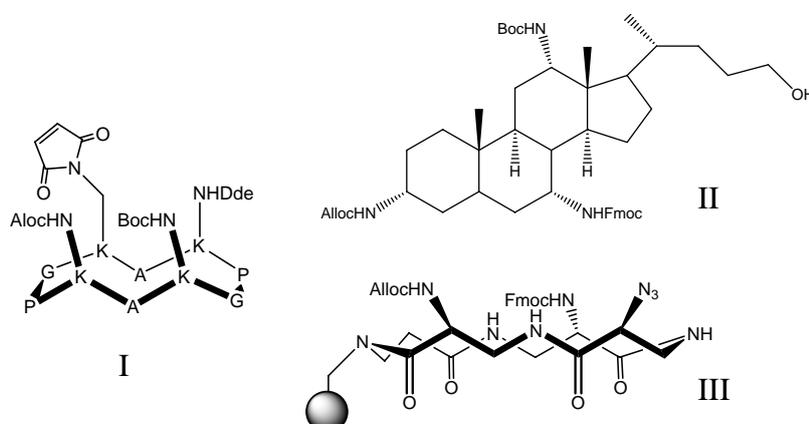


Figura 25. Strutture riportate in letteratura di scaffold di tipo AB_3 , funzionalizzate con gruppi protettori ortogonali (I^{28a}, II^{28b}, III^{28c}).

Approcci di questo tipo hanno permesso di sviluppare una strategia sintetica per la sintesi di librerie di peptidi ciclici su array. Normalmente queste strutture vengono sintetizzate a partire da peptidi lineari successivamente ciclizzati utilizzando opportuni gruppi protettori. Il gruppo di Kodadek²⁹ ha sintetizzato e purificato un peptide ciclico, con una struttura del tipo AB_3 , che presenta un gruppo carbossilico per fissare lo scaffold su di un array e tre gruppi funzionali opportunamente protetti

con gruppi protettori ortogonali per permettere la creazione di librerie di composti eterofunzionalizzati. Nel lavoro citato è stata messa a punto una sintesi fotolitografica su microarray, funzionalizzando una matrice di vetro (con estremità amminiche) con lo scaffold progettato e sostituendo in modo controllato i gruppi funzionali con la Biotina, attraverso diversi cicli di rimozione del gruppo NPPOC (N-(2-(2-nitrofenil) propilossicarbonilossi)) con irradiazione UV, e specifica sostituzione del gruppo Fmoc e ivDde (1-(4,4-dimetil-2,6-diossiccicloesil-1-ilidene) 3-metilbutil) con NPPOC. La funzionalizzazione è stata caratterizzata in modo quali/quantitativo con un'immagine di fluorescenza, dopo incubazione dell'array con il coniugato Fluoro 647-Streptavidina.

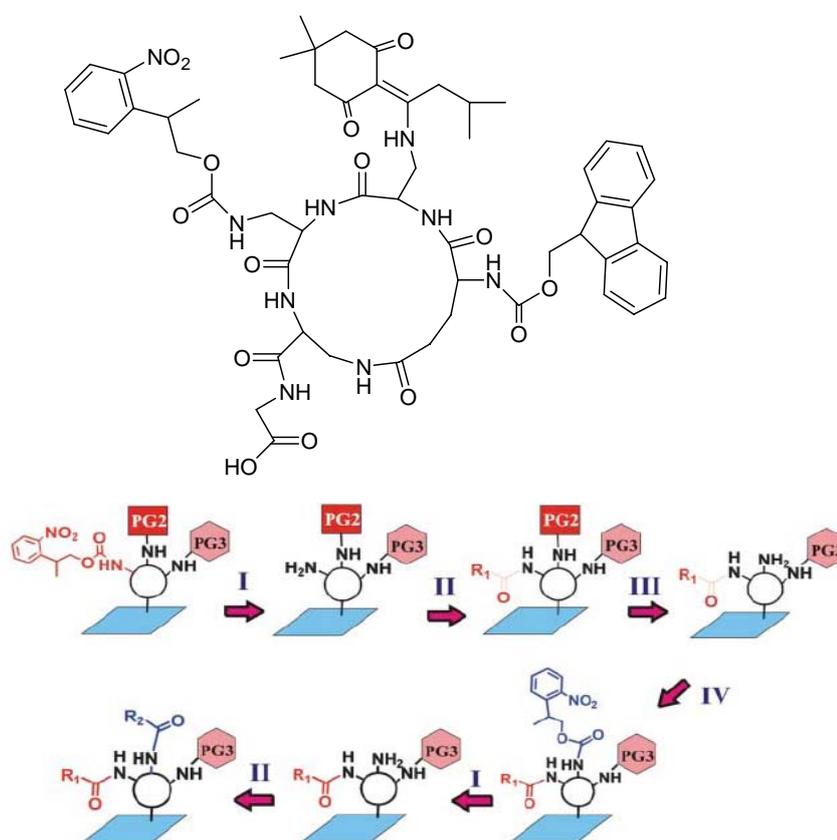


Figura 26. Struttura dello scaffold peptidico ciclico a 15 atomi. Il gruppo carbossilico una volta attivato può essere utilizzato per ancorare lo scaffold al supporto solido. Il gruppo NPPOC (N-(2-(2-nitrofenil) propilossicarbonilossi)) viene rimosso selettivamente con irradiazione UV, esponendo un gruppo amminico che potrà essere funzionalizzato con un acido carbossilico attivato. Il gruppo protettore Fmoc (PG2) viene rimosso in piperidina, e sostituito con il gruppo NPPOC, che potrà essere sottoposto ad un secondo ciclo di irradiazione UV e funzionalizzazione. Infine anche il gruppo ivDde (1-(4,4-dimetil-2,6-diossiccicloesil-1-ilidene) 3-metilbutil, PG3) stabile alla piperidina potrà essere rimosso con idrazina e sostituito con NPPOC.

Tuttavia si possono identificare 2 svantaggi relativi all'uso di scaffold del tipo AB₃. Primo, solo un numero limitato di scaffold-AB₃ è sinteticamente accessibile, conseguentemente i composti sintetizzati permettono di esplorare uno spazio chimico limitato. Secondo, l'utilizzo di scaffold-AB₃, opportunamente protetti, richiede una sintesi difficile e laboriosa con un uso intensivo di gruppi protettori ortogonali e, in seguito, una serie di step di protezione e deprotezione per ottenere il prodotto finale.

Durante questo lavoro di dottorato è stata sviluppata una metodologia³⁰ che permette di eliminare queste due problematiche, consentendo la funzionalizzazione di una grande varietà di scaffold su supporto solido senza la necessità di utilizzare gruppi protettori. Una grande varietà di scaffold di tipo A₃ (cioè scaffold che espongono 3 gruppi funzionali identici) sono disponibili commercialmente o sintetizzabili tramite brevi vie sintetiche. Ciò significa che l'utilizzo di questi scaffold dotati di simmetria C₃ aumenta significativamente la libertà di variare la piattaforma rispetto ai sistemi del tipo AB₃.

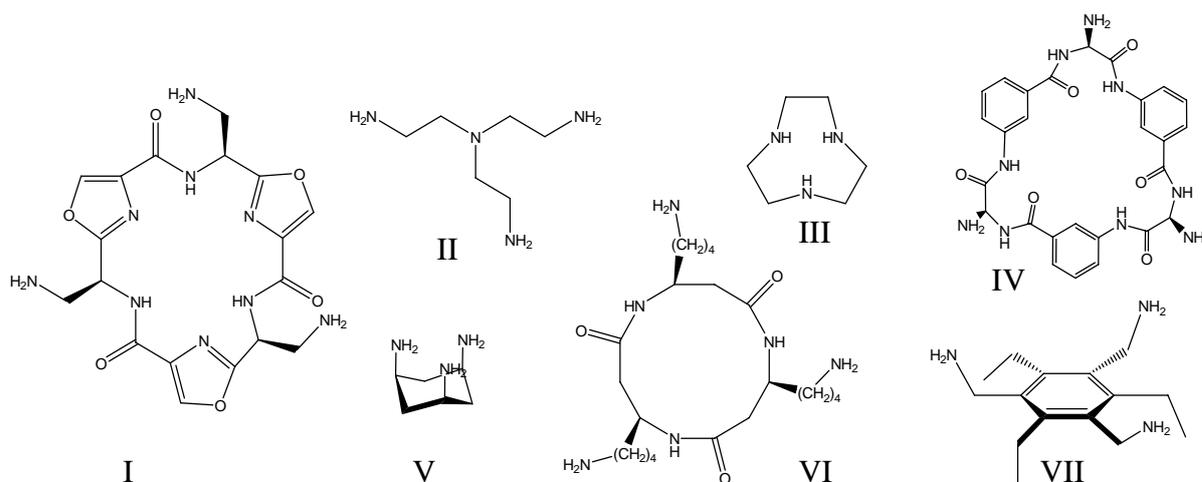


Figura 27. Strutture note di scaffold tipo A₃ (I^{31a}, II e III disponibili commercialmente, IV^{31b}, V^{31c}, VI⁴, VII^{31d}).

D'altra parte l'utilizzo di scaffold di tipo A₃ richiede una strategia sintetica concettualmente differente, per questo motivo questo tipo di scaffold è stato raramente utilizzato nella sintesi su fase solida. Una significativa eccezione è rappresentata dal lavoro di Anslyn³² dove è stato utilizzato uno scaffold 1,3,5-tris(amminoetil)-2,4,6-trietilbenzene per lo sviluppo di un array di sensori su fase solida.

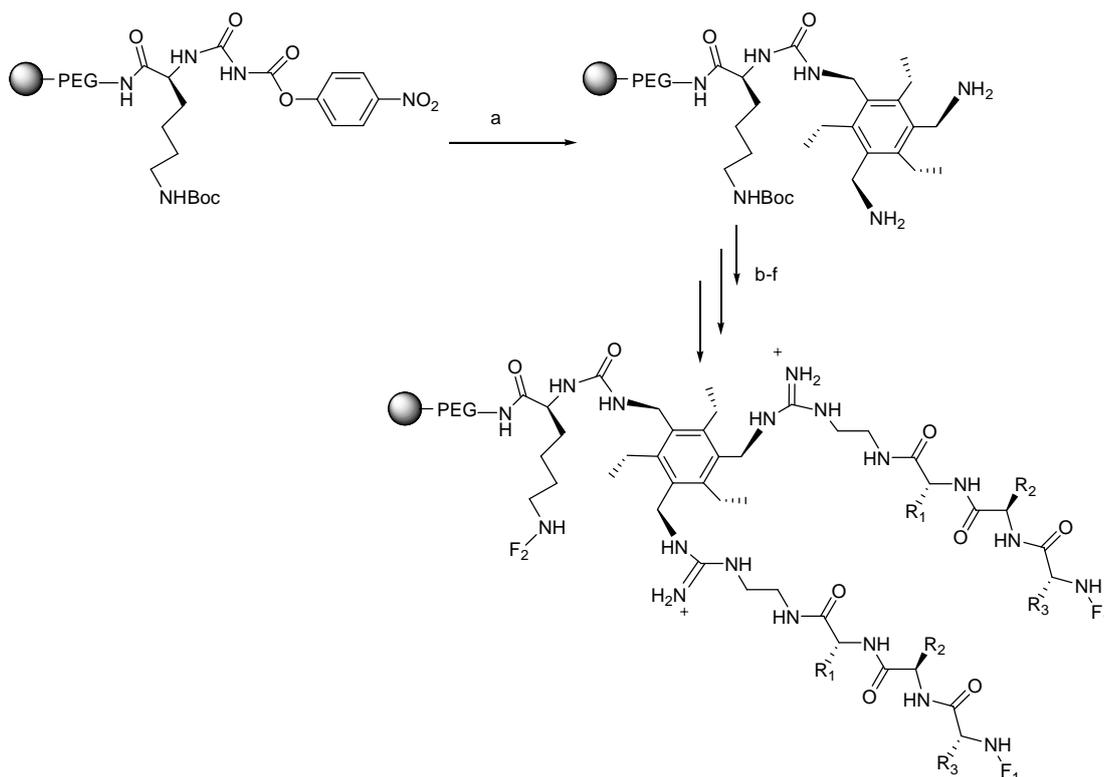


Figura 28. Schema sintetico della funzionalizzazione dello scaffold tripodale su fase solida. (a) 1,3,5-triamminometil-2,4,6-trietilbenzene, TEA, DMF, (b) 20% piperidina, DMF, (c) tre cicli di attivazione/deprotezione di una libreria di amminoacidi, con una metodologia "split and pool" (d) 20% piperidina in DMF, (e) $(PPh_3)_4Pd$, N,N' -acido dimetilbarbiturico, TMF, e (f) 90% TFA/4% TIS/4% Tioanisolo/2% H_2O . F_1 = 7-Dietilamminocumarina; F_2 = 5-Carbossifluoresceina.

In un altro esempio³³ isolato sono stati preparati piccoli trimeri peptidici su fase solida e, con una modesta resa, sono stati legati con un triplice coupling ad uno scaffold basato su un benzene 1,3,5-trisostituito. Tuttavia nonostante le potenzialità di questi scaffold di tipo A_3 , finora risultava assente uno studio sistematico della sintesi di queste piattaforme funzionalizzate su supporto solido.

1.6 Scopo della tesi

In questo progetto di ricerca è stata messa a punto una procedura sintetica innovativa per la sintesi di scaffold multivalenti funzionalizzati in modo sia simmetrico che asimmetrico su fase solida. Il protocollo sintetico ottenuto consente di avere una completa flessibilità nella modificazione della piattaforma come pure dei gruppi funzionali senza la necessità di ricorrere a gruppi protettori.

Dapprima la procedura è stata messa a punto per sistemi simmetrici. Successivamente essa è stata sviluppata aumentandone la versatilità al fine di migliorare la resa ed il grado di purezza dei composti ottenuti e permettere la sintesi di strutture eterofunionalizzate. La strategia sintetica descritta rende possibile anche la sintesi di molecole con una conformazione particolarmente rigida (capsule peptidiche).

Nel terzo capitolo la procedura descritta è stata applicata alla sintesi di strutture dotate di simmetria C_3 con attività catalitica. Nella prima parte sono stati sintetizzati piccoli catalizzatori tripodali, studiando diverse sequenze attive nell'idrolisi di esteri, e valutando come la struttura dello scaffold influenzi la cooperatività tra i gruppi funzionali legati. Nella seconda parte è stato funzionalizzato uno scaffold tripodale con una sequenza, riportata in letteratura, attiva nella reazione di condensazione aldolica stereospecifica.

Nel quarto capitolo sono state utilizzate le conoscenze sintetiche acquisite per la sintesi e lo studio di un inibitore multivalente progettato per bloccare la fusione del virus dell'HIV-1 con i linfociti. L'inibitore è stato progettato per complessarsi stabilmente alla tripla elica N-terminale della proteina gp41 presente sulla membrana del virus dell'HIV-1.

Bibliografia

- ¹ Per review: (a) Zhou, J.; Tang, Y. *Chem.Soc.Rev.* **2005**, *34*, 664. (b) Moberg, C. *Angew.Chem.Int.Ed.* **1998**, *37*, 248. (c) Berreau, L.M. *Eur.J.Inorg.Chem.* **2006**, 273.
- ² Per review: (a) Gibson, S.E.; Castaldi, M.P. *Chem.Commun.* **2006**, 3045. (b) Moberg, C. *Angew.Chem.Int.Ed.* **2006**, *45*, 4721. (c) Yoon, J.; Kim, S.K.; Singh, N.J., Kim, K.S. *Chem.Soc.Rev.* **2006**, *35*, 355. (c) Singh, Y.; Dolphin, G.T.; Razkin, J.; Dumy, P. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1298.
- ³ Per review: (a) Kuswandi, B.; Nuriman; Verboom, W.; Reinhoudt, D.N. *Sensors*, **2006**, *6*, 978. (b) Nguyen, B.T.; Anslyn, E.V. *Coord.Chem.Rev.* **2006**, *250*, 3118. (c) Wiskur, S. L.; Ait-Haddou, H.; Lavigne, J.J.; Anslyn E.V. *Acc. Chem. Res.*, **2001**, *34*, 963. (d) Wright, A. T.; Anslyn, E.V. *Chem.Soc.Rev.* **2006**, *35*, 14.
- ⁴ Per review: (a) Gibson, S.E.; Castaldi, M.P. *Angew.Chem.Int.Ed.* **2006**, *45*, 4718. (b) Parkin, G. *Chem.Commun.* **2000**, 1971.
- ⁵ Vacca, A.; Nativi, C.; Cacciarini, M.; Pergoli, R.; Roelens, S. *J.Am.Chem.Soc.* **2004**, *126*, 16456.
- ⁶ Kim, S. G.; Kim, K. H.; Kim, Y. K.; Shin, S. K.; Ahn, K.H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 13819
- ⁷ (a) Schneider, S.E.; O'Neil S.N.; Anslyn E.V. *J.Am.Chem.Soc.* **2000**, *122*, 542.
- ⁸ (a) Wright, A. T.; Zhong Z.; Anslyn, E. V. *Angew. Chem.*, **1999**, *117*, 5825. (b) Wright, A. T.; Zhong Z.; Anslyn, E. V. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *44*, 5679.
- ⁹ McCleskey, S. C.; Griffin, M. J.; Schneider, S. E.; McDevitt, J. T.; Anslyn, E. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1114.
- ¹⁰ Wright, A. T.; Griffin, M. J.; Zhong, Z.; McCleskey, S. C.; Anslyn E. V.; McDevitt, J. T. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2005**, *44*, 6375.
- ¹¹ Tobey, S. L.; Anslyn E. V. *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 2029.
- ¹² Kwak, J.; Capua, A, D.; Locardi, E.; Goodman, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14085.
- ¹³ Tam, J.P.; Yu, Qitao. *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 4167.
- ¹⁴ (a) Fournel, S.; Wieckowski, S.; Sun, W.; Trouche, N.; Dumortier, H.; Bianco, A.; Chaloin, O.; Habib, M.; Peter, J.C.; Schneider, P.; Vray, B.; Toes, R.T.; Offringa, R.; Melief, C.J.M.; Hoebeke, J.; Guichard, G. *Nature Chem. Biol.*, **2005**, *1*, 377. (b) Trouche, N.; Wieckowski, S.; Sun, W.; Chaloin, O.; Hoebeke, J.; Fournel, S. Guichard, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13480.
- ¹⁵ Lin, H.; Fischbach, M. A.; Gatto, G. J.; Liu, D. R.; Walsh, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9324.
- ¹⁶ Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Garanger, E.; Favrot, M.-C.; Dumy, P. *J.Am.Chem.Soc.* **2004**, *126*, 5730.
- ¹⁷ Mba, M.; Prins, L. J.; Licini, G. *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 21.

-
- ¹⁸ Molenveld, P.; Stikvoort, W.M.G.; Kooijman, H.; Spek, A.L.; Engbersen, J.F.J.; Reinhoudt, D.N. *J.Org.Chem.* **1999**, *64*, 3896.
- ¹⁹ Cacciapaglia, R.; Casnati, A.; Mandolini, L.; Seracchi, A.; Reinhoudt, D.T.; Salvio, R.; Sartori, A.; Ungano, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12512.
- ²⁰ Komiyama, M.; Kina, S.; Matsumura, K.; Sumaoka, J.; Tobey, S.; Lynch, V. M.; Anslyn, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13731.
- ²¹ (a) Scarso, A.; Scheffer, U.; Gobel, M.; Broxterman, Q.B.; Kaptein, B.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Scrimin, P. *Proc. Nat. Accad. Sci. Usa*, 2002, *99*, 5144. (b) Scarso, A.; Zaupa, G.; Houillon, F.B.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *J.Org.Chem.* **2007**, *72*, 376.
- ²² Rao, J.; Lahiri, J.; Isaacs, L.; Weis, R.M.; Whitesides, G.M. *Science*, **1998**, *280*, 708.
- ²³ Badjic, J.D.; Balzani, V.; Credi, A.; Silvi, S.; Stoddart, J.F. *Science*, **2004**, *303*, 1845.
- ²⁴ Lata, S.; Reichel, A.; Brock, R.; Tampe, R.; Piehler, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10205.
- ²⁵ Posner, R. G.; Geng, D.; Haymore, S.; Bogert, J.; Pecht, I.; Licht, A.; Savage, P. B. *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 3551.
- ²⁶ Zaupa, G.; Martin, M.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *New.J.Chem.* **2006**, *30*, 1493.
- ²⁷ (a) Opatz, T.; Liskamp, R.J.M. *J.Comb.Chem.* **2002**, *4*, 275-284. (b) Chamorro, C.; Hofman, J.-W.; Liskamp, R.J.M. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 8691.
- ²⁸ (a) Dumy, P.; Eggleston, I.M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M. *Tet.Lett.* **1995**, *36*, 1255. (b) Zhou, X.-T.; Rehman, A.; Li, C.; Savage, P.B. *Org.Lett.* **2000**, *2*, 3015. (c) Virta, P.; Karskela, M.; Lönnberg, H. *J.Org.Chem.* **2006**, *71*, 1989-1999.
- ²⁹ Li, S.; Marthandan, N.; Bowerman, D.; Garner, H.R.; Kodadek, T. *Chem. Commun.* **2005**, 581.
- ³⁰ Guarise, C.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 11670.
- ³¹ (a) Mink, D.; Mecozzi, S.; Rebek, J., Jr. *Tet. Lett.* **1998**, *39*, 5709. (b) Rasmussen, P.H.; Rebek, J., Jr. *Tet. Lett.* **1999**, *40*, 3511. (c) Bowen, T.; Planalp, R.P.; Brechbiel, M.W. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **1996**, *6*, 807. (d) Hennrich, G.; Anslyn, E.V. *Chem.Eur.J.* **2002**, *8*, 2219.
- ³² Schneider, S.E.; O'Neill, S.N.; Anslyn, E.V. *J.Am.Chem.Soc.* **2000**, *122*, 542.
- ³³ Ashraf, M.A.; Notta, J.K.; Snaith, J.S. *Tet. Lett.* **2003**, *44*, 9115.

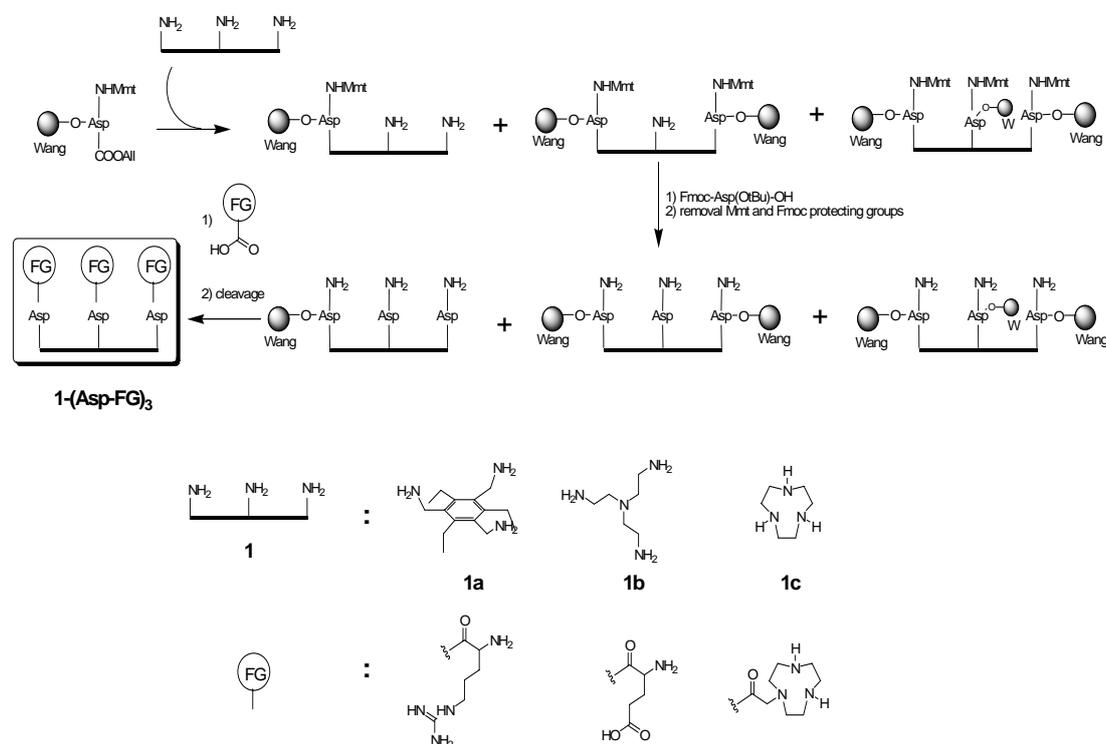
CAPITOLO 2.

Sintesi di strutture tripodali su fase solida

Risultati e discussione

2.0 Funzionalizzazione di scaffold tripodali in fase solida¹

Il primo punto di questo progetto di ricerca è stato lo sviluppo di una nuova strategia sintetica per la funzionalizzazione di scaffold molecolari, dotati di simmetria C₃, su fase solida. Questo schema sintetico sfrutta la classica chimica peptidica dello Fmoc in quanto questa procedura prevede di legare uno Fmoc-Asp(OH)-OAll sfruttando la formazione di un legame estereo tra il gruppo carbossilico della sua catena laterale e l'idrossile della resina Wang.



Schema 1. Presentazione schematica del protocollo per la sintesi dei composti 1-(Asp-FG)₃ su resina Wang.

Successivamente il gruppo carbossilico sulla resina è stato sbloccato dal gruppo allile, in condizioni riducenti, attivato con PyBOP, e fatto reagire con una piattaforma tris amminica. Ovviamente la piattaforma si potrà legare alla resina con 1, 2 o 3 gruppi amminici. Per esempio, l'aggiunta di 1,3,5-tris-(amminoetil)-2,4,6-trietilbenzene **1a**, frequentemente usata come molecola scaffold, provoca la formazione di tre prodotti (Schema 1, **1a**-(Asp(OWang)-NHMmt), **1a**-(Asp(OWang)-NHMmt)₂, **1a**-(Asp(OWang)-NHMmt)₃). Questa reazione è confermata dalla presenza di tre picchi nello spettro HPLC ottenuto dopo lo sblocco analitico del prodotto dalla resina. I tre picchi caratterizzati con analisi ESI-MS corrispondono ai composti: **1a**-

(Asp-NH₂), **1a**-(Asp-NH₂)₂, **1a**-(Asp-NH₂)₃, rispettivamente il mono-, di-, e tri- addotto in rapporto 48:35:17 (dall'integrazione dei segnali HPLC).

Nello step successivo, viene ristabilita una pseudo simmetria C₃, facendo reagire le ammine libere della piattaforma sulla resina con un eccesso di Fmoc-Asp(OtBu)-OH attivato con PyBOP. A questo punto, tutti i gruppi amminici della piattaforma sono sostituiti con un residuo Asp, con l'α-ammina protetta con Fmoc o Mmt e con la catena laterale protetta come terz-butyl estere o legata alla resina. La successiva rimozione del gruppo Fmoc (in piperidina) e dell'Mmt (in acido acetico e trifluoro etanolo) comporta la formazione di tre gruppi amminici liberi che possono essere funzionalizzati con qualsiasi struttura mediante un acido carbossilico attivato. Ad esempio lo scaffold **1a**-(Asp-NH₂)₃ è stato funzionalizzato con Fmoc-Glu(OtBu)-OH attivato con PyBOP ottenendo, dopo sblocco dalla resina, il composto **1a**-(Asp-Glu-NH₂)₃ con un grado di purezza superiore al 95% (com'è visibile dall'analisi HPLC massa).

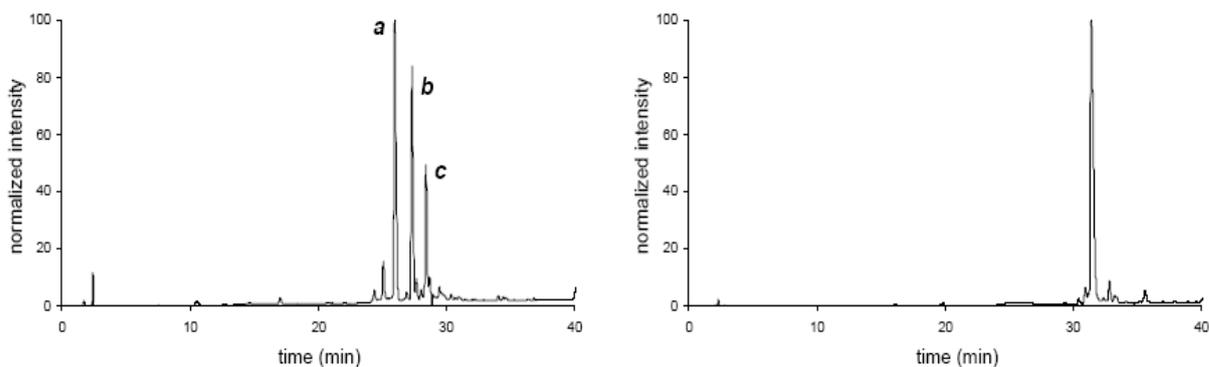
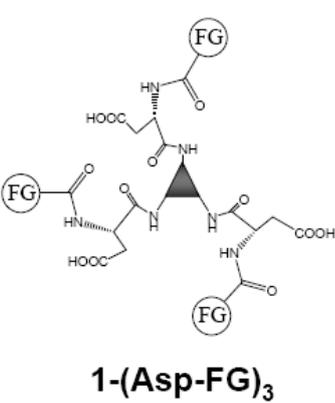


Figura 1. Cromatogrammi RP-HPLC. Nel grafico a sinistra il picco **a** (48%) corrisponde a **1a**-(Asp-NH₂)₃, il picco **b** (35%) **1a**-(Asp-NH₂)₂, il picco **c** (17%) **1a**-(Asp-NH₂)₃, ottenuti dopo sblocco analitico del prodotto in seguito all'aggiunta dello scaffold **1a** alla resina (Figura 1). Nel grafico a destra si nota il prodotto finale **1a**-(Asp-Glu-NH₂)₃ dopo lo sblocco dalla resina.

Dopo lo sblocco dalla resina (TFA 95%) la simmetria C₃ del prodotto viene completamente ristabilita, infatti la catena laterale dell'acido aspartico precedentemente legata alla resina o protetta con terz-butyl estere viene ottenuta come acido carbossilico libero. Utilizzando la stessa via sintetica lo scaffold **1a** è stato connesso ad altri gruppi funzionali come un residuo amminoacidico basico (arginina) ed un derivato azacrown per il binding di metalli ((1,4,7-triazaciclonan-1-il)-acido acetico, AA_{TACN}) ottenendo i composti **1a**-(Asp-Arg-NH₂)₃ e **1a**-(Asp-AA_{TACN})₃

con purezza, rispettivamente, dell'88 e 83% (Tabella 1).



The chemical structure of 1-(Asp-FG)₃ shows a central lysine-like backbone with three side chains, each terminated with a functional group (FG) and a carboxylic acid group (COOH).

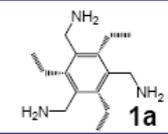
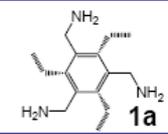
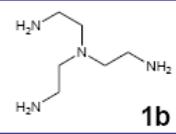
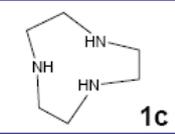
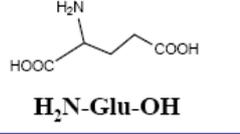
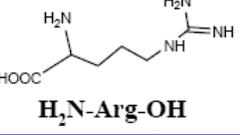
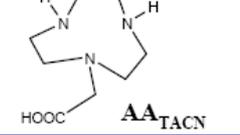
 scaffold FG 	 1a	 1b	 1c
 H₂N-Glu-OH	1a-(Asp-Glu)₃ Purity: >95% Yield: 91%	1b-(Asp-Glu)₃ Purity: 61% Yield: 57%	1c-(Asp-Glu)₃ Purity: 73% Yield: 66%
 H₂N-Arg-OH	1a-(Asp-Arg)₃ Purity: 88% Yield: 80%	1b-(Asp-Arg)₃ Purity: 48% Yield: 45%	1c-(Asp-Arg)₃ Purity: 78% Yield: 70%
 AA_{TACN}	1a-(Asp-AA_{TACN})₃ Purity: 83% Yield: 75%	1b-(Asp-AA_{TACN})₃ Purity: 50% Yield: 45%	1c-(Asp-AA_{TACN})₃ Purity: 80% Yield: 72%

Tabella 1. La tabella descrive i risultati ottenuti con il protocollo di sintesi su resina Wang.

E' evidente che la via sintetica descritta non è ristretta all'utilizzo di molecole scaffold tipo AB₃ e non richiede la (parziale) protezione della piattaforma.

Per illustrarne la versatilità, la procedura sintetica è stata ripetuta con altre due molecole come scaffold (**1b** e **1c**) che oltre ad essere frequentemente utilizzate in letteratura hanno caratteristiche diverse rispetto allo scaffold **1a**. La Tris(2-amminoetil)ammina (**1b**, Tren) ha una conformazione particolarmente flessibile rispetto ad **1a**, mentre il macrociclo triazociclonano (**1c**, Tacn) presenta tre ammine secondarie come sito di funzionalizzazione. Entrambi gli scaffold **1b** e **1c** sono stati funzionalizzati nello stesso modo di **1a**, con gli stessi gruppi funzionali (Glu, Arg, AA_{TACN}) ottenendo in tutto 6 prodotti addizionali. I prodotti ottenuti hanno un grado di purezza variabile dal 50 all'80%, inferiore a quello ottenuto con lo scaffold **1a** ma comunque molto soddisfacente. Tutti i prodotti sono stati precipitati con etere etilico e, quando necessario, purificati con HPLC in fase inversa (colonna C18), e caratterizzati con analisi di massa e ¹H NMR in metanolo deuterato. Sotto è riportato lo spettro ¹H NMR del composto **1a-(Asp-AA_{TACN})₃**, precipitato da etere etilico senza ulteriori purificazioni. Si notano tutti i segnali protonici del composto e la presenza del tripletto a 1.14 ppm, appartenente al metile dello scaffold **1a**, dà una chiara indicazione dell'elevata simmetria del composto studiato.

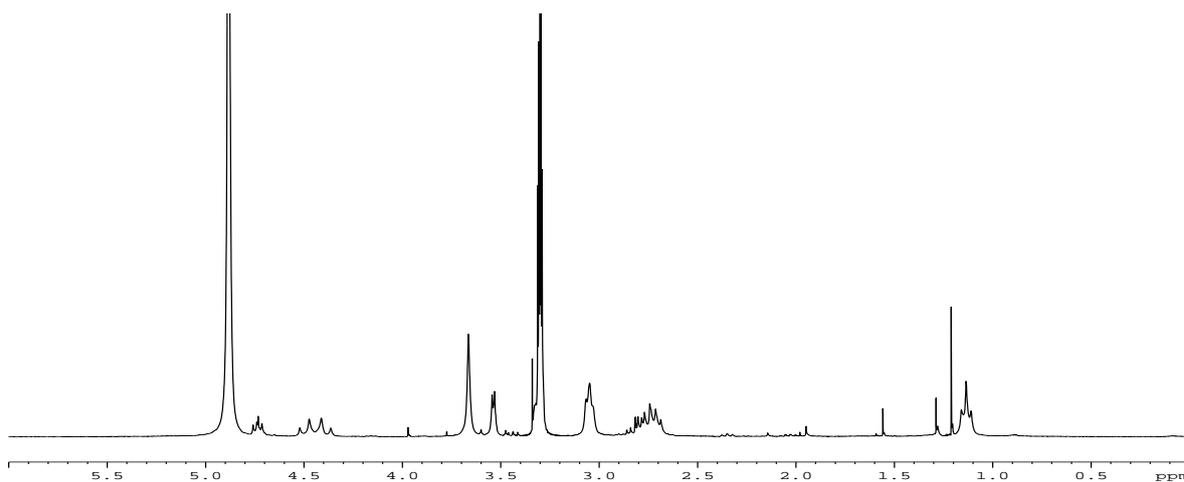


Figura 2. Spettro ^1H NMR del composto **1a-(Asp-AA_{TACN})₃** in CD_3OD .

In conclusione la nuova metodologia descritta permette la facile funzionalizzazione di molecole scaffold su fase solida. Essa non richiede la (parziale) protezione dello scaffold prima di utilizzarlo e nemmeno la presenza di un gruppo funzionale aggiuntivo (come nelle strutture del tipo AB_3) per legare la piattaforma alla resina, mentre la simmetria dello scaffold è mantenuta nel prodotto finale.

2.1 Miglioramento della procedura sintetica²

La strategia sintetica sopra descritta permette la sintesi e funzionalizzazione, su fase solida, di scaffold multivalenti dotati di simmetria C_3 . Essa però assieme ad indubbi vantaggi presenta anche dei problemi. I vantaggi sono la semplicità e la versatilità con cui è possibile funzionalizzare ogni scaffold molecolare, senza l'uso di gruppi protettori. D'altra parte si possono identificare le seguenti limitazioni e problematiche:

- Sintesi di scaffold molecolari eterofunzionalizzati.

Sebbene le strutture dotate di simmetria C_3 trovino attualmente un forte interesse nel campo del riconoscimento e della catalisi, per una serie di applicazioni è essenziale la possibilità di differenziare i vari gruppi funzionali. Per venire incontro a queste necessità la strategia sintetica è stata modificata in modo da poter inserire un differente gruppo funzionale nello scaffold molecolare **1**, sempre senza utilizzare alcun gruppo protettore per le ammine dello scaffold **1**.

- Posizione del residuo -Asp

Nella procedura originale, il residuo Asp agisce come uno spacer tra lo scaffold e il gruppo funzionale desiderato. Questo può diventare un problema, in special modo nel caso in cui possa ostacolare l'effetto sinergico tra i vari gruppi funzionali (come ad esempio nella catalisi biomimetica). La procedura è stata modificata, in modo da poter scegliere la posizione dove inserire il residuo Asp, realizzando la possibilità di connettere direttamente lo scaffold molecolare ai gruppi funzionali.

- Ottimizzazione della resa

La procedura originale precedentemente riportata, in alcuni casi è gravata dalla formazione di una significativa quantità di prodotti secondari (in alcuni casi superiore al 20-30%). Questo si verifica in particolar modo quando si utilizzano gli scaffold **1b** e **1c**. Abbiamo osservato che la formazione di questi prodotti secondari, può essere completamente soppressa sostituendo la resina di Wang con una resina di Merrifield-DHPP.

2.1.1 Sintesi di scaffold molecolari eterofunzionalizzati

Nella procedura sintetica riportata nel primo paragrafo, è stato dimostrato che l'aggiunta di uno scaffold molecolare **1a** alla resina Mmt-Asp(OWang)-OH porta alla formazione di tre prodotti **1a**-(Asp(Owang)-Mmt)_x (con x= 1-3) sulla resina. Infatti, dallo sblocco del prodotto dalla resina si ottengono i composti **1a**-(Asp-NH₂)_x (dove x= 1-3) in rapporto, rispettivamente, 48:38:17 come evidenziato dallo spettro HPLC. Questi risultati non sono in accordo con lo studio di Anslyn³, che aveva riportato un protocollo sintetico nel quale si osservava esclusivamente il mono-coupling dell'identico scaffold **1a**. E' stato ipotizzato che questa differenza potesse essere correlata alla lunghezza dello spacer che collega lo scaffold alla resina. Per verificare questa ipotesi è stato condotto uno studio aumentando la distanza tra la resina e il residuo aspartico, inserendo un residuo di glicina o un dimero GlyPro, mantenendo un costante loading della resina di 0.44 mmol/g. E' stato osservato che è sufficiente l'inserimento di un solo residuo di Gly, come spacer, per ottenere il quantitativo mono-coupling dello scaffold molecolare **1a** alla resina. Infatti, lo sblocco del prodotto dalla resina dopo l'aggiunta dello scaffold permette di ottenere esclusivamente il composto **1a**(Asp(Gly-OH)-NH₂), come è evidenziato dall'analisi HPLC-MS. In analogia, l'utilizzo del dimero GlyPro come spacer, ha permesso di osservare esclusivamente la formazione del prodotto **1a**(Asp(ProGly-OH)-NH₂).

Questi risultati possono essere razionalizzati pensando al secondo coupling tra lo scaffold e la resina come ad una reazione intramolecolare che porta alla formazione di un ciclo (dove la resina costituisce parte del ciclo). Studi di reazioni di ciclizzazione intramolecolare⁴ hanno effettivamente dimostrato che questo tipo di reazioni sono inversamente legate alle dimensioni dell'anello. Di fatto aumentando le dimensioni dell'anello, ad esempio inserendo come spacer una Gly o un dimero GlyPro, le reazioni intramolecolari risultano sfavorite e, conseguentemente, diminuisce la possibilità di trovare lo scaffold molecolare legato alla resina con un doppio o triplo coupling. La possibilità di legare lo scaffold **1a** utilizzando esclusivamente una delle tre ammine è particolarmente importante perchè permette di funzionalizzare una estremità dello scaffold in modo diverso rispetto alle altre 2 (vedi paragrafo successivo). I siti che possono essere funzionalizzati selettivamente sono indicati nella figura 3(b) con un quadrato e un cerchio rispettivamente. E' importante notare che non è richiesta la preventiva protezione di ogni ammina dello scaffold **1a**.

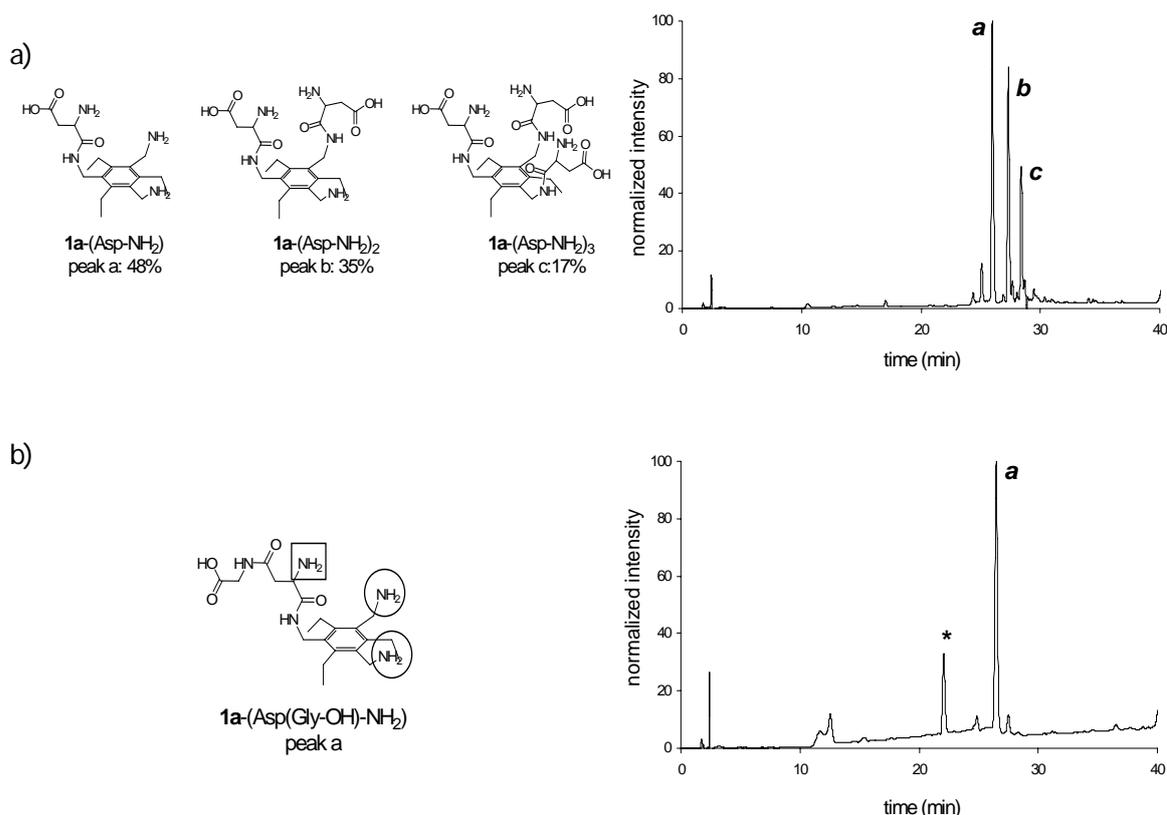


Figura 3. (a) I tre prodotti formati dopo l'aggiunta dello scaffold **1a** alla resina Mmt-Asp(O⁺Wang)-OH e (b) i prodotti formati dopo l'aggiunta di **1a** alla resina Mmt-Asp(Gly-O⁺Wang)-OH. Gli spettri HPLC dimostrano la composizione del crudo di reazione dopo lo sblocco dalla resina. I picchi sono stati assegnati utilizzando l'ESI-MS. Il picco segnato con un asterisco è una impurezza a basso peso molecolare, strutturalmente non correlata allo scaffold molecolare.

2.1.2 La posizione del residuo Asp

Un'ovvia conseguenza dell'approccio sintetico descritto è che impone la presenza di uno o più residui di acido aspartico nel composto finale, come spacer posizionato tra lo scaffold **1** e il gruppo funzionale **FG**. Questa situazione potrebbe non essere quella ideale, in particolar modo nel caso in cui si voglia massimizzare una interazione sinergica tra i vari gruppi funzionali. In questi casi, come è evidenziato da una serie di studi precedentemente riportati, dovrebbe essere evitato l'inserimento dello spacer. Per questo motivo è stata sviluppata una procedura sintetica che permette di controllare la posizione del residuo Asp. Questa strategia sfrutta, nella prima parte, la sintesi su resina dall'N al C terminale⁵. Come primo step, il gruppo protettore OAll dell'acido aspartico legato alla resina viene rimosso in condizioni riducenti standard, e il risultante acido carbossilico viene attivato con PyBOP. Successivamente un residuo di His, protetta in C terminale con OAll (H₂N-His(Boc)-OAll), viene legato sfruttando il gruppo amminico libero. Dopo la seguente deprotezione del gruppo OAll sull'His e attivazione dell'acido carbossilico, è stato aggiunto lo scaffold molecolare **1a**. Successivamente, lo scaffold **1a** è stato simmetrizzato in due cicli, utilizzando rispettivamente His e Asp, con una sintesi su fase solida, con chimica Fmoc, procedendo dal C all'N terminale. A questo punto, in una piccola quantità di resina sono stati rimossi entrambi i gruppi protettori Fmoc e Mmt, e una volta acetilate le ammine terminali, il prodotto è stato staccato dalla resina. Lo spettro HPLC della miscela di sblocco dimostra chiaramente la formazione del composto **1a**-(HisAsp-NHAc)₃ dotato di simmetria C₃, come è confermato dall'analisi ESI-MS.

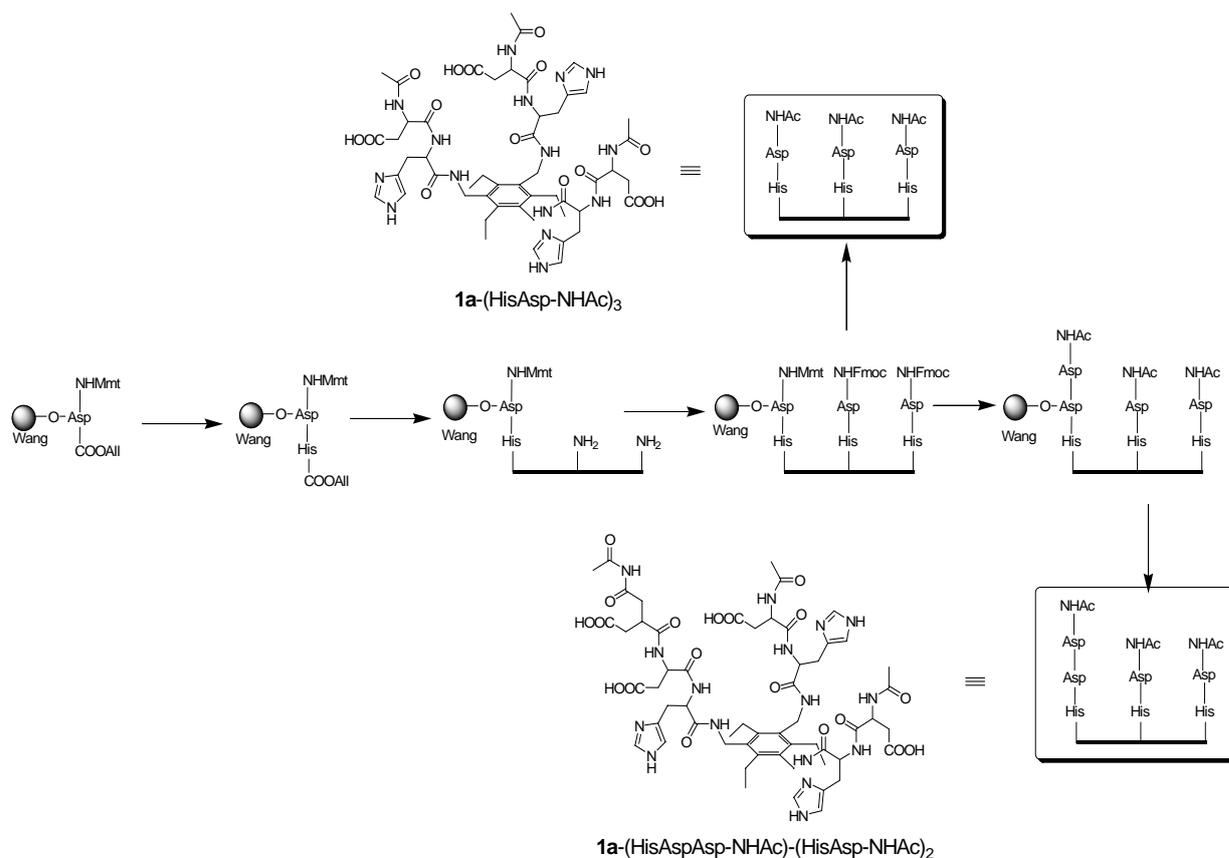


Figura 4. Protocollo di sintesi per controllare la posizione dell'acido aspartico.

La simmetrizzazione dello scaffold ha permesso di ottenere su resina il composto **1a**-(HisAsp-NHMmt)(HisAsp-NHFmoc)₂. È facile notare che l'acido Asp legato alla resina ha l'ammina protetta dal gruppo Mmt, mentre gli altri due residui Asp hanno il gruppo protettore Fmoc. Come precedentemente discusso, questi due gruppi protettori ortogonali possono essere utilizzati per funzionalizzare selettivamente una estremità dello scaffold tripodale, rispetto alle altre due. Questo è stato dimostrato rimuovendo il gruppo Mmt in condizioni debolmente acide e legando un nuovo residuo Asp. Lo sblocco del prodotto dalla resina, dopo l'acetilazione di tutte le ammine terminali, evidenzia il composto **1a**-(HisAspAsp-NHAc)(HisAsp-NHAc)₂ con buona resa e purezza, come è possibile notare dallo spettro HPLC del crudo di reazione.

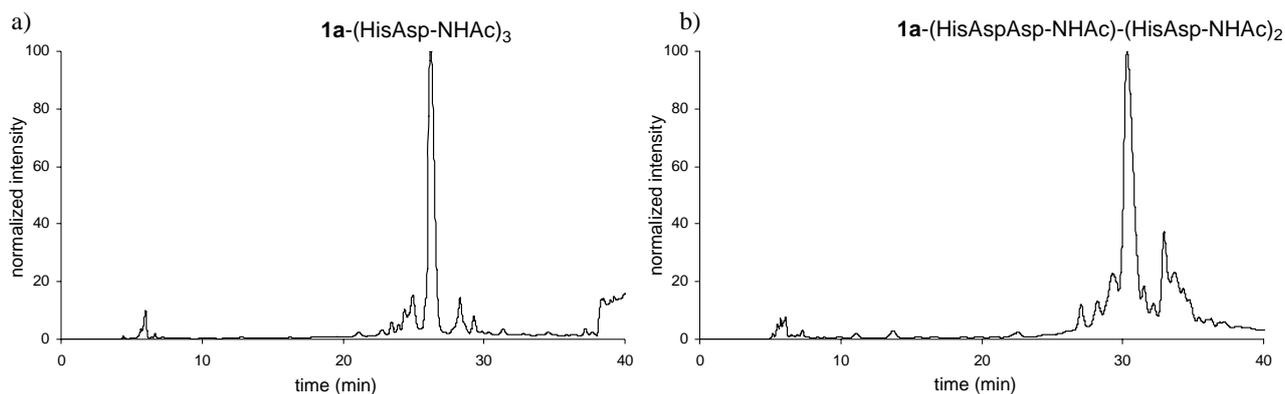


Figura 5. (a) Spettro HPLC del composto **1a**-(HisAsp-NHAc)₃ ottenuto dalla miscela del crudo di reazione. (b) Spettro HPLC del composto **1a**-(HisAspAsp-NHAc)-(HisAsp-NHAc)₂ ottenuto dalla miscela del crudo di reazione.

2.1.3 Ottimizzazione della resa

Come precedentemente discusso, in alcuni casi, utilizzando la procedura sintetica originale, i prodotti sono ottenuti con rese non quantitative (minori del 50%), in particolar modo quando vengono utilizzati degli scaffold flessibili (es. **1b**, Tren; **1c**, Tacn). Gli spettri HPLC dopo lo sblocco dalla resina dimostrano una significativa quantità di prodotti secondari, con masse corrispondenti al prodotto desiderato meno 18 e 36 uma, legate alla perdita di una o due molecole di H₂O. Nei prodotti secondari non è mai stata evidenziata la presenza del composto originale meno uno o più residui, dimostrando che gli step di simmetrizzazione e funzionalizzazione degli scaffold hanno rese quantitative. Studiando le caratteristiche masse dei prodotti secondari, è stato ipotizzato che la formazione di questi composti indesiderati fosse il risultato di reazioni intramolecolari che coinvolgono i legami esterei che connettono i residui Asp alla resina. I candidati per questo attacco nucleofilo possono essere i gruppi amminici terminali (dopo la deprotezione del gruppo Fmoc) o gli azoti amidici, che possono formare, rispettivamente, una dichetopiperazina o un'aspartimmide, entrambi ben conosciuti come prodotti secondari nella sintesi peptidica su fase solida. Considerando il fatto che la formazione di prodotti secondari è stata osservata anche quando lo scaffold è stato funzionalizzato con il TACN deprotezionato con il BOC (il quale essendo rimosso solo durante lo sblocco del prodotto finale dalla resina, garantisce che durante la sintesi non siano mai presenti i gruppi amminici terminali liberi) è stato possibile definire che la formazione dei prodotti secondari è il risultato della formazione dell'aspartimmide. Solo questa ipotesi è compatibile con la formazione di prodotti

dove vengono incorporati tutti gli amminoacidi, ma con la perdita di una o due molecole di acqua. Sono state osservate al massimo due ciclizzazioni intramolecolari, mentre lo scaffold è connesso alla resina con uno, due o tre legami esterei. Una eventuale terza ciclizzazione porterebbe alla completa rimozione del prodotto dalla resina, che verrebbe quindi perso negli step di lavaggio. In aggiunta, la forte dipendenza tra la formazione di prodotti secondari e il tipo di scaffold, ci permette di concludere che la ciclizzazione non avviene all'interno di una stessa sequenza legata allo scaffold. In questo caso, infatti, la formazione dei prodotti secondari dovrebbe essere indipendente dal tipo di scaffold utilizzato. Nella figura 6 sono riportate le reazioni di ciclizzazione proposte per ottenere i prodotti **2** e **3**, utilizzando come esempio la sintesi del composto **1b**(AspGlu-NH₂)₃⁶. I composti **2** e **3** sono dei prodotti particolarmente interessanti, in seguito alla loro natura (bi)ciclica (ad esempio come recettori molecolari). Tuttavia poichè questo studio era focalizzato allo sviluppo di una metodologia sintetica per controllare la funzionalizzazione di scaffold tripodali, i composti **2** e **3** non sono stati studiati in dettaglio, ma considerati per sviluppare una procedura sintetica che minimizzasse la loro formazione.

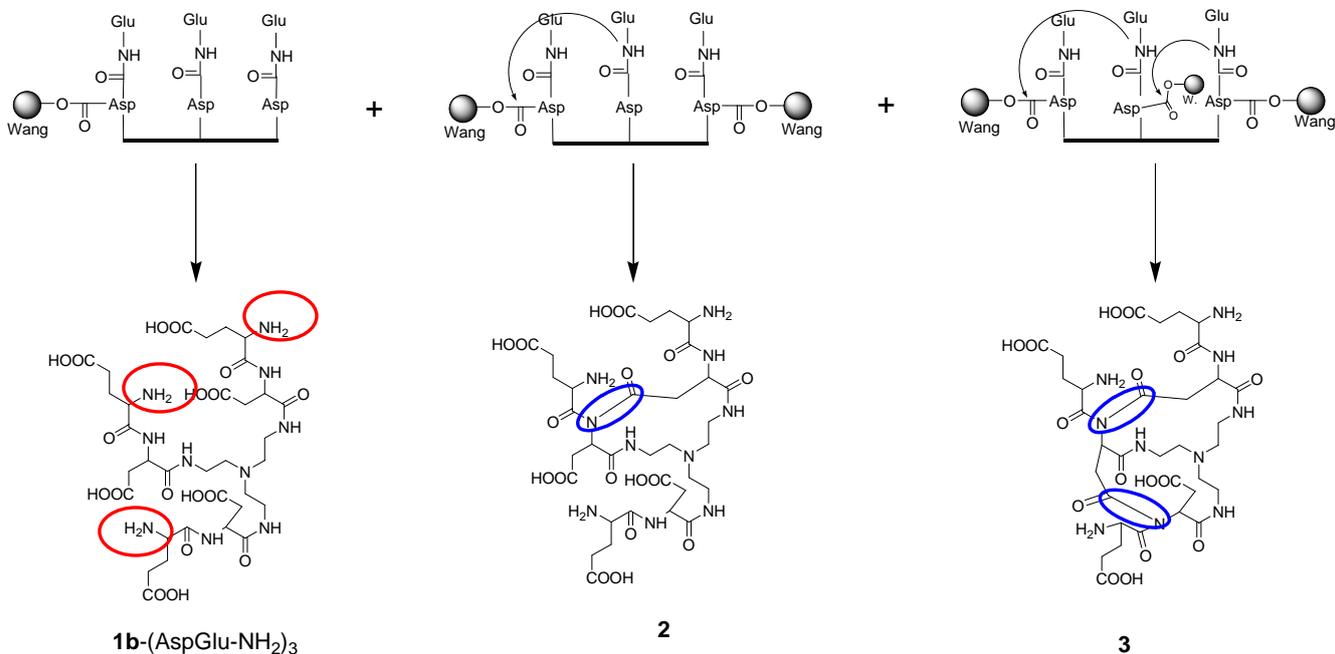


Figura 6. Ciclizzazioni intramolecolari, proposte per la formazione di prodotti secondari **2** e **3** durante la sintesi di **1b**-(AspGlu-NH₂)₃. Per chiarezza i gruppi amminici terminali di **1b**-(AspGlu-NH₂)₃ sono indicati con un cerchio rosso, mentre i riquadri blu nelle strutture **2** e **3** indicano la formazione di legami nelle reazioni di ciclizzazione intramolecolare.

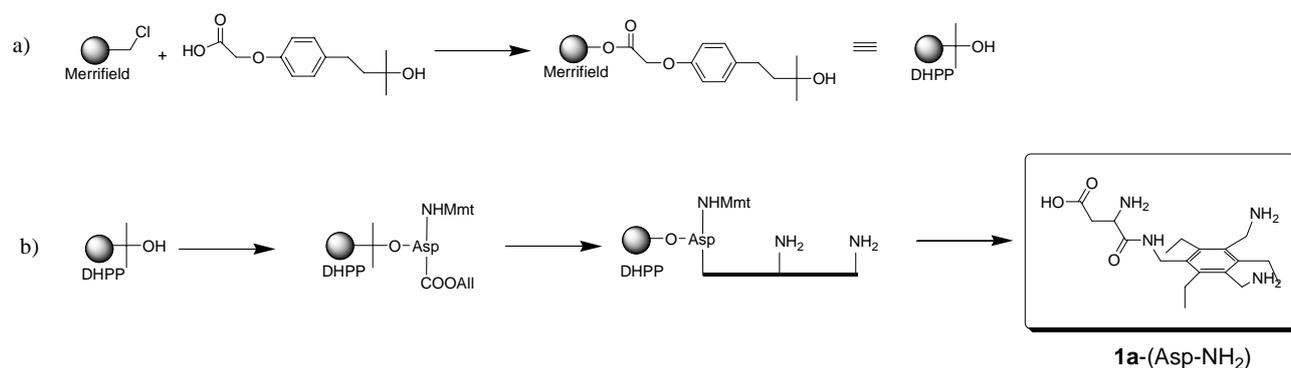


Figura 7. (a) Preparazione della resina -DHPP attraverso il coupling dell'acido 4(1',1'-dimetil-1'-idrossipropil)fenossiacetile con la resina di Merrifield. (b) Sintesi del composto **1a**-(Asp-NH₂) con la resina-DHPP.

Partendo dall'osservazione che la formazione dei prodotti secondari coinvolge un attacco nucleofilo al benzil estere che connette l'Asp alla resina, è ragionevole pensare che l'utilizzo di un estere meno sensibile ad un attacco nucleofilo possa aumentare la resa. Per questo motivo è stato deciso di utilizzare il DHPP (4(1',1'-dimetil-1'-idrossipropil)fenossiacetile) come linker legato alla resina, al quale potrà poi essere attaccato il residuo Asp con la formazione di un terzbutil estere⁷. Generalmente, il linker DHPP è connesso alla resina Merrifield attraverso la formazione di un benzil estere (resistente al trattamento con TFA) ed espone un terzbutil alcool per la successiva funzionalizzazione (Figura 7a). L'attacco dell'Asp al DHPP richiede delle condizioni di reazione "più spinte" rispetto alle condizioni utilizzate con la resina di Wang: lo Fmoc-Asp(OH)-OAll è stato quindi convertito nel fluoruro acilico, con cianuril fluoruro, e fatto reagire con la resina-DHPP per una notte in presenza di DIEA⁸. Per verificare il protocollo sintetico con la resina DHPP, in primo luogo è stato legato lo scaffold **1a** utilizzando la stessa procedura descritta in precedenza (Figura 7b). Lo spettro HPLC dello sblocco del prodotto dalla resina rivela la formazione esclusiva del mono-addotto **1a**-(Asp-NH₂) (Figura 8a). Questo risultato dimostra che l'utilizzo del linker DHPP ha il vantaggio aggiuntivo di sopprimere la formazione dello scaffold di- e tri- connesso alla resina (mantenendo un loading della resina simile: 0.44 mmol/g per la resina Wang e 0.32 mmol/g per la resina DHPP). In secondo luogo è stata ripetuta la sintesi di **1c**-(Asp-Arg)₃, per verificare se l'utilizzo della resina-DHPP sopprime la formazione dei prodotti secondari. La sintesi di questo composto con la resina di Wang dava una resa modesta del 70% basata nell'analisi HPLC, dove i prodotti secondari erano caratterizzati da una differenza di massa di -18 uma rispetto al prodotto atteso⁴.

Con la resina DHPP, tuttavia, lo stesso composto è stato ottenuto con un forte incremento della purezza, com'è evidenziato dallo spettro HPLC ottenuto dopo lo sblocco dalla resina (Figura 8b).

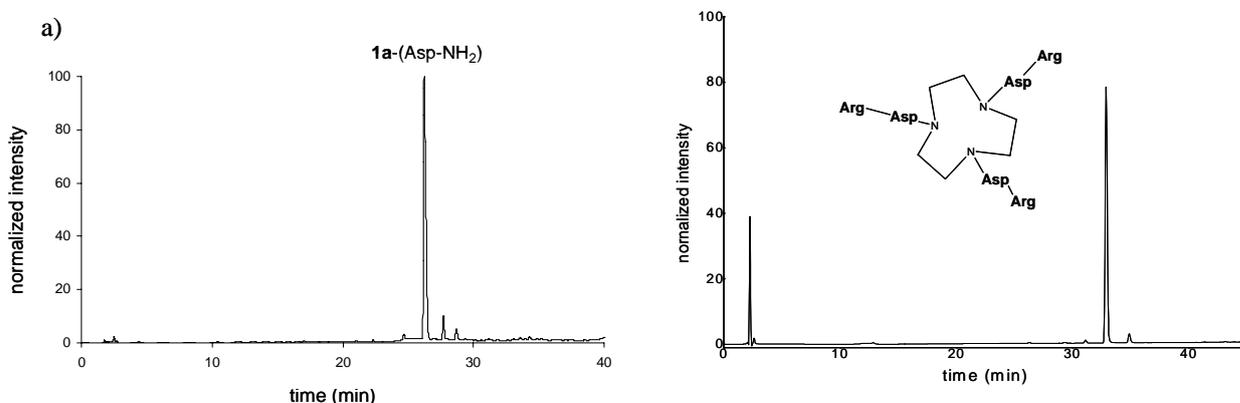


Figura 8. (a) Spettro HPLC di **1a**-(Asp-NH₂) e (b) **1c**-(Asp-Arg)₃ dopo lo sblocco dalla resina-DHPP.

2.2 Conclusioni

In questo capitolo è stata presentata una procedura sintetica per la funzionalizzazione di scaffold molecolari tripodali su fase solida. La struttura generale del tipo di molecole accessibili, utilizzando l'approccio sintetico descritto, è riassunta nella figura 9. La modificazione del supporto solido utilizzato determina il tipo di gruppo funzionale presente all'estremità terminale: un gruppo carbossilico, un'ammide o un'ammina. Un primo frammento peptidico può essere inserito prima del punto di ramificazione con la semplice chimica Fmoc, mentre la crescita del peptide dopo il sito di ramificazione avviene nella direzione opposta, dall'N al C-terminale. Successivamente può essere legato, esclusivamente in una sola posizione, qualsiasi scaffold, dotato di simmetria C₃ e contenente gruppi NH₂ terminali. In questo modo si ha il vantaggio di poter, in seguito, funzionalizzare le altre due posizioni dello scaffold con altre due funzionalità differenti. Alternativamente potrà essere preparato uno scaffold tripodale con simmetria C₃, inserendo la stessa sequenza peptidica, il sito di ramificazione e il gruppo funzionale, sulle due posizioni rimanenti. Questo schema illustra la versatilità della metodologia, mettendo ben in evidenza il fatto che non ci sono restrizioni nella scelta dei vari componenti, inclusa la piattaforma. Gli studi svolti hanno messo in evidenza come il coupling dello scaffold tripodale con la resina possa causare diverse reazioni non desiderate, come la formazione di poliaddotti, reazioni di ciclizzazione intramolecolare ecc. L'aver provato che il grado di purezza del prodotto

finale è fortemente determinato dalla scelta della resina e del linker tra il sito di ramificazione e il supporto solido costituisce un contributo significativo alla sintesi di queste molecole.

La procedura sintetica descritta costituisce un passo in avanti nella preparazione di molecole tripodali polifunzionali e permette di sintetizzare con estrema versatilità sistemi per applicazioni nel campo del (bio)riconoscimento e della catalisi.

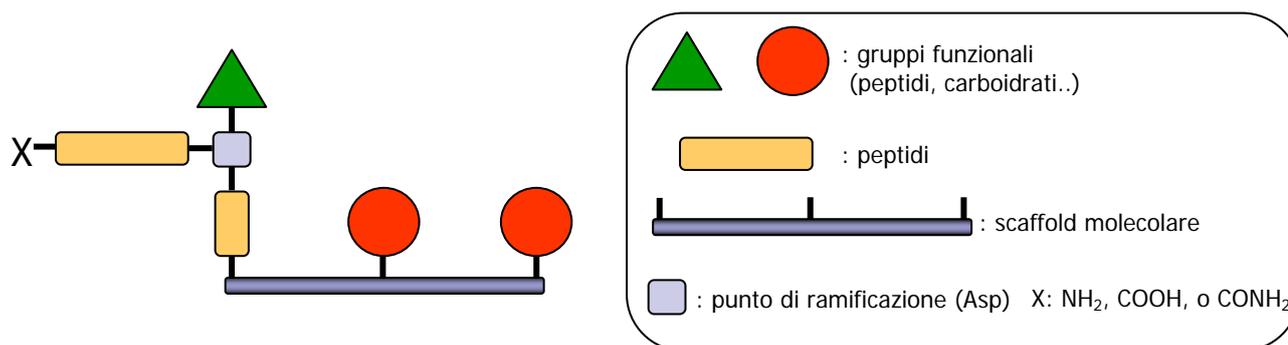


Figura 9. Rappresentazione schematica della struttura generale accessibile con la procedura sintetica descritta.

Parte sperimentale

2.3 Materiali e strumentazione

I solventi e i prodotti commerciali sono stati generalmente usati e tal quali, senza ulteriori purificazioni.

Gli spettri ¹H NMR sono stati registrati con uno spettrometro Bruker AC-250, operante a 250.18 MHz e Bruker AV-300 a 300.13 MHz alla temperatura di 301 K.

Gli spettri HPLC sono stati ottenuti utilizzando un sistema a due pompe Shimadzu LC-10AT e un detector Shimadzu SPD-10A UV-Vis.

Gli spettri ESI-massa sono stati ottenuti con uno spettrometro Perspective Biosystem Mariner equipaggiato con un analizzatore TOF.

2.4 Procedure sintetiche generali

Nella sintesi come supporti solidi sono state utilizzate resine commerciali con un loading di 0.93 mmol/g (per la resina di Wang: p-Benzilossibenzil alcool) e 1.1 mmol/g (Merrifield: Clorometilstirene-divinilbenzene). Nella sintesi su fase solida è

stato utilizzato il protocollo standard per la sintesi peptidica con la chimica Fmoc (utilizzando HBTU/HOBT o PyBOP come attivatori ed in presenza di una base terziaria quale DIPEA) e le specifiche procedure riportate sotto. Il linker DHPP è stato sintetizzato seguendo la procedura presente in letteratura.

Attacco dello Fmoc-Asp(OH)-OAll alla resina di Wang

Lo Fmoc-Asp(OH)-OAll (6 equiv) è stato legato alla resina di Wang (100 mg, 0.093 mmol di gruppi ossidrilici terminali) attivando la funzione carbossilica, nella catena laterale, con DIC (N,N-diisopropilcarbodimmide, 6 equiv) in presenza di DMAP (N,N-dimetilamminopiridina, 0.2 equiv) in DMF con seguente acetilazione delle estremità ossidriliche, sulla resina, che non avevano reagito.

Sostituzione del gruppo protettore Fmoc con Mmt (nella resina di Wang e DHPP)

Il gruppo Fmoc del residuo Fmoc-Asp(OWang)-OAll o Fmoc-Asp(ODHPP)-OAll è stato rimosso trattando la resina con una soluzione al 20 % di piperidine in NMP (2×10 min). Dopo il lavaggio con DMF (2×) e CH₂Cl₂ (2×), è stato aggiunto 4-metossitrifetilclorometano (Mmt-Cl, 6 equiv.) e N,N-diisopropilettilammina (DIEA, 15 equiv) in CH₂Cl₂ e la miscela è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore.

Rimozione del gruppo allile e attivazione

Il gruppo allile è stato rimosso in condizioni riducenti, come riportato in letteratura. Sono stati aggiunti Tetrakis(trifenilfosfina) palladio(0) (0.2 equiv.) e fenilsilano (15 equiv.) in CH₂Cl₂ e la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione per 2 ore in atmosfera inerte (in flusso di N₂). Dopo alcuni step di lavaggio (CH₂Cl₂, 2×), NMP/DIEA = 4/1 (2× 20 min), NMP (2×) and CH₂Cl₂ (2×), l'acido carbossilico deprotetto è stato attivato con PyBOP (5 equiv.) e N-metilmorfolina (10 equiv.) in DMF/CH₂Cl₂ = 1/1 per 1 ora.

Rimozione del gruppo protettore -Mmt (nella resina di Wang e DHPP)

La resina è stata lavata con CH₂Cl₂ (3×) e trattata con una miscela di acido acetico:trifluoroetanolo:CH₂Cl₂ = 1:2:6 per 1 ora a temperatura ambiente e successivamente è stata lavata con CH₂Cl₂ (3×).

Attacco del linker DHPP alla resina di Merrifield

Il linker DHPP (4(1',1'-diidrossipropilhydroxypropyl)fenossiacetile) (4 equiv.) è stato sciolto in una miscela di EtOH (2 ml/mmol) e acqua (0.5 ml/mmol), successivamente il pH è stato portato a 7 aggiungendo Cs₂CO₃. Il solvente è stato rimosso per evaporazione e dopo successiva aggiunta di diossano la soluzione è stata liofilizzata. Il sale di Cs⁺ del DHPP è stato aggiunto ad una sospensione della resina di Merrifield (0.055 mmol di gruppi funzionali terminali) in DMF per 12 ore a 50 °C in presenza di KI (0.1 equiv) come catalizzatore. In seguito, la resina è stata lavata con MeOH/DMF/DIEA (1:1:0.1) (4×), 20% di piperidina in DMF (2×10 min), DMF (2×), MeOH (2×) e seccata sotto vuoto.

Attacco del residuo Fmoc-Asp(F)-OAll alla resina DHPP

Il residuo Fmoc-Asp(F)-OAll (5 equiv) è stato aggiunto alla resina DHPP, in DMF in presenza di DIEA (15 equiv.) e la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione per una notte a temperatura ambiente.

2.5 Sintesi e Caratterizzazione

1a-(Asp-Glu-NH₂)₃. Dopo precipitazione da dietilere, sono stati ottenuti 20 mg di prodotto solido incolore con una resa del 91%. HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 3 al 30% in 30 min, detector UV a 226 nm): 31.4 min (>95%). ¹H NMR (CD₃OD, 250 MHz) δ (ppm): 4.71 (t, J=5.8 Hz, 3H), 4.45 (s, 6H), 3.95 (t, J=6.4 Hz, 3H), 2.75 (q, J=7.3 Hz, 6H), 2.51 (t, J=8.0 Hz, 6H), 2.2– 2.0 (m, 12H), 1.15 (t, J=7.3 Hz, 9H); ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 982.4291; trovata sperimentalmente: 982.4308.

1a-(Asp-Arg-NH₂)₃. Dopo precipitazione da dietilere, sono stati ottenuti 19 mg di prodotto solido giallo opaco con una resa dell'80%. HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 3 al 30% in 30 min, detector UV a 226 nm): 19.9 min (88%). ¹H NMR (CD₃OD, 250 MHz) δ (ppm): 4.71 (t, J=5.8 Hz, 3H), 4.43 (s, 6H), 4.00 (t, J=6.4 Hz, 3H), 3.25 (t, J=6.4 Hz, 6H), 2.8–2.6 (m, 12H), 2.1–1.9 (m, 6H), 1.8–1.6 (m, 6H), 1.15 (t, J=7.3 Hz, 9H); ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 1063.6047; misurata sperimentalmente: 1063.6095.

1a-(Asp-AA_{TACN})₃. Dopo precipitazione da dietilere, sono stati ottenuti 18 mg di prodotto solido giallino con una resa del 75%. HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 3 al 30% in 30 min, detector UV a 226 nm): 19.8 min (83%). ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ (ppm): 4.74 (t, J=6.0 Hz, 3H), 4.47 (m, 6H), 3.66 (br s, 12H), 3.53 (d, J=3.7 Hz, 6H), 3.34 (br s, 12H), 3.05 (br s, 12H), 2.8–2.6 (m, 12H), 1.14 (t, J=7.3 Hz, 9H); ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 1102.6659; trovata sperimentalmente: 1102.6691.

1b-(Asp-Glu-NH₂)₃. Sono stati ottenuti 12 mg di olio giallino con una resa del 57% dopo purificazione con RP-HPLC. HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 3 al 30% in 30 min, detector UV a 226 nm): 13.8 min (100%). ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ (ppm): 4.72 (t, J=6.0 Hz, 3H), 4.01 (t, J=6.3 Hz, 3H), 3.61 (br s, 6H), 3.46 (br s, 6H), 3.0–2.8 (m, 6H), 2.54 (t, J=6.6 Hz, 6H), 2.2–2.1 (m, 6H); ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 879.3618; trovata sperimentalmente: 879.3598.

1b-(Asp-Arg-NH₂)₃. Sono stati ottenuti 10 mg di olio incolore con una resa del 45% dopo purificazione con RP-HPLC. HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dall'8 al 30% in 25 min, detector UV a 226 nm): 24.2 min (100%). ¹H NMR (CD₃OD, 250 MHz) δ (ppm): 4.78 (t, J=5.8 Hz, 3H), 4.00 (t, J=6.4 Hz, 3H), 3.6–3.4 (m, 12H), 3.25 (t, J=6.4 Hz, 6H), 2.9–2.7 (m, 6H), 2.0–1.9 (m, 6H), 1.8–1.7 (m, 6H); ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 960.5373; trovata sperimentalmente: 960.5401.

1b-(Asp-AA_{TACN})₃. Sono stati ottenuti 10 mg di olio incolore, che solidifica a temperatura ambiente, con una resa del 45% dopo purificazione con RP-HPLC. HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dall'8 al 30% in 30 min, detector UV a 226 nm): 21.6 min (100%). ¹H NMR (CD₃OD, 250 MHz) δ (ppm): 4.81 (t, J=5.8 Hz, 3H), 3.67 (br s, 12H), 3.6–3.4 (m, 18H), 3.3 (br s, 12H), 3.1 (br s, 12H), 2.9–2.8 (m, 6H); ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 999.5985; trovata sperimentalmente: 999.6009.

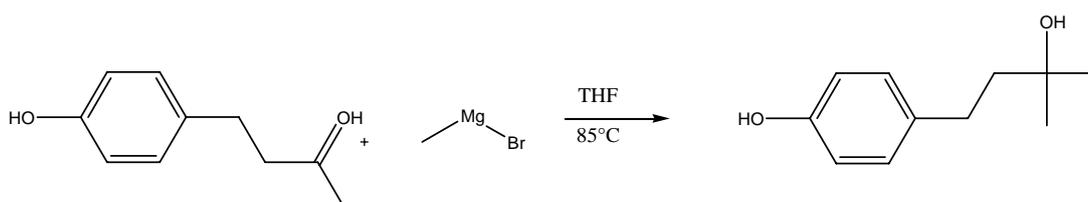
1c-(Asp-Glu-NH₂)₃. Sono stati isolati 13 mg di prodotto solido incolore, con una resa del 66% dopo purificazione con RP-HPLC. HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 3 al 30% in 30 min, detector UV

a 226 nm): 10.9 min (100%). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 250 MHz) δ (ppm): 4.72 (t, $J=5.8$ Hz, 3H), 4.01 (t, $J=6.4$ Hz, 3H), 3.8–3.4 (m, 12H), 2.9–2.8 (m, 6H), 2.54 (t, $J=7.0$ Hz, 6H), 2.2–2.0 (m, 6H); ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ teorica: 862.3352; trovata sperimentalmente: 862.3398.

1c-(Asp-Arg-NH₂)₃. Sono stati isolati 18 mg di prodotto solido giallo opaco, con una resa del 70% dopo purificazione con RP-HPLC. HPLC (Jupiter Proteo 90 Å, 4 μm ; gradiente: $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (0.1%)– $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ (0.1%) dal 5 al 25% in 30 min, detector UV a 226 nm): 13.1 min (100%). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 250 MHz) δ (ppm): 5.01 (t, $J=5.8$ Hz, 3H), 3.95 (t, $J=6.4$ Hz, 3H), 3.8–3.4 (m, 12H), 3.25 (t, $J=6.4$ Hz, 6H), 3.0–2.8 (m, 6H), 2.1–2.0 (m, 6H), 1.8–1.7 (m, 6H); ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ teorica: 942.5108; trovata sperimentalmente: 942.5196.

1c-(Asp-AA_{TACN})₃. Sono stati isolati 16 mg di prodotto solido icolore, con una resa del 72% dopo purificazione con RP-HPLC. HPLC (Jupiter Proteo 90 Å, 4 μm ; gradiente: $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (0.1%)– $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ (0.1%) dal 10 al 30% in 30 min, detector UV a 226 nm): 9.3 min (100%). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 250 MHz) δ (ppm): 5.09 (t, $J=5.8$ Hz, 3H), 3.8–3.5 (m, 30H), 3.3 (br s, 12H), 3.1 (br s, 12H), 2.7–2.6 (m, 6H); ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ teorica: 982.5720, trovata sperimentalmente: 982.5801.

Sintesi del 4-(4-idrossifenil)-2-metil-2-butanolo

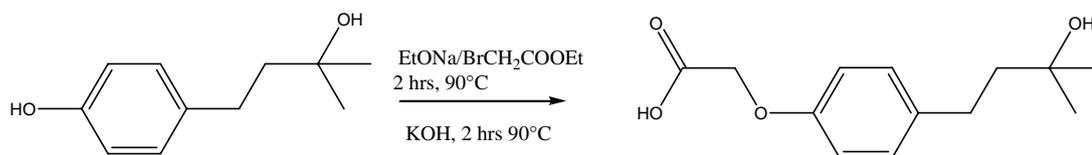


In un pallone da 250 ml contenente 43 ml di una soluzione 3 M di CH_3MgBr in THF (582.3 mmoli), viene aggiunta in 25 minuti, a 50°C , sotto N_2 , una soluzione di 5g (30.4mmoli) di 4-(4-idrossifenil)-2-butanone sciolti in 40 ml di THF. La reazione viene fatta proseguire sotto agitazione, a riflusso (85°C) in atmosfera di N_2 per 1.5 ore. Una volta terminata la reazione, la soluzione viene filtrata su beuta da vuoto, munita di filtro in vetro (porosità 3). Il solvente viene eliminato in evaporatore rotante, si ridiscioglie il prodotto in una miscela di etanolo ed acqua e si lascia cristallizzare. Il solvente viene evaporato in evaporatore rotante e seccato in pompa

da vuoto meccanica. Resa: 93 %.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz in CDCl_3) δ ppm: 1.28 (s, 6H), 1.75 (q, 2H), 2.62 (q, 2H), 6.78 (d, 2H), 7.02 (d, 2H).

Sintesi del linker DHPP: Acido 4-(3¹-idrossi-3¹-metilbutil) fenossiacetico



Sono state preparate due soluzioni, una di sodio etossido, sciogliendo 381 mg di sodio metallico (16.6 mmoli) in 10 ml di etanolo assoluto, e la seconda aggiungendo a 1,52 ml di metil-bromoacetato (16.6 mmoli) 20 ml di etanolo assoluto.

In un pallone da 250 ml vengono sciolti 1.5 g (8.32 mmoli) di 4-(4-idrossifenil)-2-metil-2-butanolo, in 20 ml di etanolo, la soluzione viene scaldata a 90°C e, in 30 minuti, vengono aggiunte contemporaneamente le due soluzioni precedentemente preparate. La miscela di reazione viene poi portata a riflusso (90°C) per 2 ore. Alla fine la soluzione viene lasciata raffreddare e dopo avere aggiunto 10 ml di etere etilico viene estratta (3×) con una soluzione di NaCl satura. Il solvente è stato evaporato all'evaporatore rotante. Il grezzo di reazione viene sciolto in etanolo assoluto e vengono aggiunti 891.5 mg (15.9 mmoli) di KOH in 3 ml di H_2O . La miscela è stata quindi lasciata a riflusso per 2 ore e 15 minuti, alla temperatura di 90°C, sotto agitazione.

Al termine il solvente è stato rimosso, vengono aggiunti 20 ml e viene estratto in acetato di etile (3×). La soluzione acquosa viene portata a pH 1 con l'aggiunta di HCl 1M e il prodotto viene estratto in acetato di etile (2×), le fasi organiche riunite vengono anidificate su Na_2SO_4 ed il solvente viene rimosso sotto vuoto. Resa: 96%.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz MeOD) δ ppm: 1.91 (s, 6H), 2.36 (m, 2H), 4.15 (br, 2H), 4.75 (s, 2H), 7.44 (d, 2H), 7.78 (d, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz MeOD) δ ppm: 170.22, 143.25, 140.03, 137.91, 131.63, 128.62, 126.94, 120.90, 119.63, 107.65, 77.50, 77.0, 76.49, 60.28, 27.93, 20.92, 14.09.

Fmoc-Asp(F)-OAll. Il residuo Fmoc-Asp(OH)-OAll (0.19 g, 0.48 mmol) è stato sciolto in CH_2Cl_2 (5 ml) e portato alla temperatura di 0 °C in un bagno di ghiaccio e, successivamente, è stato aggiunto 2,4,6-Trifluoro-1,3,5-Triazina (76 μl , 0.74 mmol)

e piridina (0.1 ml, 1.4 mmol). Dopo aver lasciato sotto agitazione per 1.5 ore, la miscela di reazione è stata velocemente estratta con H₂O (3×) e anidrificata in Na₂SO₄. Il solvente organico è stato poi evaporato all'evaporatore rotante e il residuo seccato in pompa da vuoto meccanica. Il prodotto è stato ottenuto come un solido bianco (0.17 g, 91%). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ (ppm): 7.77 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.37 (td, J = 7.2 Hz, 4H), 5.88 (dd, J = 5.5 Hz, J = 11.3 Hz, 1H), 5.72 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 5.38 (s, 1H), 5.29 (d, J=10.2 Hz, 2H), 4.67 (dd, J = 5.5 Hz, J = 14.8 Hz, 2H), 4.43 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 4.23 (t, J=6.8 Hz, 1H), 3.16 (m, 2H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 63 MHz) δ (ppm): 143.45, 141.28, 130.86, 127.78, 127.05, 124.97, 120.01, 119.63, 67.36, 66.99, 49.80, 47.02. ESI MS [M+H]⁺ teorica: 398.1, trovata sperimentalmente: 398.2.

1a-(Asp(Gly-OH)-NH₂). Dopo purificazione con RP-HPLC sono stati ottenuti 1.6 mg di un solido bianco (resa 85%). HPLC (Jupiter Proteus-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 3 al 25% in 30 min, detector UV a 226 nm): 26.7 min (100%). ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 421.2689, trovata sperimentalmente: 421.2678.

1a-(Asp(ProGly-OH)-NH₂). Dopo purificazione con RP-HPLC sono stati ottenuti 1.8 mg di un solido bianco (resa 61%). HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 5 al 27% in 30 min, detector UV a 226 nm): 27.5 min (100%). ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 519.3217, trovata sperimentalmente: 519.3127.

1a-(HisAsp-NHAc)₃. Dopo precipitazione in dietiletere, sono stati ottenuti 12 mg di prodotto solido bianco con una resa del 91%. HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)-CH₃CN/TFA (0.1%) dal 13% al 30% in 30 min, detector UV a 226 nm): 26.8 min (95%). ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 1132.5098, trovata sperimentalmente: 1132.5021.

1a-(HisAspAsp-NHAc)-(HisAsp-NHAc)₂. Dopo precipitazione in dietiletere, sono stati ottenuti 14 mg di prodotto solido bianco con una resa del 72%. HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)-CH₃CN/TFA (0.1%) dal 12% al 28% in 30 min, detector UV a 226 nm): 30.5 min (100%). ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 1247.5367, trovata sperimentalmente: 1247.5349.

1c-(AspArg-NHAc)₃. Dopo purificazione con RP-HPLC sono stati ottenuti 2.1 mg di un solido bianco (resa 61%). HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)-CH₃CN/TFA (0.1%) dall'8% al 38% in 30 min, detector UV a 226 nm): 32.8 min (100%). ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 1071.5708, trovata sperimentalmente: 1071.5719.

Bibliografia

- ¹ Guarise, C.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 11670.
- ² Guarise, C.; Zaupa, G.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *J.Org.Chem.* **2008**, *Submitted manuscript*.
- ³ (a) Schneider, S.E.; O'Neill, S.N.; Anslyn, E.V. *J.Am.Chem.Soc.* **2000**, *122*, 542.
(b) Hennrich, G.; Anslyn, E.V. *Chem.Eur.J.* **2002**, *8*, 2219
- ⁴ (a) Cacciapaglia, R.; Di Stefano S.; Mandolini, L. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 113. (b) Mandolini, L. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1986**, *22*, 1.
- ⁵ (a) Letsinger, R.L.; Kornet, M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3045. (b) Felix, A. M.; Merrifield, R.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1385. (c) Matsueda, R.; Maruyama, H.; Kitazawa, E.; Takahagi, H.; Mukaiyama, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1973**, *46*, 3240. (d) Henkel, B.; Zhang, L.; Bayer, E. *Liebigs Ann. Recl.* **1997**, 2161. (e) Léger, R.; Yen, R.; She, M.W.; Lee, V.J.; Hecker, S.J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4171. (f) Thieriet, N.; Guibé, F.; Albericio, F. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1815. (g) Brase, S.; Kirchhoff, J.H.; Kobberling, J. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 885.
- ⁶ Ashraf, M.A.; Notta, J.K.; Snaith, J.S. *Tet.Lett.* **2003**, *44*, 9115-9119.
- ⁷ (a) Akaji, K.; Kiso, Y.; Carpino, L.A. *J.Chem.Soc., Chem. Commun.* **1990**, 584. (b) Kochansky, J.; Wagner, R.M. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 8007.
- ⁸ Akaji, K.; Tanaka, H.; Itoh, H.; Imai, J.; Fujiwara, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 3471.

CAPITOLO 3

Valutazione catalitica di sistemi tripodali

3.0 Studio di molecole tripodali con attività catalitica

Come riportato nel capitolo introduttivo, i sistemi tripodali trovano notevoli applicazioni nel campo della catalisi¹ e del riconoscimento molecolare². Per questa ragione la procedura sintetica descritta è stata applicata alla sintesi di strutture tripodali dotate di simmetria C_3 con attività catalitica, allo scopo di studiare come i gruppi funzionali dello scaffold possano interagire tra di loro in modo cooperativo.

Nella progettazione dei catalizzatori l'unico vincolo sintetico è rappresentato dalla necessità di inserire almeno un residuo di acido aspartico nella struttura finale, per cui esiste una notevole libertà per quanto riguarda i gruppi funzionali da introdurre. Si è scelto di studiare due reazioni modello: una reazione di idrolisi di esteri attivati e una reazione di condensazione aldolica stereospecifica, facilmente seguibili rispettivamente via spettrofotometrica o via analisi HPLC con colonna chirale. Nella prima parte saranno descritti piccoli catalizzatori tripodali come modelli artificiali delle proteasi (ed esterasi) seriniche, studiando diverse sequenze attive nell'idrolisi di esteri, e valutando come modifiche della struttura dello scaffold possano influenzare la cooperatività tra i gruppi funzionali legati. Nella seconda parte viene invece studiato uno scaffold tripodale funzionalizzato con una sequenza, riportata in letteratura, attiva nella reazione di condensazione aldolica stereospecifica. In questo caso si è valutato l'eccesso enantiomerico ottenuto nella conversione del substrato a prodotto.

Introduzione

3.1 Meccanismo enzimatico delle proteasi (ed esterasi) seriniche

Le proteasi (ed esterasi) seriniche rappresentano una classe di enzimi coinvolti in un gran numero di processi fisiologici e patologici in grado di idrolizzare, con una straordinaria efficienza, substrati esterei sintetici come pure peptidi, attraverso un meccanismo che prevede la formazione dell'enzima acilato (Figura 1). Il sito attivo di questa classe di enzimi (es. Chimotripsina, Subtilisina) è caratterizzato dalla presenza dei residui Asp, His e Ser che si trovano in un ambiente nel quale la presenza di opportuni legami ad idrogeno permette da un parte di alterare, aumentandola, la nucleofilicità del gruppo ossidrilico della serina e, dall'altra, di attivare il substrato all'attacco nucleofilo. La formazione del complesso enzima-substrato è seguita da un attacco da parte dell'ossidrilico della serina al gruppo

carbonilico che porta alla formazione dell'intermedio TI-1. Questo intermedio riarrangia rilasciando o un'ammina o un'alcol per dare l'enzima acilato. Il passaggio successivo vede l'attacco di un gruppo (H)OH all'acil-enzima che, attraverso la formazione di un intermedio tetraedrico (TI-2) viene idrolizzato per rigenerare l'enzima nel suo stato originale. Studi strutturali ai raggi X hanno messo in evidenza come il sito attivo sia del tutto complementare allo stato di transizione della reazione, caratterizzato da una struttura molto simile a quella del primo intermedio tetraedrico³.

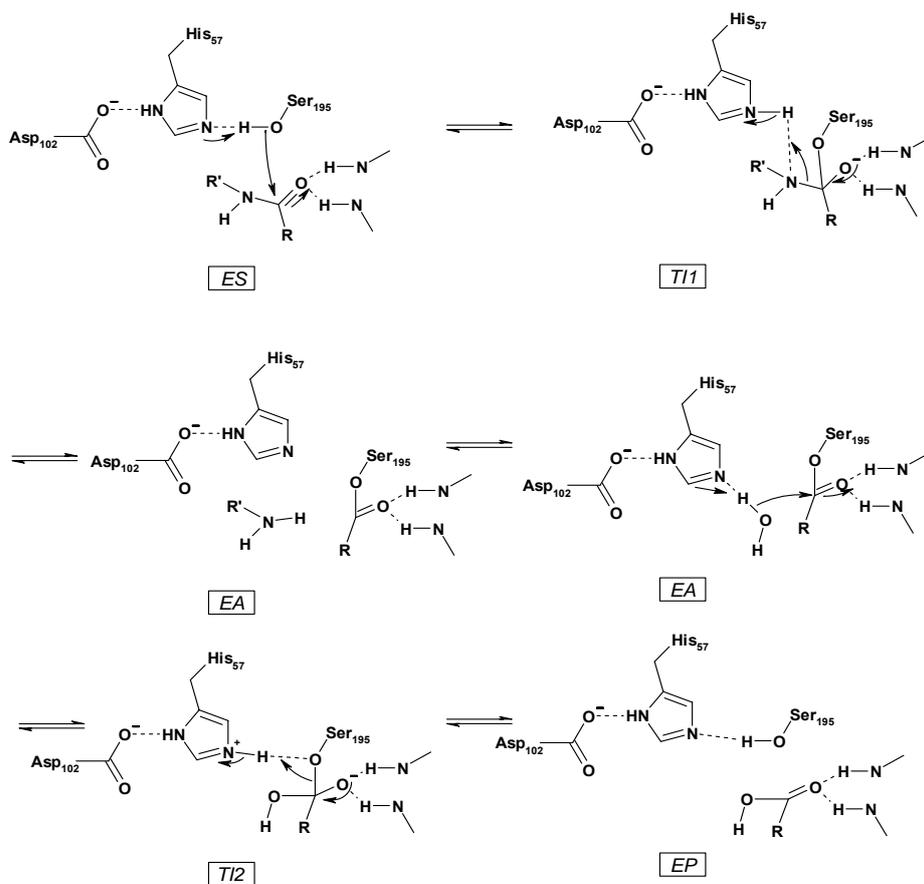


Figura 1. Meccanismo di reazione della chimotripsina, una proteasi serinica.

3.2 Studio di strutture multivalenti come modelli artificiali delle esterasi seriniche

L'interesse volto verso la sintesi e lo studio di piccole molecole in grado di mimare l'attività di questi enzimi, è motivato dalla necessità di comprenderne chiaramente il meccanismo, per la realizzazione di sistemi sintetici che possono trovare applicazione nel campo biologico, farmaceutico e industriale.

Ad esempio il gruppo di Reymond⁴ ha riportato lo studio di una libreria di 103

dendrimeri, ottenuti con una sintesi divergente su fase solida con una classica chimica Fmoc, dove sono stati introdotti una varietà di α -amminoacidi utilizzando come elementi di ramificazione diamminoacidi di struttura diversa. I dendroni ottenuti sono stati successivamente dimerizzati, sfruttando la formazione di un ponte di-zolfo con i residui Cys, inseriti all'estremità C-terminale (Figura 2). Gli studi sui dendrimeri peptidici composti dagli amminoacidi della triade catalitica (His, Asp e Ser) dimostrano una buona attività nell'idrolisi del substrato estereo 7-isobutirril-N-metilchinolinium ($k_{cat}/k_{uncat}=3355$), e un rapporto k_{cat}/K_M 350 volte maggiore rispetto alla reazione catalizzata dal 4-metilimidazolo. Questo valore, ottenuto con un dendrimero che presenta 8 His sulla superficie, corrisponde ad un incremento (dell'attività esterasica) di circa 40 volte per ciascuna His del dendrimero. Gli studi cinetici, condotti a pH 6, dimostrano chiaramente che per l'attività di questi catalizzatori sintetici è indispensabile la presenza dell'istidina nella posizione terminale. Gli studi riportano inoltre, una forte dipendenza dell'attività esterasica dei dendrimeri a seconda del tipo di diamminoacido utilizzato nella sintesi. L'uso di unità di ramificazione più lunghe (es, composto **1**, figura 2), porta a dendroni inattivi nella forma monomerica probabilmente in seguito alla perdita dell'effetto cooperativo, dovuto all'elevata flessibilità dei gruppi funzionali. L'attività viene infatti recuperata nelle strutture dendroniche dimeriche, caratterizzate da una conformazione più compatta. Viceversa l'uso di unità di ramificazione più rigide (es, composto **2** e **3**, figura 2) porta a dendroni attivi in forma di monomero e non si nota un aumento di cooperatività in seguito alla loro dimerizzazione. Dagli studi di Raymond emerge inoltre che l'introduzione di residui più idrofobici porta a composti inattivi, probabilmente in seguito all'induzione di una conformazione chiusa che non espone i gruppi funzionali.

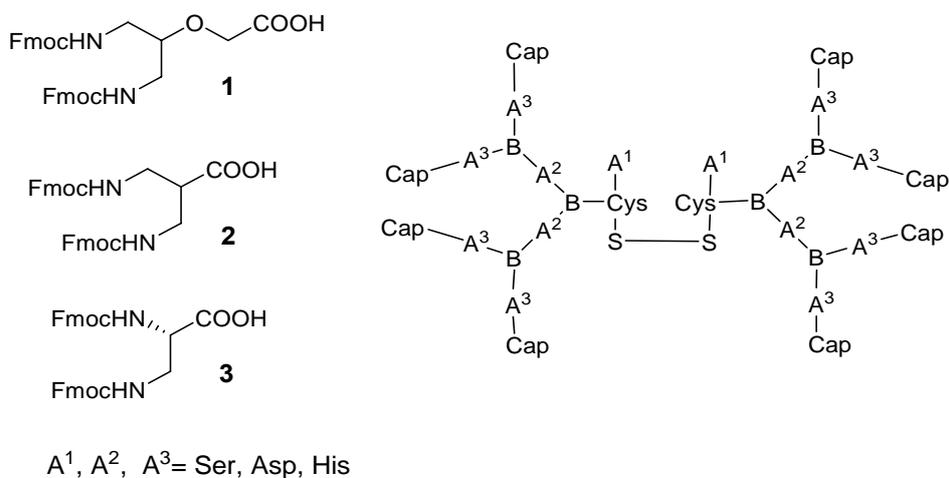


Figura 2. Struttura generale del dedrimero peptidico dimerizzato. A sinistra sono riportati i diversi diamminoacidi utilizzati come siti di ramificazione (B): sotto sono indicati gli α -amminoacidi (A^1, A^2, A^3) inseriti in diversa combinazione in questa prima serie di dendrimeri (successivamente sono stati inseriti altri amminoacidi idrofobici).

In un altro lavoro dello stesso gruppo⁵ è riportato lo studio di dendrimeri di generazioni diverse, sintetizzati su fase solida utilizzando come monomero la sequenza Ser-His e come sito di ramificazione l'acido 2,3-diamminopropionico. Il catalizzatore è stato testato nella reazione di idrolisi di esteri del pirenil trisodiosolfonato dove è stato osservato un meccanismo di catalisi nucleofila da parte della istidina, senza la partecipazione della serina. Nel migliore dei casi il dendrimero di 4^a generazione (G4), dimostra nell'idrolisi dell'estere **3** (Figura 3), un'accelerazione di 4500 volte per singola istidina, rispetto al 4-Metilimidazolo. Nel lavoro citato, il binding del dendrimero con il substrato è stato studiato anche con analisi ITC (isothermal titration calorimetry), verificando che il substrato **4** (Figura 3) lega il catalizzatore con una affinità da 5 a 300 volte più elevata rispetto al prodotto, e con un incremento di 50 volte passando dal dendrimero di 1^a generazione (G1) a quello di 4^a generazione (G4), mentre il binding del prodotto rimane costante. Questo effetto dendrimerico positivo può essere dovuto a due fattori: da un lato alla formazione di interazioni idrofobiche tra la catena acilica del substrato e il catalizzatore e dall'altro, alla modifica del pKa dell'anello imidazolico dell'His esposta nella superficie dendrimerica.

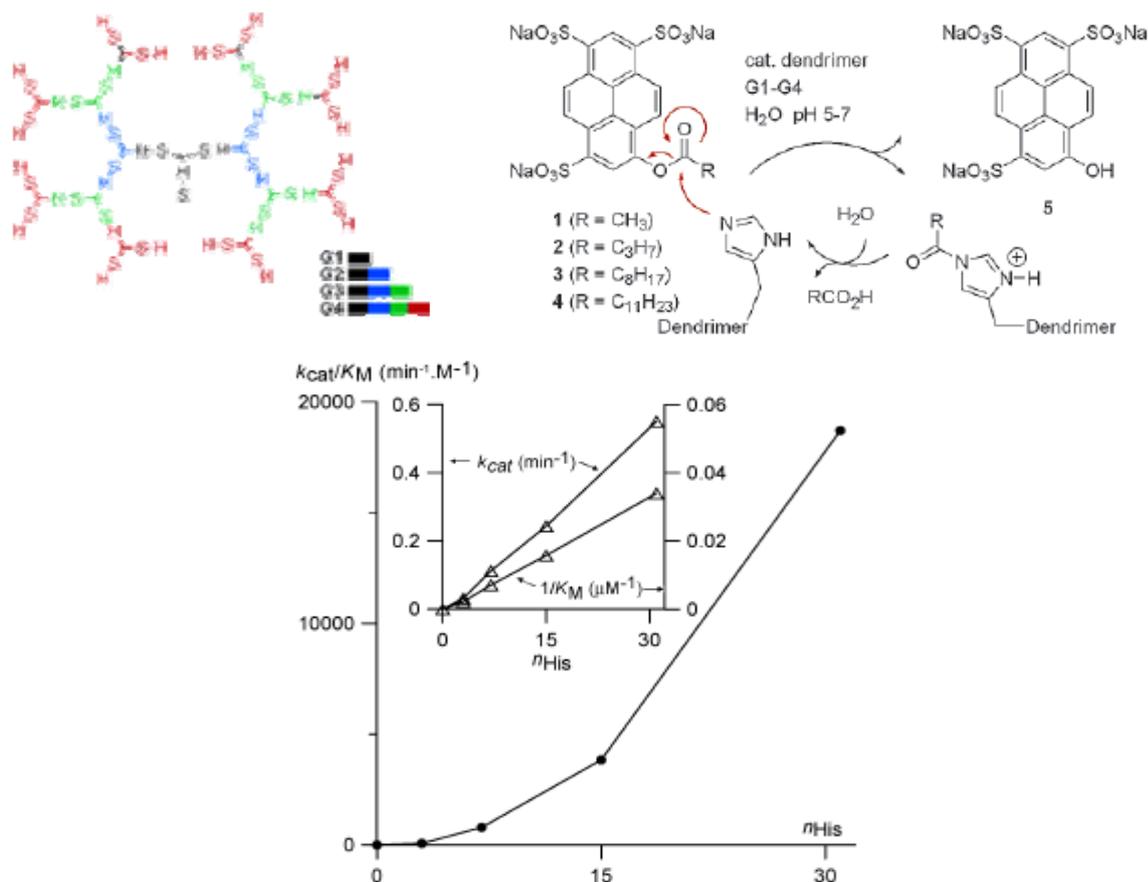


Figura 3. In alto è riportata la struttura del dendrimero studiato (H=His, S=Ser), e il meccanismo di idrolisi del substrato. In basso il grafico riporta l'aumento cooperativo del rapporto k_{cat}/K_M rispetto al numero di His presenti nel dendrimero.

Lo studio di queste strutture con attività idrolitica può essere esteso anche al campo delle nanotecnologie. Recentemente il gruppo di Stupp⁶ ha riportato lo studio di nanofibre autoassemblate attive nell'idrolisi di un estere attivato (il 2,4-dinitro fenil acetato, DNPA). Queste nanofibre sono costituite da aggregati di peptidi anfifilici, che presentano un nucleo costituito da sequenze amminoacidiche idrofobiche (Ala e Leu, o Pro e Leu), l'estremità C-terminale funzionalizzata con il gruppo palmitico, responsabile dell'interazione idrofobica e l'estremità N-terminale caratterizzata da due residui di His. Nel lavoro citato le analisi TEM (transmission electron microscopy) del composto **1** (Figura 4) dimostrano chiaramente la formazione di nanostrutture cilindriche (di un diametro di circa 7 nm e di lunghezza di poche centinaia di nanometri), mentre dall'analisi CD si nota la struttura secondaria a β -sheet. L'assenza del gruppo palmitico, o l'introduzione di residui di prolina nella sequenza peptidica, porta alla formazione di aggregati sferici (di circa 15-20 nm di diametro) che all'analisi CD risultano avere una struttura a random

coil. Nello studio è riportato un valore della costante d'idrolisi del composto **1**, $1.67 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, circa 8 volte maggiore rispetto all'imidazolo ed alla stessa sequenza in assenza dell'acido palmitico.

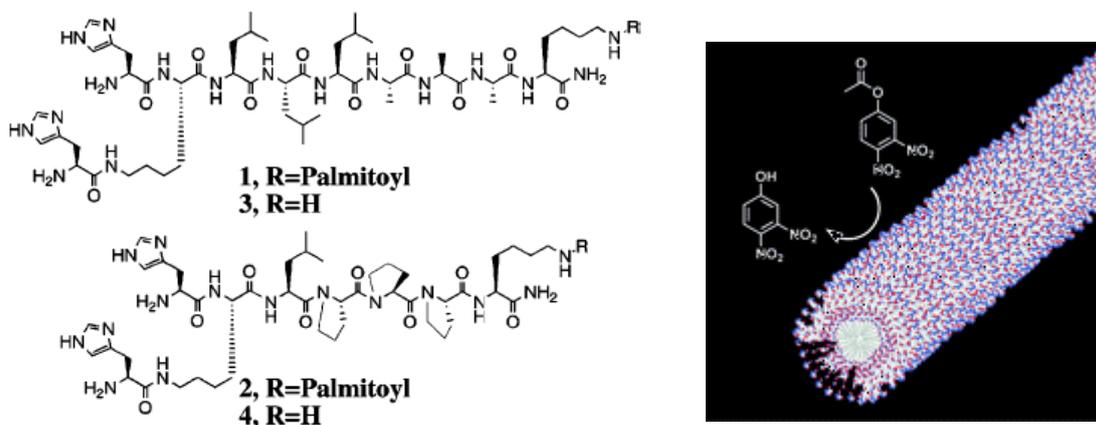


Figura 4. A sinistra è riportata la struttura dei peptidi anfifilici, a destra una rappresentazione dell'idrolisi del substrato estero da parte di una nanofibra.

Risultati e discussione

3.3 Molecole multivalenti dotate di simmetria C_3 come modelli artificiali di esterasi seriniche.

I modelli artificiali di esterasi riportati in letteratura evidenziano un significativo effetto cooperativo in seguito all'aumento dei residui di istidina esposti sulla superficie di molecole di medie dimensioni di tipo multivalente. Da questi studi però risulta particolarmente complesso studiare l'origine di questo effetto. E' ad esempio difficile definire quali e quanti residui siano interessati alla formazione del sito catalitico, e correlare la struttura con l'attività. Il primo approccio è stato quello di semplificare le strutture. Si è così pensato di studiare piccole molecole tripodali che di fatto permettessero di limitare le variabili nella formazione di un sito catalitico. Si è cercato cioè di individuare gli elementi minimali responsabili dell'effetto cooperativo, che potessero poi essere utilizzati come punti di partenza, per successive modifiche strutturali dello scaffold che potrebbero influenzare la cooperatività tra i gruppi funzionali legati.

3.3.1 Sintesi di modelli artificiali di esterasi seriniche

Sfruttando la procedura sintetica precedentemente descritta⁷, è stato utilizzato un approccio di tipo razionale per progettare una serie di piccoli catalizzatori tripodali costituiti da uno scaffold, funzionalizzato con diverse combinazioni degli amminoacidi della triade catalitica. Come piattaforma “di prova” è stato utilizzato lo scaffold **1a** (1,3,5-tris-(amminoetil)-2,4,6-trietilbenzene)⁸ in quanto, avendo una conformazione particolarmente rigida che orienta le tre estremità nella stessa direzione dovrebbe massimizzare l’effetto cooperativo tra i gruppi funzionali, fornendo un buon punto di partenza per l’attività di questi composti. Questo scaffold è stato funzionalizzato con diversi di o tri-peptidi costituiti dai residui della triade catalitica (Asp, His e Ser)³, modificandone la sequenza e valutando l’influenza della funzione amminica terminale (acetilata o non). Inoltre è stato anche introdotto un amminoacido non naturale quale la N-metil istidina, per modificare sia la nucleofilicità che la capacità di formare legami a H del residuo.

Catalizzatore	A	B	C	X (gruppo terminale)	Resa
1	Asp	His	-	-NH ₂	84%
2	Asp	His	-	-NHAc	76%
3	Asp	His(Me)	-	-NH ₂	66%
4	Asp	His(Me)	-	-NHAc	59%
5	Asp	His	His	-NHAc	55%
6	Asp	His	Ser	-NHAc	61%
7	Asp	Ser	His	-NHAc	53%
8	His	Asp	-	-NH ₂	74%
9	His	Asp	-	-NHAc	91%
10	His	Asp	2/3: - 1/3:Asp	-NHAc	72%

Tabella 1. Catalizzatori tripodali sintetizzati su fase solida.

I prodotti sintetizzati sono elencati nella tabella 1. Come si può vedere i primi sette composti della tabella presentano tutti il residuo aspartico legato direttamente allo scaffold. Nelle prime quattro strutture l'acido aspartico è stato funzionalizzato con un diverso residuo (es. His, His(Me), Ser), mentre nelle strutture **6** e **7** è stato funzionalizzato con un dimero (rispettivamente -HisSer e -SerHis). Gli ultimi tre composti presentano invece l'His legata direttamente allo scaffold. Tranne l'ultimo composto (**10**) asimmetrico, tutti gli altri catalizzatori riportati nella tabella sono dotati di simmetria C_3 . I prodotti sono stati sintetizzati con le strategie sintetiche precedentemente discusse ed i composti finali sono stati purificati con RP-HPLC mediante una colonna C18 semipreparativa e successivamente caratterizzati con analisi ESI-MS. Come confronto è stato sintetizzato il peptide con la sequenza $NH_2-CO-AspHis-NH-Ac$, su resina Rink ammide, con una classica chimica Fmoc e con resa quantitativa.

Per ragioni che verranno discusse in seguito, si è deciso di funzionalizzare anche una seconda piattaforma costituita dal 5,11,17,23-tetra(ammino)-25,26,27,28-tetra(propossi)-calix[4]arene, sintetizzato dal gruppo del prof. Ungaro dell'Università di Parma. Questo tipo di scaffold offre il vantaggio di essere particolarmente rigido, in quanto le dimensioni del sostituente (propossi) impediscono la mobilità dei quattro anelli aromatici, costringendo le 4 funzionalità nella stessa direzione. Utilizzando la procedura sintetica descritta nel primo capitolo sono stati funzionalizzati i quattro gruppi amminici del calix[4]arene con il dipeptide -AspHis. Il prodotto è stato sintetizzato su resina di Wang, sbloccato e purificato in HPLC con buone rese (72%) ed è stato caratterizzato con analisi ^1H-NMR in CD_3OD . La definizione dei segnali protonici dello spettro riportato in figura 5 mostra l'elevata simmetria del composto ottenuto. In particolare risulta diagnostico il doppietto corrispondente al segnale di uno dei due protoni (H_1) dei 4 metileni, che connettono gli anelli benzenici del calix[4]arene. Se la struttura non fosse perfettamente simmetrica infatti, ciascuno di questi metileni darebbe un segnale diverso (si noti che il secondo protone (H_2) si trova a circa 3.2 p.p.m. coperto dagli altri segnali).

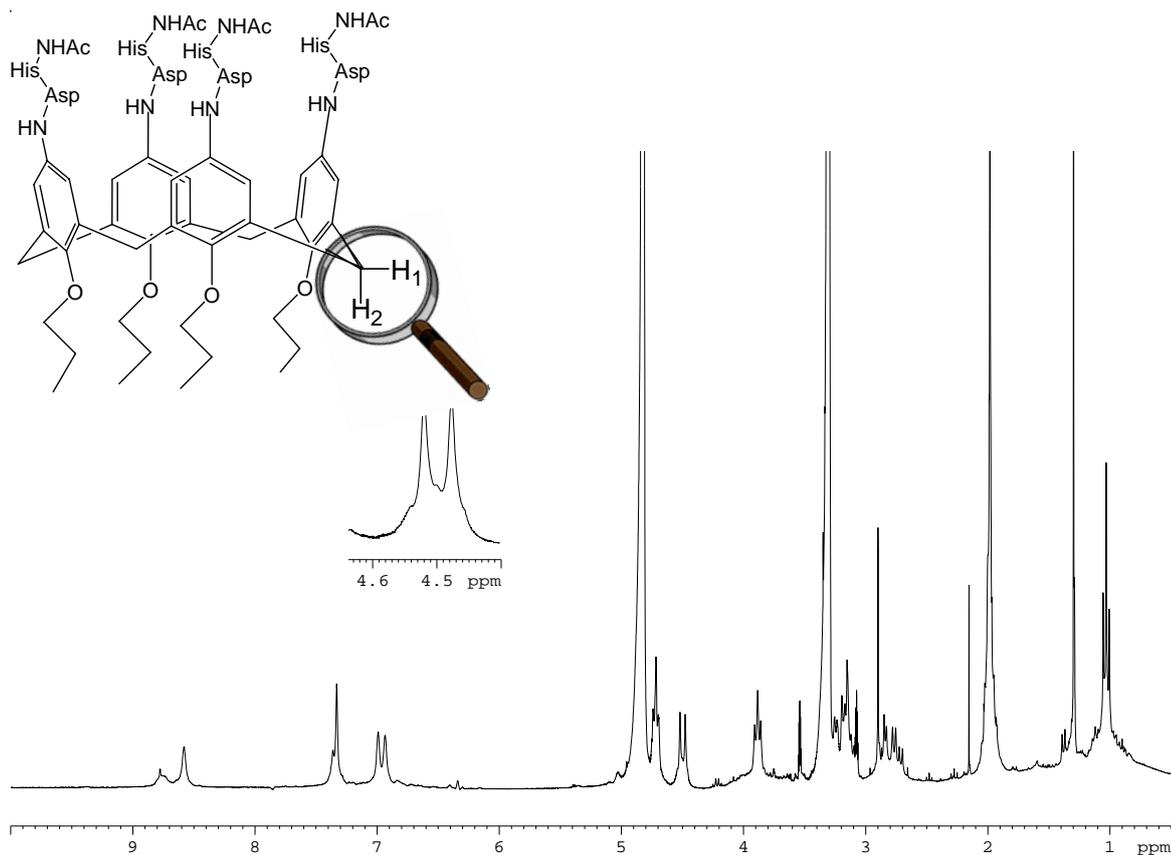


Figura 5. Spettro $^1\text{H-NMR}$ in CD_3OD della struttura $\text{calix-(AspHis-NHAc)}_4$. Nell'ingrandimento nella metilene con due protoni (H_1 , H_2), il doppietto a 4.5 p.p.m. corrisponde al segnale dei 4 protoni H_1 .

Nello studio di modelli artificiali di esterasi seriniche sono state inoltre sintetizzate delle altre strutture, quali capsule ed emicapsule peptidiche. Nella figura 6 è riportata la prima capsula peptidica simmetrica, ottenuta per sintesi su fase solida, dove i 3 gruppi funzionali di un sistema tripodale sono covalentemente legati ad una seconda piattaforma. Questa struttura è stata ottenuta partendo dallo scaffold **1a** legato alla resina, funzionalizzato alle tre estremità con la sequenza aminoacidica $-\text{AspHisSer}$. La capsula è stata successivamente chiusa con l'aggiunta di una quantità in difetto di acido trimesico (**1d**), attivato con PyBOP, ottenendo la formazione del legame ammidico tra le tre ammine delle serine (legate allo scaffold) e i tre acidi carbossilici dell'acido trimesico. Il composto rimosso dalla resina è stato purificato via RP-HPLC ottenendo una resa abbastanza bassa (7%) che potrebbe dipendere dalla formazione di prodotti secondari in seguito alla reazione dell'acido trimesico con le ammine di gruppi funzionali legati a scaffold distinti.

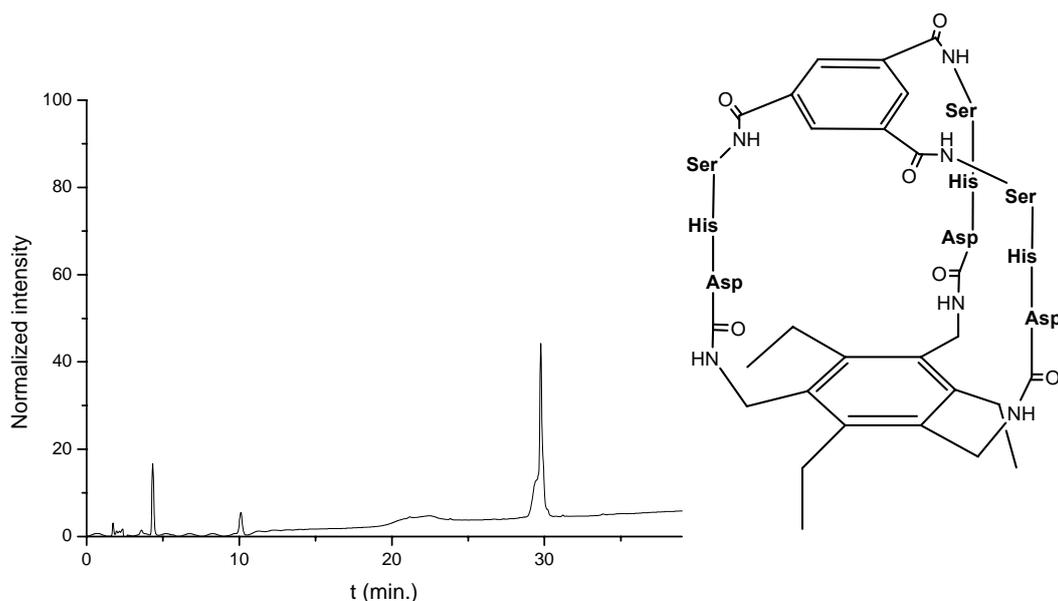


Figura 6. Spettro RP-HPLC della capsula peptidica **1a**-(Asp-His-Ser)₃-**1d** purificata.

La emi-capsula è stata sintetizzata utilizzando la strategia riportata in figura 7, dove il composto **1a**(HisAsp(Wang)NHMmt)-(NH₂)₂) è stato fatto reagire prima con Fmoc-His(Boc)-OH, in presenza di PyBOP e, successivamente, una volta rimosso il gruppo Mmt, questa sola ammina è stata fatta reagire con l'acido trimesico attivato. In seguito è stato rimosso il gruppo protettore Fmoc dalle altre due ammine ed il composto, staccato dalla resina, è stato purificato in HPLC con buona resa (40%).

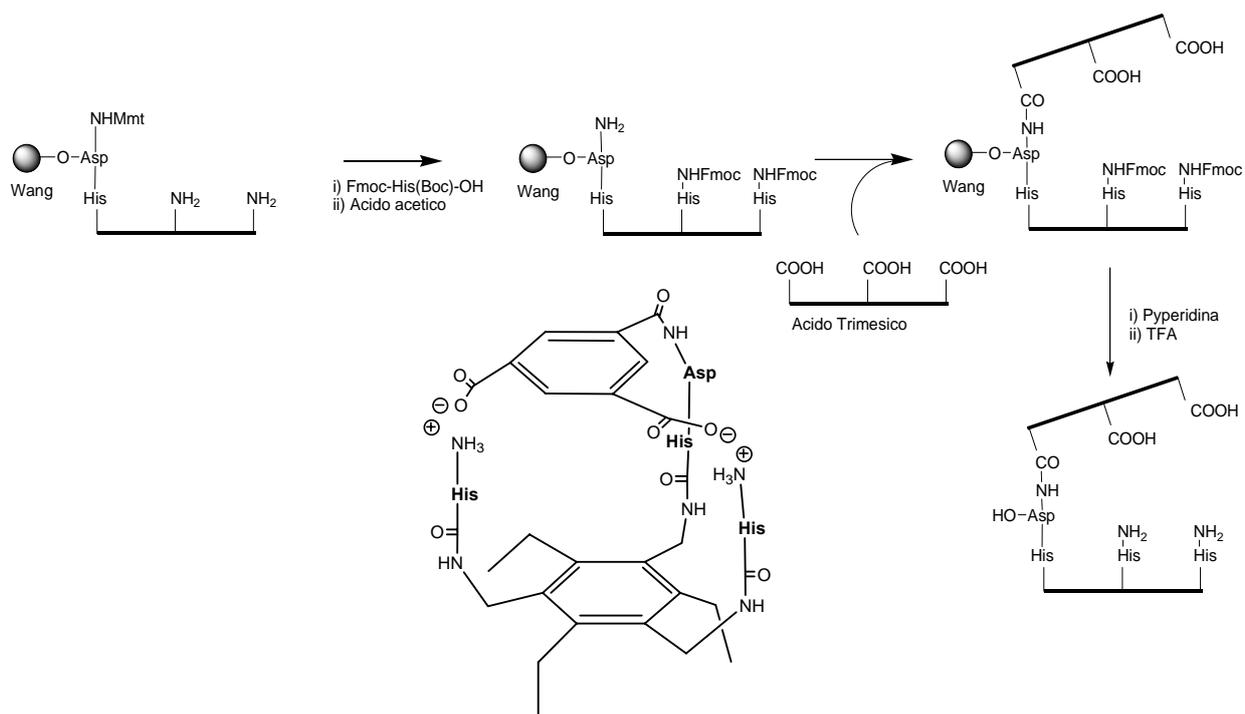


Figura 7. Strategia sintetica utilizzata per la sintesi della emi-capsula su resina Wang.

3.3.2 Studio dei modelli artificiali di esterasi seriniche mediante reazioni di idrolisi di esteri attivati.

I modelli artificiali di esterasi seriniche, descritti nel paragrafo precedente, sono stati utilizzati come catalizzatori di reazioni di idrolisi di esteri attivati. Inizialmente sono state studiate due strutture tripodali (**2** e **5**, tabella 1) per condurre uno screening della loro attività catalitica nella reazione di idrolisi di diversi substrati modello, quali il p-nitrofenilestere di due enantiomeri della Z-leucina (la Z-L-Leu-ONp e la Z-D-Leu-ONp) caratterizzati da una discreta idrofobicità e il substrato carico positivamente p-nitrofenilestere del guanidinio-4-benzoato (guanid-ONp), oltre al p-nitrofenilestere della Z-glicina (Z-Gly-ONp) e il p-nitrofenilbutirrato (PNPB). Questi substrati, una volta idrolizzati, liberano p-nitrofenolato che, avendo un'elevata assorbanza a 405 nm (o 317 nm se il pH è inferiore al pKa del p-nitrofenolo), permette di seguire la reazione per via spettrofotometrica.

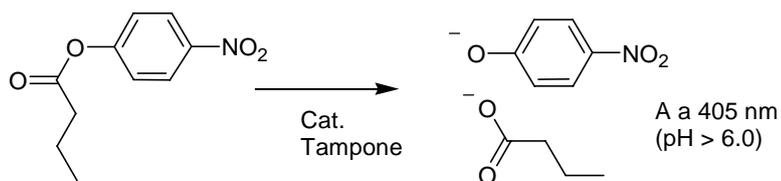


Figura 8. Reazione di idrolisi del PNPB.

Le reazioni sono state condotte a 25°C in H₂O (10% di ACN) a diversi pH (da pH 3 a pH 8). Nella tabella in seguito sono riportate le costanti cinetiche osservate, ottenute in eccesso di catalizzatore ([C]= 1 x10⁻⁴M) rispetto al substrato ([S]= 2 x10⁻⁵M), a pH 6.5 con tampone MES (acido N-morfolin-etan-solfonico) 0.01M (10% di ACN).

Substrato	Catalizzatore	k_{ψ} (sec⁻¹)	k_{uncat} (sec⁻¹) (in assenza del catalizzatore)	$k_{\psi} / k_{\text{uncat}}$
PNPB	2	2.88×10^{-5}	5.48×10^{-7}	52.6
	5	1.3×10^{-5}		18.3
Z-D-Leu-ONp	2	2.45×10^{-5}	5.66×10^{-6}	4.34
	5	7.23×10^{-5}		12.8
Z-L-Leu-ONp	2	3.98×10^{-5}		7.03
	5	4.64×10^{-5}		8.19
Guanid-ONp	2	2.27×10^{-6}	7.83×10^{-7}	2.90
	5	1.82×10^{-6}		2.33
Z-L-Gly-ONp	2	6.29×10^{-5}	3.89×10^{-6}	16.2
	5	3.96×10^{-5}		10.2

Tabella 2. Confronto tra le costanti cinetiche osservate, per i catalizzatori **2** e **3** (vedi tabella 1) con diversi substrati. Ciascun dato è stato poi confrontato con la reazione in assenza di catalizzatore. Le cinetiche di idrolisi sono state seguite a 25°C, pH 6.5 (Tampone MES 0.01M, 10% di ACN); [Catalizzatore]= 1×10^{-4} M; [Substrato]= 2×10^{-5} M.

I catalizzatori testati non dimostrano un'apprezzabile stereoselettività nel riconoscere differenzialmente l'enantiomero D rispetto all'enantiomero L del substrato Z-Leu-ONp. Anche l'idrolisi del substrato carico positivamente (Guanid-ONp) sembra essere poco sensibile alla presenza del catalizzatore, forse anche a causa della intrinseca labilità del substrato nelle condizioni sperimentali. Il substrato Z-Gly-ONp viene idrolizzato con una discreta efficienza, ma i risultati migliori sono stati ottenuti con il PNPB. Per queste ragioni i diversi sistemi tripodali sono stati studiati nella reazione di idrolisi del PNPB, nelle stesse condizioni, in eccesso di catalizzatore. I risultati sono riportati nella tabella 3.

	Catalizzatore:	Substrato:	PNPB k_{ψ} (sec⁻¹)	$k_{\psi}/ k_{\text{uncat}}$
	In assenza del catalizzatore		5.48×10^{-7} (k_{uncat})	1.0
0	NH ₂ -CO-AspHis-NH-Ac (3 equivalenti)		1.05×10^{-6}	1.9
1	1a (AspHis-NH ₂) ₃		2.35×10^{-5}	42.8
2	1a (AspHis-NHAc) ₃		2.88×10^{-5}	52.6
3	1a (AspHis(Me)-NH ₂) ₃		6.31×10^{-6}	11.5
4	1a (AspHis(Me)-NHAc) ₃		1.23×10^{-5}	22.4
5	1a (AspHisHis-NHAc) ₃		1.3×10^{-5}	18.3
6	1a (AspHisSer-NHAc) ₃		2.48×10^{-5}	45.2
7	1a (AspSerHis-NHAc) ₃		1.25×10^{-5}	22.8
8	1a (HisAsp-NH ₂) ₃		1.2×10^{-6}	2.2
9	1a (HisAsp-NHAc) ₃		1.74×10^{-6}	3.2
10	1a (HisAsp-NHAc) ₃ -Asp-NHAc		2.9×10^{-6}	5.3

Tabella 3. Catalizzatori tripodali sintetizzati su fase solida. La costante osservata è stata misurata nella reazione di idrolisi del PNPB. [Catalizzatore]= 1×10^{-4} M ([PNPB]= 2×10^{-5} M, tampone MES 0.01M (10% di ACN), pH 6.5.

Com'è possibile notare i catalizzatori sintetizzati hanno riportato una modesta attività, paragonabile a sistemi simili riportati in letteratura^{4,5}. In particolare il catalizzatore con la migliore efficienza è risultato il composto **2** (**1a**-(AspHis-NHAc)₃)⁹, per il quale la velocità relativa di idrolisi è di circa 53 volte maggiore rispetto al bianco (in tampone ma in assenza di catalizzatore) e di circa 28 volte rispetto al monomero **0**, NH₂-CO-AspHis-NH-Ac (Nota: il confronto cinetico è stato condotto con lo stesso numero di equivalenti). Da questi risultati preliminari si nota che l'acetilazione dell'ammina terminale e la presenza di un terzo residuo (es. Ser, His) non influenza molto l'attività di idrolisi del PNPB. E' interessante notare che il composto **5**, **1a**(AspHisHis-NH₂)₃, presenta una costante cinetica di quasi 3 volte inferiore rispetto all'analogo composto **2**, **1a**(AspHis-NH₂)₃, privo dell'istidina nella posizione terminale. Questi dati permettono di ipotizzare che l'ultimo residuo non partecipi in alcun modo alla formazione di un sito catalitico. E' possibile che in seguito alla solvatazione possa interferire con la conformazione assunta dai residui nel centro del catalizzatore, inducendo, ad esempio una struttura divergente nei

gruppi funzionali legati allo scaffold che ne impedirebbe la cooperatività. Viceversa, la posizione dell'acido aspartico rispetto all'istidina risulta molto importante. Se si osserva il composto **8**, **1a**(HisAsp-NH₂)₃, si nota un'attività catalitica paragonabile a quella del monomero (nella stessa concentrazione) in quanto il rapporto tra la costante osservata e quella del bianco è di appena 2.2. Mantenendo invece la sequenza ma invertendo la posizione dell'acido aspartico (composto **1**, **1a**(AspHis-NH₂)₃) l'efficienza di idrolisi aumenta di circa 20 volte. Infine, la metilazione dell'imidazolo dell'istidina (vedi composti **3** e **4**) comporta una diminuzione da 2 a 4 volte delle costanti cinetiche osservate rispetto ai composti di riferimento (**1** e **2**) con la sequenza nativa. Da questi risultati preliminari viene evidenziata la necessità di collocare una istidina nella posizione centrale di un tripeptide (o in posizione "2" di un dipeptide), la quale potrebbe agire con un meccanismo di catalisi nucleofila simile a quello proposto in letteratura⁵. I dati in nostro possesso non ci permettono di valutare un possibile ruolo da parte della catena laterale dell'acido aspartico o degli altri residui istidinici che potrebbero contribuire a definire in maniera più precisa un sito catalitico.

Da questo screening preliminare sono stati selezionati i composti **1** e **2** con una maggiore attività esterolitica quali catalizzatori tripodali, su cui condurre uno studio cinetico approfondito, sia strutturale con analisi ¹H-NMR, sia cinetico usando un eccesso di substrato, come nelle reazioni enzimatiche. Le reazioni di idrolisi del PNPB sono state condotte a 25°C, in tampone MES (acido N-morfolin-etansolfonico) 0.01M (10% di ACN) a pH 6.5, misurando l'andamento della velocità iniziale al variare della concentrazione del substrato ([PNPB] da 3.9x10⁻⁵ a 2x10⁻²M) e mantenendo fissa la concentrazione del catalizzatore ([C]= 2 x10⁻⁵M). I catalizzatori tripodali risultano avere un elevato numero di turnover. Le costanti cinetiche misurate per il composto **1a**(AspHis-NH₂)₃ ($k_{cat}=5.614 \pm 0.2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $K_M= 3.76 \pm 0.4 \text{ mM}$; $k_{cat}/K_M=0.014$) e per il composto **1a**(AspHis-NHAc)₃ ($k_{cat}=7.738 \pm 0.18 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $K_M=3.66 \pm 0.3 \text{ mM}$; $k_{cat}/K_M=0.021$), risultano sostanzialmente molto simili. Sorprendentemente, mentre l'andamento rispetto alla reazione non catalizzata, nelle medesime condizioni, mostra un'accelerazione simile a quella riportata negli esperimenti in eccesso di catalizzatore, le cinetiche ottenute con gli stessi equivalenti del singolo peptide (NH₂-CO-AspHis-NH-Ac: $k_{cat}=3.039 \pm 0.26 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $K_M=3.63 \pm 0.52 \text{ mM}$; $k_{cat}/K_M=0.0083$) dimostrano un rapporto k_{cat}/K_M di solo 2-3 volte inferiore a quello misurato per i sistemi tripodali.

	Substrato: PNPB			
	Composti:	k_{cat} (sec⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M
0	NH ₂ -CO-AspHis-NH-Ac (3 equivalenti)	3.039 ± 0.26 x10 ⁻⁵	3.63 ± 0.52	0.0083
1	1a (AspHis-NH ₂) ₃	5.614 ± 0.2 x10 ⁻⁵	3.76 ± 0.4	0.014
2	1a (AspHis-NHAc) ₃	7.738 ± 0.18 x10 ⁻⁵	3.66 ± 0.3	0.021

Tabella 4. Costanti di Michaelis-Menten misurate nella reazione di idrolisi del PNPB in eccesso di substrato ([PNPB] da 3.9x10⁻⁵ a 2x10⁻²M) rispetto al [Catalizzatore]= 2x10⁻⁵M, in tampone MES 0.01M (10% di ACN), pH 6.5.

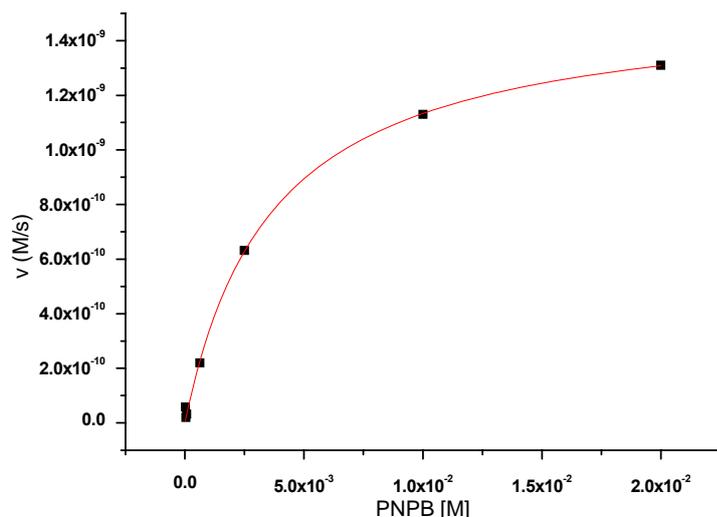
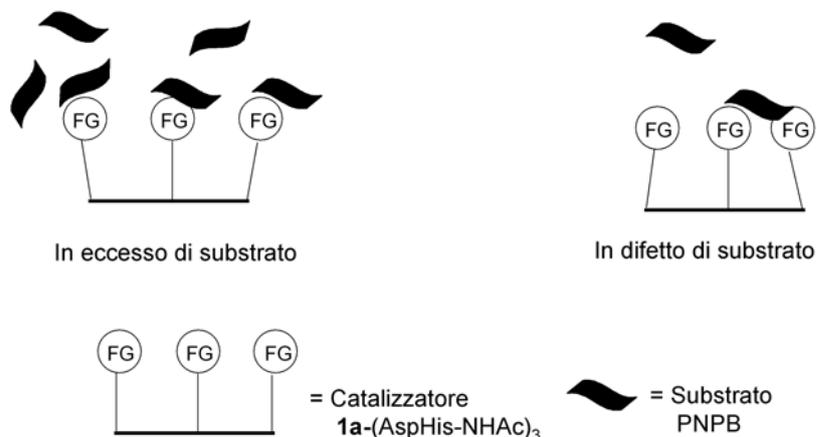


Figura 9. Cinetica di Michaelis-Menten del composto **1a**(AspHis-NHAc)₃ (2x10⁻⁵M) in eccesso di substrato (PNPB) a 25°C, tampone MES (acido N-morfolin-etan-solfonico).0.01M (10% di ACN) a pH 6.5.

L'analisi di questi risultati sperimentali, mette in evidenza come l'effetto cooperativo tra i gruppi funzionali, di questi semplici sistemi tripodali, si verifichi solo in presenza di un eccesso di catalizzatore. Solo in queste condizioni infatti i tre gruppi funzionali possano interagire con una singola molecola di substrato. Viceversa in condizione di eccesso di substrato ogni funzionalità può interagire con più molecole substrato comportandosi in maniera indipendente dall'altra, cosicché l'effetto cooperativo tende a scomparire. Questo fenomeno è dovuto al fatto che questi

catalizzatori non presentano un sito di riconoscimento definito e l'interazione con il substrato è basata solo su interazioni idrofobiche aspecifiche.



3.3.3 Sviluppo dei catalizzatori esterasi mimetici

Dai risultati ottenuti con le prime strutture sintetizzate si nota un'attività catalitica modesta, sebbene paragonabile ad altri sistemi simili presenti in letteratura. Analizzando le strutture è importante osservare che i catalizzatori testati hanno una struttura divergente, infatti i di- o tri-peptidi utilizzati per funzionalizzare lo scaffold **1a** hanno molti gradi di libertà rotazionali. Questo potrebbe limitare fortemente l'effetto cooperativo tra i vari gruppi funzionali, limitando l'attività catalitica. Inoltre, una scarsa affinità con il substrato potrebbe sfavorire la reazione. Sulla base di queste considerazioni sono state individuate due possibili soluzioni per affrontare le problematiche sopra citate:

- 1) Sostituire lo scaffold in modo da migliorare il binding con il substrato;
- 2) Sintetizzare strutture rigide dove sia possibile bloccare e raggruppare le estremità N-terminali dei residui amminoacidici terminali (capsule o emi-capsule).

3.3.3.1 Utilizzo di un calix[4]arene come scaffold multivalente

Per migliorare l'attività dei composti mimetici delle esterasi seriniche, si è pensato di sostituire lo scaffold **1a** con uno scaffold che presenti un sito di riconoscimento del substrato (PNPB) più definito e costringa i gruppi funzionali nella stessa direzione¹⁰. Si è quindi deciso di utilizzare come piattaforma il 5,11,17,23-tetra(ammino)-25,26,27,28-tetra(propossi)-calix[4]arene funzionalizzando i quattro gruppi amminici con il dipeptide -AspHis. Il composto è stato utilizzato nella reazione di idrolisi del PNPB in eccesso di catalizzatore ($[C] = 1 \times 10^{-4} M$) rispetto al substrato ($[PNPB] = 2 \times 10^{-5} M$), a diversi pH (da pH 3 a 8) dimostrando un massimo dell'attività a pH 6.5-7. I risultati rivelano cioè un andamento a campana, con un aumento di attività del catalizzatore ad un valore di pH vicino al pK_a dell'anello imidazolico dell'istidina ($pK = 6.04$). Questo suggerisce un meccanismo catalitico che necessita della partecipazione del gruppo funzionale dell'istidina protonato e non. Come si può notare nel grafico (Figura 10), a pH 6.5 la velocità relativa di idrolisi del calix(AspHis-NH₂)₄ è di circa 86 volte maggiore rispetto al bianco (in tampone ma in assenza di catalizzatore) e 33 volte maggiore rispetto all'unità monomerica (alla stessa concentrazione).

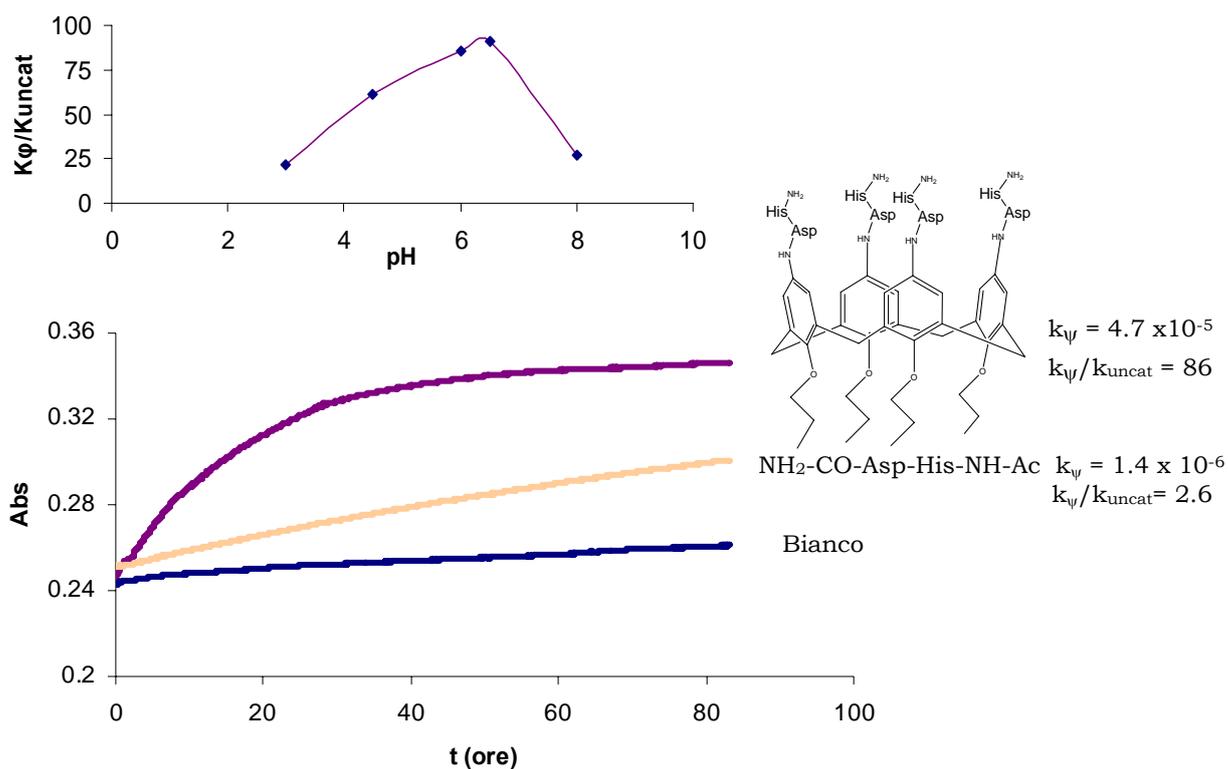


Figura 10. In alto: idrolisi del PNPB a diversi pH usando $calix(AspHis-NH_2)_4$ come catalizzatore in eccesso ($[C]=1 \times 10^{-4}M$) rispetto al substrato ($[PNPB]=2 \times 10^{-5}M$); in basso: il confronto tra l'idrolisi del PNPB da parte del $calix(AspHis-NH_2)_4$ dell'unità monomeric e del bianco. Reazioni condotte a pH 6.5 sempre in eccesso di catalizzatore.

In seguito a questi primi positivi risultati preliminari è stato condotto uno studio più approfondito sia con analisi 1H -NMR sia conducendo le cinetiche in eccesso di substrato. E' stato anche possibile studiare lo stesso catalizzatore con le estremità amminiche acetilate ($calix(AspHis-NHAc)_4$), in quanto la concentrazione più bassa ne consentiva la solubilità. Gli studi precedentemente riportati su sistemi tripodali avevano evidenziato come questa fosse una sequenza leggermente più attiva. Le reazioni di idrolisi del PNPB sono state seguite a $25^\circ C$, in tampone MES (acido N-morfolin-etan-solfonico) 0.01M (10% di ACN) a pH 6.5, misurando l'andamento della velocità iniziale al variare della concentrazione del substrato ($[PNPB]$ da 3.9×10^{-5} a $2 \times 10^{-2}M$) e mantenendo fissa la concentrazione del catalizzatore ($[C]=2 \times 10^{-5}M$). Il composto $calix(AspHis-NHAc)_4$ risulta avere un elevato numero di turn-over, con le seguenti costanti cinetiche: $k_{cat}=9.58 \pm 0.16 \times 10^{-5} s^{-1}$ e $K_M=3.26 \pm 0.1 mM$ con rapporto: k_{cat}/K_M pari a 0.029. Questi valori sono sostanzialmente equivalenti a quelli osservati per il corrispondente sistema tripodale (**1a**($AspHis-NHAc$)₃: $k_{cat}/K_M=0.021$) e con una costante catalitica di solo 3-4 volte superiore a quella

ottenuta per il singolo peptide ($\text{NH}_2\text{-CO-AspHis-NH-Ac}$: $k_{\text{cat}}=3.039 \pm 0.26 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $K_M=3.63 \pm 0.52 \text{ mM}$; $k_{\text{cat}}/K_M=0.0083$). Anche in questo caso l'effetto cooperativo tra i 4 gruppi funzionali è visibile quasi esclusivamente in condizioni di eccesso di catalizzatore, condizione nella quale è favorita l'interazione delle varie estremità dello scaffold con una sola molecola di substrato. Ciò sta ad indicare che in eccesso di substrato, anche in questo caso, è possibile l'interazione con più molecole dello stesso con binding aspecifico.

3.3.3.2 Capsule ed emi-capsule peptidiche

Un'alternativa nella sintesi di questi modelli artificiali di esterasi seriniche è rappresentata dallo studio di strutture chiuse dette capsule e emi-capsule peptidiche, dove i gruppi funzionali impegnati nella catalisi sono tenuti assieme da legami covalenti e il sito di riconoscimento del substrato è ben definito. Nelle emi-capsule invece le varie funzionalità possono essere legate anche con interazioni deboli (legami a ponte idrogeno, interazioni elettrostatiche, ecc.), sensibili a variazioni di pH, solvente, temperatura ecc. che a seconda dell'ambiente di reazione possono migliorare l'effetto cooperativo dei gruppi funzionali o permettere il libero accesso del substrato al sito catalitico.

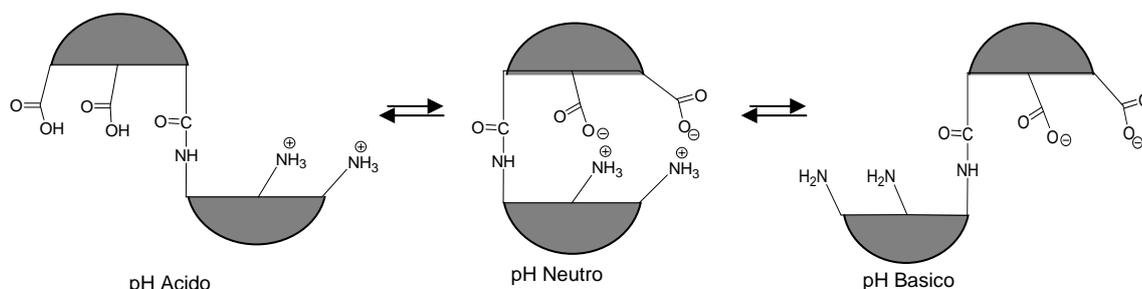


Figura 11. Rappresentazione schematica di una emi-capsula, in grado di modificare la propria conformazione a seconda del pH.

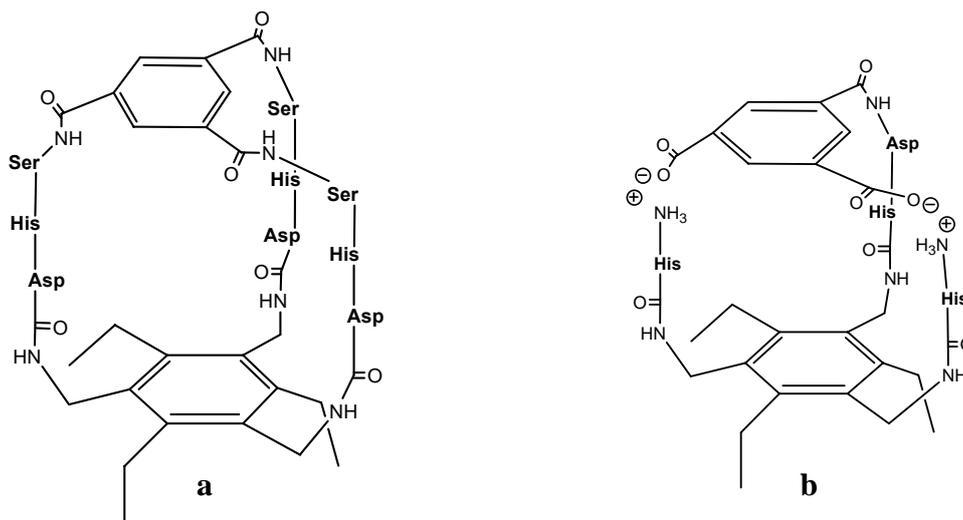


Figura 12. (a) Struttura della capsula peptidica e (b) della emi-capsula, testate nella reazione di idrolisi del PNPB.

La prima capsula peptidica sintetizzata è riportata in figura 12(a). L'attività catalitica di questa struttura è stata studiata nella reazione di idrolisi del PNPB, (a 25°C, in eccesso di catalizzatore ($[C] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$) rispetto al substrato ($[PNPB] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$), a pH 6.5 con tampone MES (acido N-morpholin-ethan-sulfonico) 0.01M, 10% di ACN) e risulta avere una efficienza di idrolisi paragonabile al monomero ($k_v = 1.01 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$). Una possibile spiegazione di questo risultato deludente viene da uno studio preliminare di dinamica molecolare (HyperChem Pro 6.0, esplicitando il solvente acquoso come Periodic Box, MM2), dove è possibile notare che la conformazione a più bassa energia della capsula presenta tutti i gruppi funzionali disposti verso il solvente. Tale conformazione di fatto andrebbe ad impedire qualsiasi effetto cooperativo tra le unità funzionali responsabili dell'attività catalitica. E' stata messa a punto anche una emi-capsula riportata in figura 12(b), dove interazioni elettrostatiche potrebbero permettere l'ottenimento di una struttura con una conformazione aperta o chiusa in dipendenza del pH. Anche questa struttura, testata nella reazione di idrolisi del PNPB in eccesso di catalizzatore (nelle stesse condizioni riportate sopra per la capsula peptidica), non dimostra una buona efficienza nell'idrolisi. In questo caso il risultato potrebbe essere dovuto al solvente in cui avviene la reazione, in quanto in H_2O le interazioni elettrostatiche che dovrebbero permettere la chiusura della capsula, nelle condizioni sperimentali, potrebbero essere troppo deboli.

Questi primi risultati dimostrano la necessità di migliorare la progettazione di queste strutture, (anche sulla base di studi computazionali). E' comunque significativo notare come il protocollo messo a punto permetta di ottenere delle

interessanti strutture che possono presentare un notevole interesse nello sviluppo di catalizzatori e recettori. Attualmente, sfruttando gli sviluppi del protocollo sintetico, ci stiamo occupando anche di mettere a punto una strategia sintetica per capsule simmetriche e asimmetriche, con rese migliori, studiandone il comportamento in diverse condizioni (pH ecc.).

3.4 Studio di un sistema tripodale nella reazione di condensazione aldolica stereospecifica

La procedura sintetica, dettagliatamente descritta nel capitolo precedente, rende possibile sintetizzare una grande varietà di molecole tripodali. E' stato progettato di funzionalizzare uno scaffold (1,3,5-tris-(amminoetil)-2,4,6-trietilbenzene), con una sequenza attiva in una reazione di condensazione aldolica stereospecifica, allo scopo di studiare se l'organizzazione dei gruppi funzionali porti alla formazione di una cavità chirale in grado di favorire la catalisi della reazione studiata.

Introduzione

3.4.1 Studio di modelli artificiali di Aldolasi

La reazione di condensazione aldolica, di fondamentale interesse chimico e biologico, prevede la formazione di un legame C-C tra i due reagenti. In natura gli enzimi utilizzano strategie differenti per catalizzare questa reazione tra due composti carbonilici non attivati. In particolare le aldolasi di classe I sfruttano un meccanismo basato sulla formazione di un'enammina, mentre le aldolasi di classe II coinvolgono nel processo un metallo (Zn) come cofattore, e vedono la formazione di un enolato come intermedio. Vi sono molti studi¹¹ in questo ambito che rivelano un certo interesse verso la sintesi e lo studio di piccole molecole mimetiche delle aldolasi di classe I. Il gruppo di List^{11a} nel 2000 ha riportato, per la prima volta, l'attività della prolina come catalizzatore della reazione di condensazione aldolica stereospecifica tra l'acetone e una varietà di aldeidi.

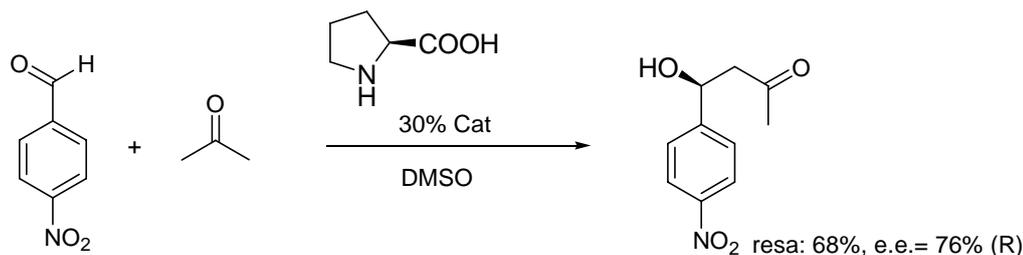


Figura 13. Reazione di condensazione aldolica stereospecifica tra la *p*-nitrobenzaldeide e l'acetone, catalizzata dalla L-Pro.

Nel primo esempio riportato in figura la L-Pro (0.3 equivalenti) catalizza la condensazione aldolica tra la 4-nitrobenzaldeide e l'acetone con buone rese e permette di ottenere il prodotto con un eccesso enantiomerico del 76%. Nello stesso lavoro è riportato chiaramente che l'utilizzo di altri amminoacidi sia con ammine primarie e secondarie, modifiche dell'anello pirrolidinico (ad esempio la sostituzione della prolina con l'acido pipercolico) o del carbossilato (ad es. 2-pirolidina carbossammide) portano alla totale perdita di efficienza del catalizzatore. Il meccanismo proposto per la reazione aldolica enantioselectiva prevede che la prolina, attraverso la formazione dell'enammina, funga sia da attivatore nucleofilo sia da catalizzatore acido di concerto con il carbossilato, comportandosi così da "micro-aldolasi" (Figura 14). L'acido carbossilico della prolina facilita infatti ciascun step del meccanismo, incluso l'attacco nucleofilo del gruppo amminico (a), la disidratazione dell'intermedio carbinol ammina (b), la deprotenazione della specie immina (c), la formazione del legame C-C (d), ed entrambi gli step dell'idrolisi dell'intermedio imminio-aldolico. L'enantioselectività può essere spiegata con la formazione dello stato di transizione di Zimmerman-Traxler¹² attraverso la formazione di un ciclo con 3 legami a H, dove la configurazione della prolina determina l'enantioselectività nel prodotto finale.

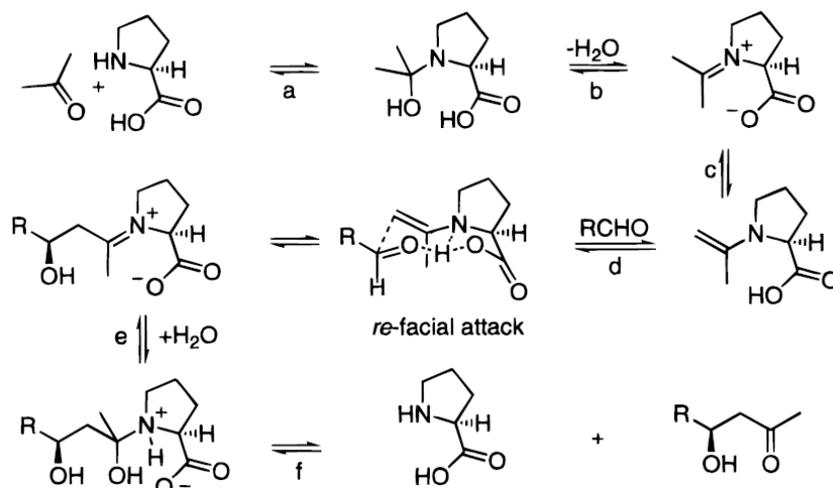


Figura 14. Meccanismo della reazione di catalisi aldolica enantioselettiva, catalizzata dalla prolina.

Nel 2005 il gruppo di Wennemers^{11c}, ha riportato la sintesi di una libreria di tripeptidi, studiandone l'attività in reazioni di condensazione aldolica. La libreria di tripeptidi è stata preparata con una strategia split e mix, direttamente su fase solida, legando le sequenze da studiare attraverso uno spacer, alla catena laterale di una lisina ancorata con il gruppo carbossilico su resina Tentagel (Figura 15). L'altra estremità della lisina, (l'NH₂ vicino al C_α), è stata invece legata tramite uno spacer ad un chetone derivante dall'acido levulonico. In questo modo sulla stessa molecola sono stati coimmobilizzati il tripeptide da testare ed il reagente. Una volta aggiunto alla libreria il secondo reagente, un derivato della benzaldeide legato ad un cromoforo, è stato possibile visualizzare tramite una semplice variazione colorimetrica (da incolore a rosso), i granelli di resina dove i peptidi avevano catalizzato la reazione di condensazione aldolica permettendo di risalire alla struttura del tripeptide attivo. Nel caso specifico sono stati usati 15 diversi D ed L amminoacidi ottenendo una libreria di 3375 tripeptidi, da cui sono state selezionate e risintetizzate separatamente le seguenti sequenze attive:

1] H-L-Pro-L-Pro-L-Asp-CONH₂

2] H-L-Pro-D-Ala-D-Asp-CONH₂

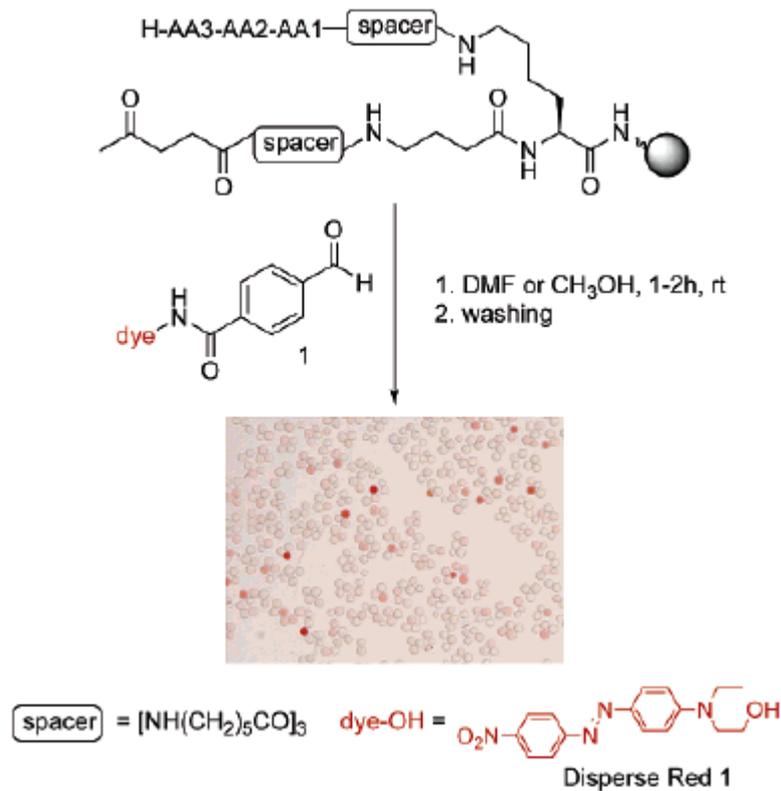


Figura 15. Substrato e catalizzatore coimmobilizzati su fase solida, per lo screening dei peptidi attivi nella reazione di condensazione aldolica.

Le sequenze selezionate sono state quindi studiate nella reazione di condensazione aldolica tra la p-Nitrobenzaldeide e l'acetone. I risultati indicano che la sequenza **1** (Figura 16) risulta 30 volte più attiva rispetto alla prolina, e l'utilizzo di 1 equivalente di catalizzatore (rispetto al reagente) permette di ottenere un prodotto con un eccesso enantiomerico dell'80% (rispetto al 68% della L-Pro) a temperatura ambiente, e addirittura del 90% alla temperatura di -20°C. La sequenza **2** risulta invece 3 volte più attiva rispetto alla L-Pro, con una efficienza enantiomerica simile.

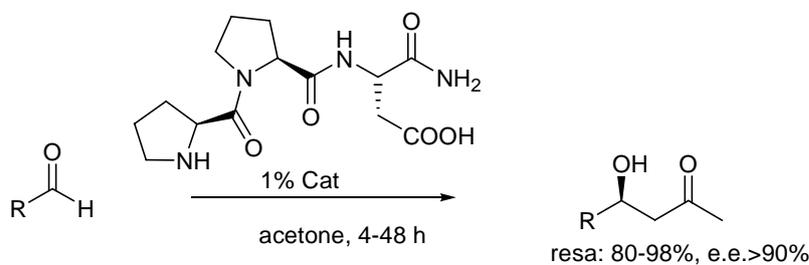


Figura 16. Reazione di condensazione aldolica stereospecifica tra la p-nitrobenzaldeide e l'acetone, catalizzata dalla sequenza **1**: **H-L-Pro-D-Ala-D-Asp-CONH₂**.

Nello stesso lavoro le due sequenze sono state studiate anche con altri derivati aldeidici, confermando i risultati precedentemente discussi. In un lavoro del 2007 dello stesso gruppo di ricerca^{11e}, sono state effettuate delle modifiche alla sequenza **1** verificando che l'attività del catalizzatore richiede la presenza sia dell'ammina secondaria della prolina che del gruppo carbossilico dell'aspartico. Quest'ultimo nella struttura secondaria assunta dal peptide viene a trovarsi in posizione prossimale all'azoto nucleofilo della prolina, agendo come donatore di protoni.

Risultati e discussione

3.4.2 Sintesi di un sistema tripodale come modello artificiale di Aldolasi

L'esempio riportato^{11c} dimostra come l'aumento della complessità strutturale è spesso una buona condizione per migliorare l'attività dei catalizzatori. Si è quindi progettato di funzionalizzare lo scaffold tripodale (1,3,5-tris-(amminoetil)-2,4,6-trietilbenzene)⁸ con la sequenza **1** attiva, allo scopo di studiare se l'uso di questa piattaforma rigida, in grado di disporre i gruppi funzionali nella stessa direzione, crei una cavità chirale in grado di aumentare l'attività catalitica delle funzionalità nella reazione di condensazione aldolica. In letteratura è riportato che modifiche della posizione C-terminale della sequenza **1** non influiscono sull'attività del catalizzatore. Inoltre questa sequenza, presentando un residuo Asp nella regione C-terminale, risulta particolarmente adatta all'utilizzo nel protocollo di sintesi riportato nel capitolo precedente.

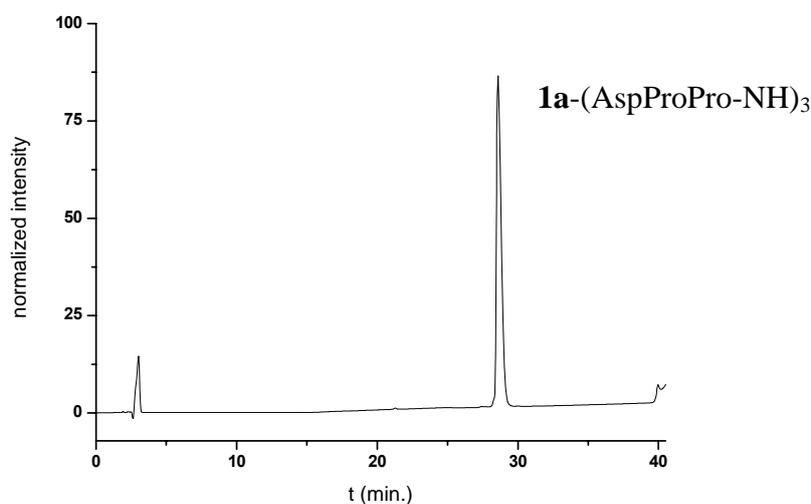


Figura 17. Spettro HPLC del composto **1a-(AspProPro-NH)₃** ottenuto dopo purificazione.

Il composto **1a**-(AspProPro-NH)₃ è stato ottenuto con buone rese (76%) e purificato con RP-HPLC. Come confronto è stata sintetizzata la sequenza **1**, su resina Rink ammidica, con una classica chimica Fmoc. I catalizzatori sono stati studiati grazie ad una collaborazione con il laboratorio della Prof. H. Wennemers (Basilea, Svizzera).

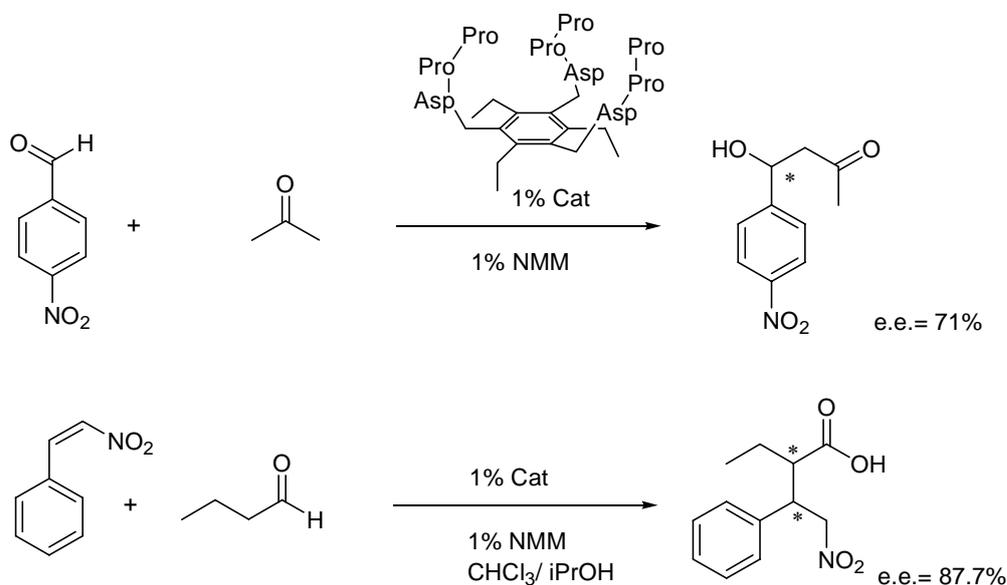


Figura 18. In alto reazione di condensazione aldolica, in basso reazione di condensazione coniugata, catalizzate dal sistema tripodale.

E' stato condotto uno studio preliminare su due reazioni (Figura 18). La prima era una condensazione aldolica tra la p-nitrobenzaldeide (1 equiv.) e l'acetone (usato anche come solvente) in presenza di 0.01 equivalenti di catalizzatore e base (N-metilmorfolina), con la formazione di un prodotto con un stereocentro. La seconda reazione studiata è stata una addizione coniugata tra il nitrostirene (1 equiv.) e la butirraldeide (3 equiv.), in presenza di 0.01 equivalenti di catalizzatore e base (N-metilmorfolina) in un solvente misto di cloroformio/isopropanolo (9/1), con l'ottenimento di un prodotto con 2 stereocentri. Entrambi i prodotti sono stati purificati su lastra di silice semipreparativa e i diversi enantiomeri e diastereoisomeri sono stati separati con HPLC chirale in fase diretta. Nella reazione di condensazione aldolica il catalizzatore tripodale e la singola sequenza **1**, dimostrano un'induzione asimmetrica (e.e.=75% per la singola sequenza **1** e 71% per il sistema tripodale). Nella reazione di addizione coniugata il risultato non varia. In questo caso la reazione porta alla possibile formazione di 4 diastereoisomeri (DD, LL, DL, LD) e il catalizzatore tripodale risulta avere una induzione asimmetrica

molto elevata (e.e.=87.5%), ma sostanzialmente uguale a quella ottenuta con la singola sequenza **1** (e.e.=87.9%).

Non è stato possibile studiare la resa nelle due reazioni, in quanto il catalizzatore tripodale risulta poco solubile nelle condizioni testate. Da questa indagine preliminare si nota che nelle reazioni studiate, in eccesso di substrato (rispetto al catalizzatore), lo scaffold non sopprime l'attività dei gruppi funzionali legati, ma non induce un apprezzabile variazione dell'effetto catalitico, per quanto riguarda l'induzione asimmetrica rispetto all'unità monomerica.

3.5 Conclusioni

In questo capitolo è stato presentato uno studio dell'attività catalitica di diversi sistemi tripodali variamente funzionalizzati. Lo scopo di questo progetto era studiare se fosse possibile funzionalizzare uno scaffold con diversi gruppi funzionali, con orientazione convergente, in modo da disegnare una cavità mimetica del sito catalitico presente in alcuni enzimi. I sistemi sintetizzati sono stati studiati nella reazione di idrolisi di esteri attivati, e nella condensazione aldolica stereospecifica. I dati sperimentali ottenuti dimostrano generalmente una modesta o scarsa cooperatività tra i gruppi funzionali. In genere infatti si osservano costanti di accelerazione simili a quelle misurate per i sistemi monomerici. Vi sono varie spiegazioni per questo comportamento. Una di queste è la scarsa affinità di binding substrato-catalizzatore e lo scarso controllo del modo di complessare del substrato al sito catalitico, quest'ultimo aspetto è chiaramente evidenziato dagli esperimenti effettuati in condizione di eccesso di catalizzatore, dove la situazione limite è la complessazione di una singola molecola di substrato al sito catalitico. In questi casi così si nota un aumento cooperativo dell'attività anche di quasi 30 volte, rispetto al sistema monomerico. La situazione non varia sensibilmente modificando lo scaffold tripodale con uno scaffold a base calix[4]arene più idrofobico e con 4 gruppi funzionali. Una possibile soluzione potrebbe essere rappresentata dalla progettazione di capsule o emi-capsule peptidiche, in grado di bloccare le estremità con una geometria ben definita. In questo caso l'orientazione dei gruppi funzionali diventa un fattore critico. Sono state riportate delle procedure per la sintesi di queste strutture, su fase solida, che richiedono però una progettazione più accurata.

Essenzialmente dagli studi effettuati è emerso che questi sistemi tripodali

presentano una struttura prevalentemente divergente con un numero elevato di gradi di libertà rotazionale. Ciò limita l'attività cooperativa che si può esplicitare tra i gruppi funzionali. Tuttavia una più precisa progettazione dei siti di riconoscimento presenti potrebbe permettere di utilizzare queste strutture nel campo del riconoscimento molecolare, dove la divaricazione dei gruppi funzionali potrebbe costituire un vantaggio, come verrà discusso nel successivo capitolo.

Parte sperimentale

3.6 Caratterizzazione

1a-(AspHis-NH₂)₃. 4 Dopo purificazione con RP-HPLC sono stati ottenuti 19 mg di un olio giallino (resa 84%). HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 4 al 30% in 30 min, detector UV a 226 nm): 24.2 min (100%). ¹H NMR (CD₃OD, 250 MHz) δ (ppm): 8.8 (s, 3H), 7.5 (s, 3H), 4.71 (t, J=6.2, 3H), 4.51 (m, 6H), 4.27 (t, J=6, 3H), 3.43 (m, 6H), 2.65-2.88 (m, 12H), 1.17 (t, J=7.4 Hz, 9H); ESI-MS [M+H]⁺ 1006.4781 teorica; trovata sperimentalmente 1006.4648.

1a-(AspHis-NHAc)₃. Dopo precipitazione in dietilere, sono stati ottenuti 14 mg di prodotto solido giallino con una resa del 76%. HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 3 al 30% in 30 min, detector UV a 226 nm): 27.1 min (100%). ¹H NMR (CD₃OD, 250 MHz) δ (ppm): 8.8 (s, 3H), 7.4 (s, 3H), 4.65 (m, 6H), 4.46 (s, 6H), 4.27 (t, J=6, 3H), 3.05-3.3 (m, 6H), 2.6-2.9 (m, 12H), 1.92 (s, 9H), 1.19 (t, J=7.4 Hz, 9H); ESI-MS [M+H]⁺ teorica 1132.5098; trovata sperimentalmente 1132.489.

1a-(AspHis(Me)-NH₂)₃. Dopo purificazione con RP-HPLC sono stati ottenuti 11 mg di un olio incolore (resa 66%). HPLC Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 10 al 35% in 25 min, detector UV a 226 nm): 22.9 min (100%). ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 1048.525, trovata sperimentalmente: 1048.581.

1a-(AspHis(Me)-NHAc)₃. Dopo purificazione con RP-HPLC sono stati ottenuti 9.2 mg di un solido incolore (resa 59%). HPLC Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 10 al 35% in 25 min, detector UV a 226

nm): 26.3 min (100%). ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 1174.557, trovata sperimentalmente: 1174.527.

1a-(AspHisHis-NHAc)₃. Dopo purificazione con RP-HPLC sono stati ottenuti 8.1 mg di un solido giallino (resa 55%). HPLC Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 3 al 35% in 30 min, detector UV a 226 nm): 25.5 min (100%). ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 1544.686, trovata sperimentalmente: 1544.66.

1a-(AspHisSer-NHAc)₃. Dopo purificazione con RP-HPLC sono stati ottenuti 7.5 mg di un solido giallino (resa 61%). HPLC Jupiter Proteus-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 3 al 30% in 30 min, detector UV a 226 nm): 36.1 min (100%). ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 1393.6865, trovata sperimentalmente: 1393.618.

1a-(AspSerHis-NHAc)₃. Dopo purificazione con RP-HPLC sono stati ottenuti 4.8 mg di un solido giallino (resa 53%). HPLC Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 8 al 30% in 30 min, detector UV a 226 nm): 23.5 min (100%). ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 1393.6865, trovata sperimentalmente: 1393.5853.

1a-(HisAsp-NH₂)₃. Dopo purificazione con RP-HPLC, sono stati ottenuti 9 mg di prodotto solido bianco (resa 74%). HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)-CH₃CN/TFA (0.1%) dal 13% al 30% in 30 min, detector UV a 226 nm): 22.2 min (100%). ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 1006.4781, trovata sperimentalmente: 1006.4421.

1a-(HisAsp-NHAc)₃. Vedi caratterizzazione nella parte sperimentalmente del capitolo 1.

1a-(HisAspAsp-NHAc)-(HisAsp-NHAc)₂. Vedi caratterizzazione nella parte sperimentalmente del capitolo 1.

Calix(AspHis-NH₂)₄ Dopo purificazione con RP-HPLC sono stati ottenuti 6.5 mg di un solido bianco (resa 65%). HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 30 al 60% in 25 min, detector UV a 226 nm): 13.5

min (100%). ESI-MS $[M+H]^+$ teorica: 1661.7423, trovata sperimentalmente: 1661.793.

Calix(AspHis-Ac)₄ Dopo purificazione con RP-HPLC sono stati ottenuti 2.7 mg di un solido giallino (resa 68%). HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)- CH₃CN/TFA (0.1%) dal 33 al 57% in 25 min, detector UV a 226 nm): 29.5 min (100%). ¹H NMR (CD₃OD, 250 MHz) δ (ppm): 8.6 (s, 4H), 7.45 (s, 8H), 6.9 (d, J=14.2, 4H), 4.81 (t, J=6.0, 4H), 4.5 (d, J=11, 4H), 3.9 (t, J=6.0, 4H), 3.4-3.01 (m, 16H), 2.65-2.96 (m, 16H), 1.81-2.02 (m, 20H), 0.98 (t, J=6.25, 12H); ESI-MS $[M+H]^+$ teorica: 1829.785; trovata sperimentalmente: 1829.853.

NH₂-CO-AspHis-NH-Ac. Il dipeptide è stato sintetizzato su fase solida, su resina Rink, utilizzando il classico protocollo della chimica Fmoc. I coupling sono stati effettuati utilizzando come attivatore PyBOP (5 equiv.), in DMF in presenza di DIEA (10 equiv.). Il gruppo protettore Fmoc è stato rimosso con una soluzione di DMF/Piperidina (8/2). In seguito alla rimozione dell'ultimo gruppo protettore Fmoc il peptide è stato acetilato nell'ammina terminale in anidride acetica (10 equiv.), DIEA (10 equiv.), in DMF. Il prodotto finale è stato sbloccato dalla resina con in TFA(95%)/ H₂O(5%). Dopo precipitazione in dietilere, sono stati ottenuti 17 mg di prodotto solido bianco con resa quantitativa. ESI-MS $[M+H]^+$ teorica: 312.123, trovata sperimentalmente: 312.121.

1a-(AspHisSer)₃-1d. Dopo purificazione con RP-HPLC, sono stati ottenuti 2.3 mg di prodotto solido giallino (resa 7%). HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)-CH₃CN/TFA (0.1%) dal 8% al 30% in 30 min, detector UV a 226 nm): 29.8 min (100%). ESI-MS $[M+H]^+$ teorica: 1423.559, trovata sperimentalmente: 1423.96.

1a-(HisAsp-1d)-(His)₂. Dopo purificazione con RP-HPLC, sono stati ottenuti 4.1 mg di prodotto olio giallino (resa 21%). HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)-CH₃CN/TFA (0.1%) dal 15% al 40% in 25 min, detector UV a 226 nm): 15.6 min (100%). ESI-MS $[M+H]^+$ teorica: 968.4301, trovata sperimentalmente: 968.412.

1a-(AspProPro-NH)₃. Dopo purificazione con RP-HPLC sono stati ottenuti 9.1 mg di un solido giallino (resa 76%). HPLC Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 10 al 35% in 25 min, detector UV a 226 nm): 27.8 min (100%). ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 1177.618, trovata sperimentalmente: 1177.581.

NH₂-CO-AspProPro-NH. Il tripeptide è stato sintetizzato su fase solida, su resina Rink, con lo stesso protocollo sopra riportato per il dipeptide: NH₂-CO-AspHis-NH₂. Dopo precipitazione in dietilere, sono stati ottenuti 8.9 mg di prodotto solido bianco (resa 91%). HPLC Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 5 al 35% in 25 min, detector UV a 226 nm): 6.1 min (100%). Il prodotto purificato è stato successivamente trattato con una soluzione concentrata di Acido acetico in H₂O e liofilizzato. ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 327.159, trovata sperimentalmente: 327.167.

3.7 Cinetiche

Cinetiche di idrolisi di esteri attivati.

La variazione di assorbanza nelle cinetiche di idrolisi sono state seguite con un lettore microplate (Tecan infinite F200), con 96 pozzetti del volume di 0.25 ml, 405 nm (dove il pH > 6.0) e 317 nm (dove il pH < 6.0). Le cinetiche in eccesso di catalizzatore ([C] = 1x10⁻⁴M) rispetto al substrato ([S] = 2x10⁻⁵M), sono state seguite a 25°C a pH 6.5 con tampone MES (acido N-morfolin-etan-solfonico) 0.01M (10% ACN). Le costanti osservate sono state ottenute, utilizzando il programma Scientist, fittando i dati con delle cinetiche del pseudo-primo ordine. Le cinetiche di idrolisi in eccesso di substrato, sono state seguite a 25°C, in tampone MES (acido N-morfolin-etan-solfonico) 0.01M (10% di ACN) a pH 6.5, misurando l'andamento della velocità iniziale al variare della concentrazione del substrato ([PNPB] da 3.9x10⁻⁵ a 2x10⁻²M) e mantenendo fissa la concentrazione del catalizzatore ([C] = 2x10⁻⁵M). Le costanti di Michaelis-Menten riportate sono state ottenute, utilizzando il programma OriginPro 7.5, interpolando i dati sperimentali.

Reazioni di condensazione stereoselettiva

Sono state studiate due reazioni di condensazione.

La prima reazione studiata è stata una condensazione aldolica: 0.01 equivalenti di catalizzatore (5 x10⁻⁶ moli) sono stati sciolti in 2 ml di acetone e 0.01 equivalenti di

base (N-metilmorfolina). In fine è stato aggiunto un equivalente (5×10^{-4} moli) di p-nitrobenzaldeide e la reazione è stata lasciata proseguire per 24 ore, sotto agitazione, a temperatura ambiente. Terminata la reazione, il solvente è stato rimosso per evaporazione ed il grezzo di reazione è stato purificato in una lastra di TLC (SiO_2) semipreparativa, utilizzando come eluente una miscela di pentano/etilacetato (6/4). La frazione cromatografia ($R_f = 0.5$) contenente il prodotto, è stata asportata, sciolta in isopropanolo e filtrata. I due enantiomeri, del prodotto sono stati separati in HPLC chirale (Diacel AS; isocratica: esano/isopropanolo (50%), in 30 min., flusso 0.5 ml/min, detector UV a 210 e 254 nm). La percentuale dei due enantiomeri è stata calcolata dall'integrazione delle aree dei picchi HPLC. Utilizzando il catalizzatore: $\text{NH}_2\text{CO-L-AspL-ProL-Pro-H}$ $t_1 = 12.96$ min, e.e.= 25%; $t_2 = 15.17$ min, e.e.= 75%. Con il catalizzatore **1a**-(L-AspL-ProL-Pro-H)₃ $t_1 = 13.01$ min, e.e.= 29%; $t_2 = 15.37$ min, e.e.= 71%.

La seconda reazione studiata è stata una addizione coniugata: 0.01 equivalenti di catalizzatore (5×10^{-6} moli) sono stati sciolti in 2 ml di una soluzione di cloroformio/isopropanolo (9/1), sono stati aggiunti 3 equivalenti di butirril aldeide (1.5×10^{-3} moli) e 0.01 equivalenti di base (N-metilmorfolina), in fine è stato aggiunto un equivalente (5×10^{-4} moli) di nitrostirene, la reazione è stata lasciata proseguire per una notte, sotto agitazione a temperatura ambiente. Terminata la reazione, il solvente è stato rimosso per evaporazione ed il grezzo di reazione è stato purificato in una lastra di TLC (SiO_2) semipreparativa, utilizzando come eluente una miscela di pentano/etilacetato (9/1). La frazione cromatografia ($R_f = 0.5$) contenente il prodotto è stata asportata, sciolta in isopropanolo e filtrata. I 4 diastereoisomeri del prodotto sono stati separati in HPLC chirale (Diacel AD-H; isocratica: Esano/Isopropanolo (1%)- CH_3CN /TFA (0.1%), in 50 min., flusso 1 ml/min, detector UV a 210 e 254 nm). La percentuale dei 4 diastereoisomeri è stata calcolata dall'integrazione delle aree dei picchi HPLC. Utilizzando il catalizzatore: $\text{NH}_2\text{CO-L-AspL-ProL-Pro-H}$ $t_1 = 27.72$ min, e.e.= 87.9%; $t_2 = 30.47$ min, e.e.= 4.1%; $t_3 = 32.36$ min, e.e.= 0.8%; $t_4 = 34.09$ min, e.e.= 7.2%. Con il catalizzatore **1a**-(L-AspL-ProL-Pro-H)₃ $t_1 = 27.47$ min, e.e.= 87.5%; $t_2 = 30.05$ min, e.e.= 4.1%; $t_3 = 31.88$ min, e.e.= 1%; $t_4 = 33.47$ min, e.e.= 7.4%.

Bibliografia

- ¹ Per review: (a) Zhou, J.; Tang, Y. *Chem.Soc.Rev.* **2005**, *34*, 664. (b) Moberg, C. *Angew.Chem.Int.Ed.* **1998**, *37*, 248. (c) Berreau, L.M. *Eur.J.Inorg.Chem.* **2006**, 273.
- ² Per review: (a) Gibson, S.E.; Castaldi, M.P. *Chem.Commun.* **2006**, 3045. (b) Moberg, C. *Angew.Chem.Int.Ed.* **2006**, *45*, 4721. (c) Yoon, J.; Kim, S.K.; Singh, N.J., Kim, K.S. *Chem.Soc.Rev.* **2006**, *35*, 355. (c) Singh, Y.; Dolphin, G.T.; Razkin, J.; Dumy, P. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1298.
- ³ Ding, X.C.; Rasmussen, B.F.; Petsko, G.A.; Ringe, D. *Biochemistry* **1994**, *33*, 9285.
- ⁴ Lagnoux, D.; Delort, E.; Douat-Casassus, C.; Esposito, A.; Reymond, J.L. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1215.
- ⁵ Delort, E.; Darbre, T.; Reymond, J.L. *J.Am.Chem.Soc.* **2004**, *126*, 15842.
- ⁶ Guler, M.O.; Stupp, S.I. *J.Am.Chem.Soc.* **2007**, *129*, 12082.
- ⁷ (a) Guarise, C.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 11670. (b) Guarise, C.; Zaupa, G.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *J.Org.Chem.* **2008**, *Submitted manuscript*.
- ⁸ Hennrich, G.; Anslyn, E.V. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2218.
- ⁹ Guarise, C.; Manea, F.; Zaupa, G.; PASquato, L.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *J. of Pept. Sci.*, **2008**, *In press manuscript*.
- ¹⁰ Baldini, L.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 254.
- ¹¹ (a) List, B.; Lerner, R. A.; Barbas III, C.F. *J.Am.Chem.Soc.* **2000**, *122*, 2395. (b) Sakthivel, K.; Notz, W.; Bui, T.; Barbas III, C.F. *J.Am.Chem.Soc.* **2001**, *123*, 5260. (c) Krattiger, P.; Kovasky, R.; Revel, J.D.; Ivan, S.; Wennemers, H. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1101. (d) Kofoed, J.; Darbre, T.; Reymond, J.L. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3268. (e) Revell, J.D.; Wennemers, H. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 8420.
- ¹² Zimmerman, H. E.; Traxler, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1920.

CAPITOLO 4

Studio di un sistema tripodale nel campo del riconoscimento molecolare

4.0 Sintesi e studio di un inibitore multivalente progettato per bloccare la fusione del virus dell'HIV-1 con i linfociti

In questo capitolo, viene riportata la progettazione di un sistema tripodale, con una struttura estesa, che può trovare applicazione nel campo del riconoscimento molecolare e permette di applicare la strategia sintetica sviluppata nel campo della ricerca farmaceutica. Il target è costituito da una glicoproteina espressa nella superficie del virus dell'HIV-1, responsabile della fusione del virus con le cellule umane¹. Questo progetto è iniziato in collaborazione con la prof. Giovanna Ghirlanda dell'Università dell'Arizona (Phoenix), dove verranno anche effettuati gli studi di attività dei composti ottenuti.

Introduzione

4.1 Meccanismo di fusione del virus dell'HIV con la cellula target

L'entrata del virus dell'HIV-1 nella cellula target è un processo multistep che coinvolge una serie di proteine e cofattori (Figura 1). Le glicoproteine gp120 e gp41 esposte nella membrana dell'HIV-1 giocano un ruolo chiave in questo processo¹. La fusione del virus inizia con il riconoscimento della proteina gp120 da parte del recettore CD4 e dei corecettori CCR5 o CXCR4 sulla membrana dei macrofagi e delle linfociti CD4⁺T. In seguito a questa interazione la proteina gp120 subisce una modificazione conformazionale che espone la glicoproteina gp41 complessata. La proteina gp41 esposta nella membrana virale è costituita da tre importanti regioni: una sequenza di fusione N-terminale, che si inserisce nella membrana della cellula target, e due unità idrofobiche ripetute (denominate rispettivamente elica N-HR e C-HR). Le regioni N-HR di tre molecole gp41 formano una struttura trimerica coiled-coil costituita da α -eliche. In seguito alla dissociazione della proteina gp120 dal complesso, si forma una struttura a sei eliche dove le tre eliche della regione C-HR avvolgono la tripla elica N-HR. La formazione di questo complesso a sei eliche è essenziale per la completa fusione del virus con la membrana della cellula target (detto trimero ad hairpin)².

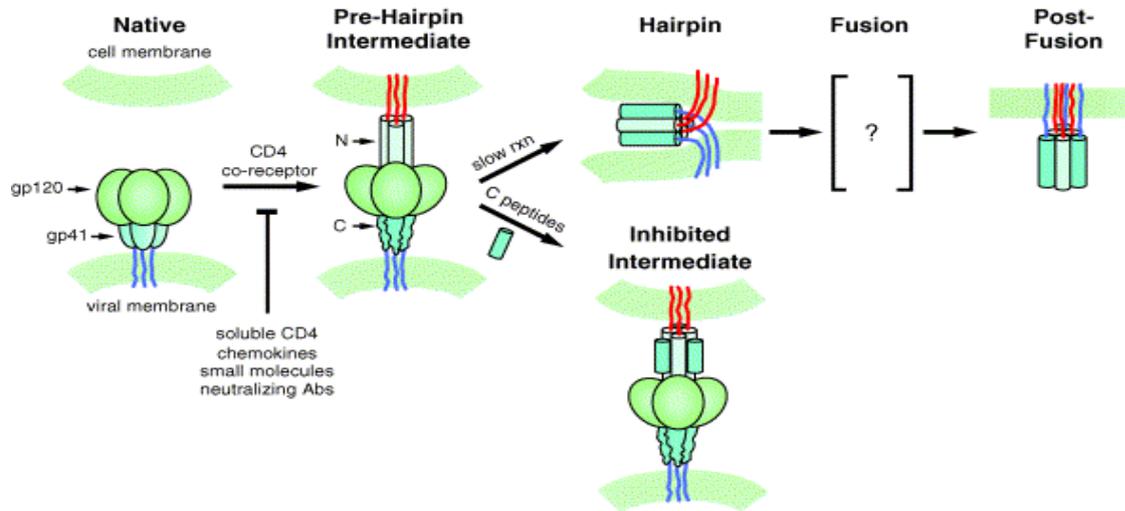


Figura 1. Modello di fusione dell'HIV-1 con la membrana della cellula target^{1d}

545	590
...LSGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVEERYLKDQ....	
<i>Sequenza ripetuta N-HR</i>	
628	661
...<u>WME</u><u>WERE</u><u>I</u>SNYTSLIYTLIEESQNQQEKNEQELL....	
<i>Sequenza ripetuta C-HR</i>	

Figura 2. Sequenza dell'ectodominio della proteina gp41, corrispondente alle regioni ad α -elica (N-HR: 545-590 and C-HR: 628-661).

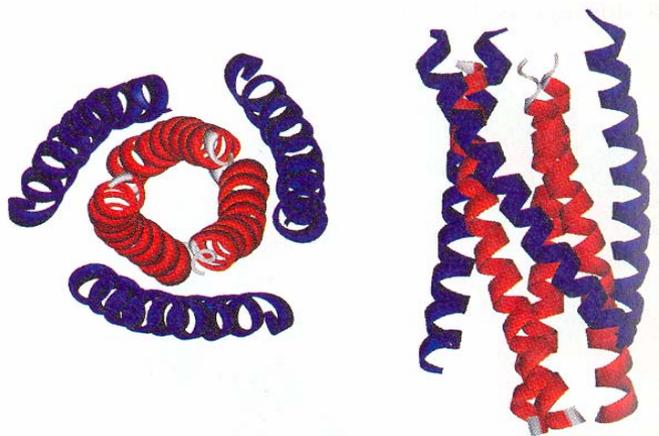


Figure 3. Visione dall'alto e dal fianco della struttura ai raggi X del complesso di fusione attivo a 6 eliche⁸. Le eliche corrispondenti al dominio N-HR sono in rosso N36 e le regioni ad elica corrispondenti al dominio C-HR sono in blu C34.

L'inibizione di questo processo di fusione è un target farmaceutico molto attraente, in quanto permette di bloccare il virus dell'HIV-1 prima dell'entrata nella cellula³. Questa è una strategia alternativa rispetto a quelle maggiormente utilizzate nella terapia anti-HIV, dove i farmaci sono molecole impiegate normalmente per inibire la trascrittasi inversa (nel caso degli inibitori nucleosidici) o la proteasi dell'HIV-1. Attualmente è già in fase clinica un peptide chiamato T-20 (o DP178, Fuzeon della Roche) che è costituito dalla sequenza C-terminale di 36 amminoacidi del dominio C-HR della gp41, che inibisce fortemente la replicazione del virus dell'HIV-1 ($IC_{50}=0.11nM$) legando il trimero coiled coil N-HR, impedendo così la formazione del complesso a 6 eliche (tre domini NH-R e tre C-HR) responsabile della fusione del virus con la membrana cellulare⁴. Gli svantaggi di questo inibitore sono dovuti ad una sintesi particolarmente costosa, associata alla necessità di iniettare a livello subcutaneo elevate quantità del peptide (90 mg per due volte al giorno) a causa di una bassa emivita, dovuta ad una rapida eliminazione renale e all'idrolisi da parte delle proteasi del sangue. Conseguentemente esiste un forte interesse verso la ricerca di piccole molecole (peptido-mimetiche) con lo stesso meccanismo di azione del T-20 ma con migliori attività farmacologiche. Gli esempi includono piccoli α -peptidi⁵ strutturalmente costretti⁶, β -peptidi⁷, foldameri aromatici⁸ e piccole molecole coniugate a peptidi⁹. Generalmente il target di questi inibitori è un dominio idrofobico presente nella regione N-HR, che nella proteina nativa è occupato dall'epitopo idrofobico Trp628, Trp631 e Ile635¹⁰ (WWI) presente nella tripla elica C-HR della gp41.

Risultati e discussione

4.2 Progettazione di un piccolo inibitore multivalente in grado di bloccare la fusione dell'HIV-1

Lo scopo di questo progetto era la sintesi di un piccolo peptide (10 residui) con una struttura ad elica 3_{10} che presenti l'epitopo WWI con la conformazione corretta, in modo da legare fortemente la regione N-HR della gp41, impedendo la formazione del complesso di fusione attivo a 6 eliche, responsabile della fusione dell'HIV-1 nella membrana cellulare target. Questo target trimetrico ad α -elica (N-HR) è interessante anche dal punto di vista della multivalenza, infatti sono presenti 3 siti uguali di legame per l'epitopo WWI (presente nella sequenza wild type: C-HR). L'idea era quella di utilizzare la strategia sintetica, dettagliatamente descritta nel primo

capitolo, per funzionalizzare uno scaffold con tre piccoli peptidi mimetici della regione N-HR per verificare se fosse possibile ottenere un significativo guadagno nell'affinità del binding utilizzando copie multiple del peptide inibitore connesso ad uno scaffold.

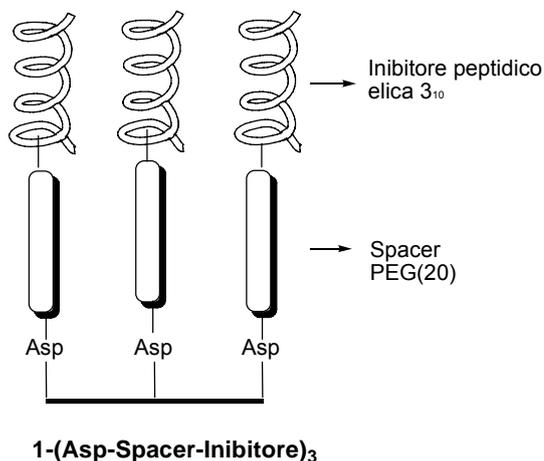


Figura 4. Inibitore multimerico progettato, mimetico della regione NH-R della glicoproteina gp41.

La prima parte del progetto riguardava la sintesi di un piccolo inibitore, dove fosse presente l'epitopo WWI, in grado di strutturarsi con una conformazione elicoidale. In letteratura è riportato che l'introduzione di residui amminoacidici tetrasostituiti (es. acido ammino isobutirrico, Aib) all'interno di sequenze peptidiche naturali, inducono le sequenze ad assumere strutture ad elica 3_{10} , ad α -elica o miste¹¹. In particolare dall'esame di oltre 40 strutture ai raggi X^{11a} (riportate in letteratura fino al 1990) di peptidi di lunghezza compresa tra i 4 e 16 residui, contenenti Aib e amminoacidi proteici è emerso che tra i fattori che concorrono ad orientare la preferenza conformazionale verso l'una o l'altra struttura elicoidale vi sono la lunghezza della catena, il contenuto in Aib e la sequenza. In particolare, l' α -elica tende ad essere favorita al crescere della lunghezza della catena, e al decrescere del contenuto in Aib anche se le eccezioni sono numerose (Figura 5). D'altro canto peptidi corti (fino a 6-10 residui) manifestano una nettissima preferenza per l'elica 3_{10} . Recentemente è stato osservato che il solvente gioca un ruolo importante anche in queste brevi sequenze nel definire il tipo di elica^{11c-d}.

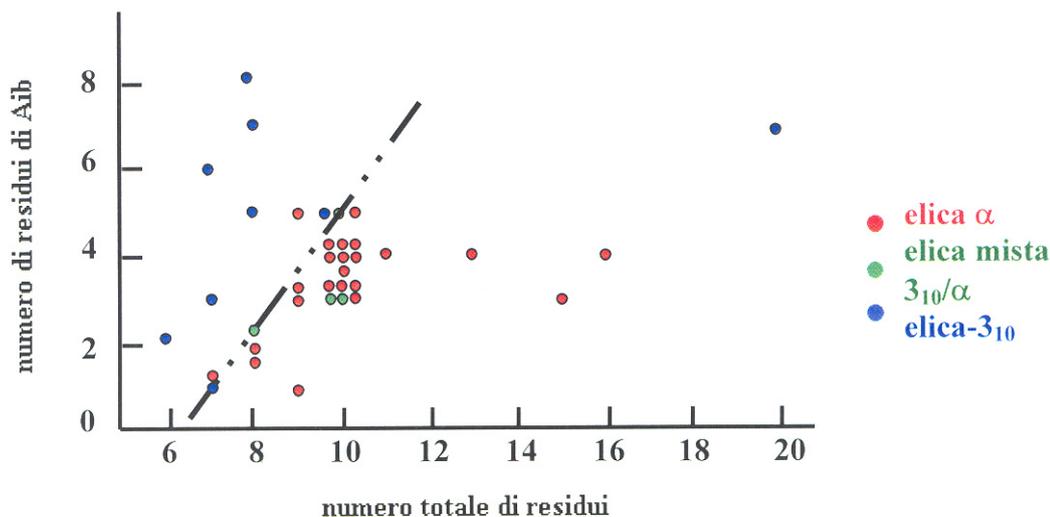


Figura 5. Tipo di elica in funzione del numero totale di residui in un peptide e del numero totale di residui Aib. La linea tratteggiata che separa le eliche-3₁₀ dalle α-eliche è stata tracciata arbitrariamente.

In base a queste considerazioni è stato progettato un piccolo peptide di 10 amminoacidi con 5 residui Aib che dovrebbero essere sufficienti ad indurre nel peptide una conformazione ad elica 3₁₀. Questo piccolo peptide è stato progettato partendo dalla sequenza naturale ad α-elica della regione C-HR, riportata nella figura 6(1), dove, utilizzando la modellistica molecolare, sono stati modificati gli angoli di legame inducendo la struttura ad elica 3₁₀ in modo da avere un modello affidabile della struttura del peptide sintetico progettato. Nella figura 6(2) si nota chiaramente che, in seguito alla modifica, l'epitopo WWI non viene più a trovarsi nella conformazione corretta, infatti si ha una discrepanza nella posizione della isoleucina. Rimuovendo però un residuo tra il triptofano e l'isoleucina è possibile riallineare l'epitopo idrofobico. La sequenza progettata è stata quindi ottenuta mantenendo la stessa posizione degli amminoacidi WWI e sostituendo i residui centrali con degli amminoacidi tetrasostituiti (Aib). La sequenza risulta particolarmente idrofobica e non adatta a lavorare in solvente polare. Per questo motivo, alle estremità sono stati aggiunti dei residui di Glu e Asp e l'estremità N-terminale è stata funzionalizzata con un gruppo trietilenglicole.

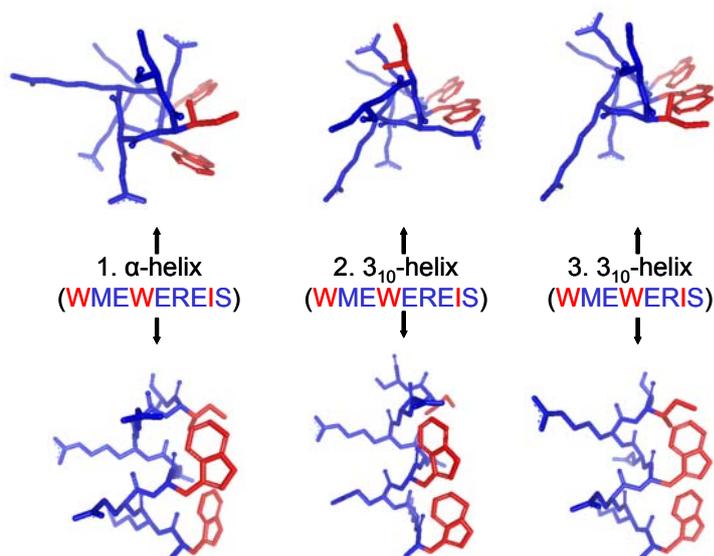


Figura 6. La figura riporta la sequenza naturale del dominio N-HR della gp41, dove per (1) è stata imposta la struttura ad α -elica, nella struttura (2) ad elica- 3_{10} e nella struttura (3) è riportata la stessa sequenza con struttura ad elica- 3_{10} dove è stato rimosso un residuo tra W ed I. L'epitopo WWI è in rosso.

La sequenza del **peptide [1]** progettata è stata:

AcNH-TEG-Glu-Aib-**Trp**-Aib-Aib-**Trp**-Aib-Aib-**Ile**-Asp-OH

E' stato condotto uno studio preliminare di modellistica molecolare, dove è stata imposta una conformazione ad elica 3_{10} al peptide, e tale molecola è stata sovrapposta alla struttura ai raggi X del trimetro ad hairpin (C-HR, N-HR), verificando una buona sovrapposizione del dominio WWI tra la sequenza progettata e la sequenza wild type (C-HR) (programma utilizzato HyperChem Pro7).

La seconda parte del progetto riguarda la funzionalizzazione dello scaffold **1a** su resina con il peptide inibitore. Da preliminari studi computazionali (ottenuti sovrapponendo la struttura "estesa" dell'inibitore tripodale progettato, alla struttura ai raggi X del trimetro ad hairpin) è semplice notare la necessità di utilizzare uno spaziatore per distanziare i tre peptidi con l'epitopo WWI dallo scaffold, in modo tale da consentire all'inibitore multivalente di complessare le tre regioni ad α -elica C-HR. Il linker che si è scelto di utilizzare è un polietilenglicole di 20 atomi.

4.3 Sintesi del peptide mimetico della sequenza N-HR della glicoproteina gp41

Il peptide **[1]** è stato sintetizzato su resina di Wang con una normale chimica Fmoc. In letteratura è riportato che l'introduzione di amminoacidi tetrasostituiti nella chimica su fase solida comporta una drastica diminuzione della resa sintetica, principalmente in seguito ad una scarsa accessibilità del gruppo amminico legato al carbonio in α . La resa di questa reazione diventa quasi inaccettabile quando vengono legati consecutivamente due o più amminoacidi Aib. Per questo motivo è stato preparato in soluzione con buone rese il dimero^{11b} Fmoc-Aib-Aib-OH (Figura 8) che è stato introdotto come tale nella sintesi su fase solida.

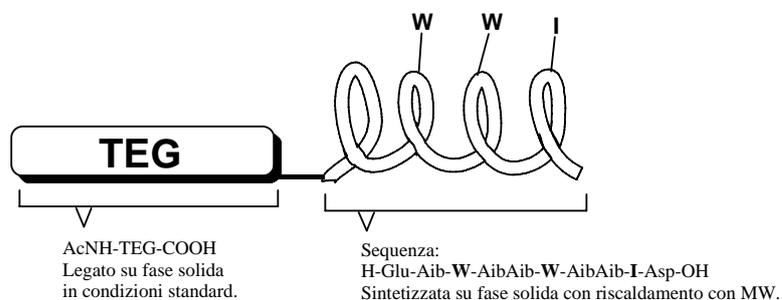


Figura 7. Rappresentazione schematica della struttura del peptide **[1]** Ac-TEG-Glu-Aib-**Trp**-Aib-Aib-**Trp**-Aib-Aib-**Ile**-Asp-OH sintetizzato.

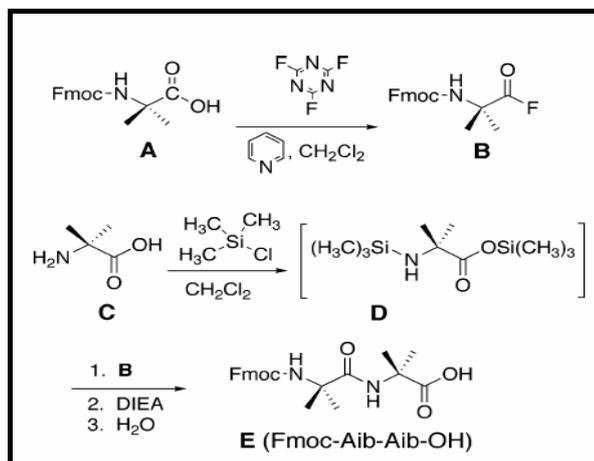


Figura 8. Sintesi del dimero Fmoc-Aib-Aib-OH.

La sintesi del peptide è stata condotta su resina Wang studiando due diverse condizioni (Tabella 1).

Sequenza peptide (AibP: -AibTrpAibAibTrpAibAibIle-)	Resina	Strategia di sintesi	Grado di purezza	Resa
[1] AcNH-TEG-Glu- AibP -Asp-OH	Wang	Standard ^a	5%	<5%
	Wang	MW ^b	50%	~6%
[1P] AcNH-TEG-Glu(OAll)- AibP -Asp(OH)-OAll	Wang	MW ^b	50%	~5%
	Wang	MW ^c	-	-
[2P] AcNH-TEG-Glu(OAll)- AibP -Asp-Glu-CONH ₂	PAL	MW ^c	-	-
[3] AcNH-TEG-Glu- AibP -Asn-Glu-CONH ₂	PAL	MW ^c	84%	<35%
[3P] AcNH-TEG-Glu(OAll)- AibP -Asn-Glu-CONH ₂	PAL	MW ^c	85%	~35%

Tabella 1. Tabella riassuntiva dei peptidi mimetici della sequenza N-HR gp41, sintetizzati su fase solida. (^aSintesi in condizioni standard, dove l'attacco del residuo Fmoc-AA-OH è stato ottenuto con un doppio coupling, il primo, per 2 ore a temperatura ambiente, attivatore HATU, il secondo, per 1.5 ore a 50°C, attivatore PyAOP; ^bSintesi con irraggiamento con microonde (59W; 75°C), doppio coupling entrambi di 5 minuti, attivatori: HATU e PyAOP; ^cSintesi con irraggiamento con microonde (59W; 75°C).singolo coupling di 30 minuti, attivatore: HBTU). Il composto **[2P]** non è stato ottenuto.

La prima sintesi è stata effettuata in condizioni standard^{11b}, dove per ciascun Fmoc-AA-OH (4.5 equiv.) è stato eseguito un doppio coupling, il primo, per 2 ore a temperatura ambiente, attivatore HATU (4.5 equiv.), il secondo, per 1.5 ore a 50°C, attivatore PyAOP (4.5 equiv.). Nella seconda sintesi del peptide **[1]**, i residui sono stati attivati con gli stessi attivatori (4.5 equiv.) ma i coupling sono avvenuti sotto irraggiamento con microonde (MW) per soli 5 minuti (59W; 75°C). L'ultimo residuo Fmoc-TEG-OH (3.5 equiv.) è stato aggiunto, in entrambe le sintesi studiate, su fase solida in assenza di MW con un singolo coupling, attivando l'acido carbossilico con PyAOP/HOBT (3.5 equiv.) e lasciandolo reagire per una notte a temperatura ambiente. Alla fine il gruppo protettore Fmoc è stato rimosso e, acetilata l'ammina

terminale, sono stati deprotetti i gruppi carbossilici dalla funzione allile con trattamento riducente. Il peptide è stato sbloccato dalla resina, purificato con HPLC e caratterizzato mediante analisi di massa MALDI.

E' sorprendente notare come le analisi HPLC-massa del peptide **[1]** (prima del coupling con lo Fmoc-TEG-OH), ottenuto con il protocollo di sintesi standard riportino un grado di purezza insoddisfacente (di circa il 5% dal rapporto delle aree dei segnali all'HPLC), mentre l'utilizzo delle microonde permette di ottenere un prodotto con un grado di purezza di circa il 50% (Figura 9). E' stato ipotizzato che l'utilizzo delle MW permetta di rompere la struttura secondaria del peptide, così da rendere più accessibile l'amminoacido sulla resina per il coupling successivo.

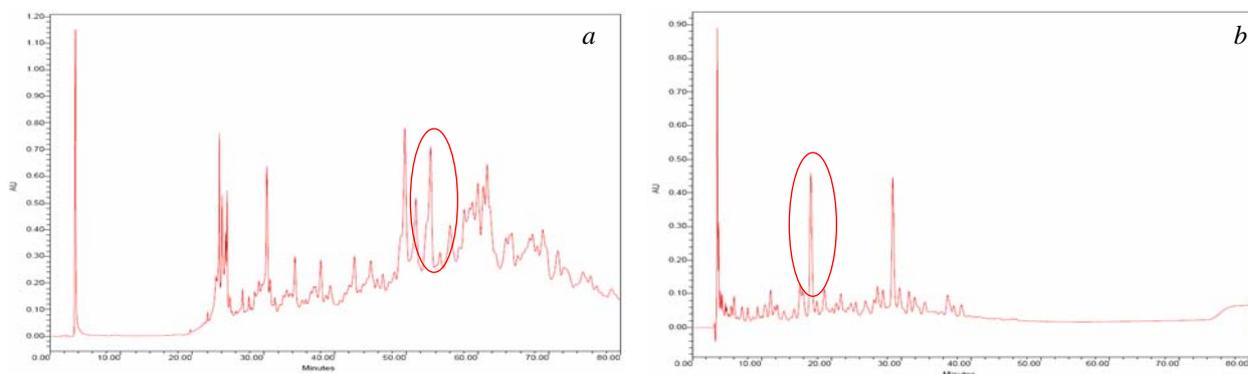


Figura 9. Spettri HPLC del peptide H-Glu-Aib-W-AibAib-W-AibAib-I-Asp-OH sbloccato dalla resina (cerchio rosso). Il primo spettro (a) è stato ottenuto con la sintesi in condizioni standard, il secondo (b) utilizzando il riscaldamento in microonde per fare avvenire i coupling.

Il problema evidenziato seguendo questa strategia sintetica è stato la necessità di ottenere il peptide **[1P]** con rese elevate. Infatti una volta purificato e isolato il peptide si è appurato che la resa diminuiva drasticamente (<5%), nonostante il grado di purezza calcolato fosse del 50%. La sintesi dello stesso peptide, nelle medesime condizioni ma con un irraggiamento di microonde più prolungato (30 minuti), non permette di ottenere il prodotto. Dall'analisi dei risultati ottenuti è stato ipotizzato che la resina Wang sia incompatibile al riscaldamento con microonde. Ciò potrebbe dipendere dal grado di reticolazione della resina. Per affrontare questo problema è stata sostituita la resina Wang con una resina PAL (Chem Matrix), una resina a base di polietilenglicole con un grado di reticolazione molto elevato, compatibile con il riscaldamento con microonde. Questo tipo di resina, labile in TFA, permette di sbloccare il peptide come ammidi (non come acido carbossilico), per questo motivo la sequenza del peptide è stata modificata (peptide

[2P], tabella 1), inserendo un residuo Glu(OTBu), nel C-terminale. In questo caso il gruppo protettore tert-butile deve essere rimosso durante lo sblocco del peptide dalla resina, mentre le catene laterali dei residui Glu (in posizione N-terminale) e Asp rimanevano protette dalla funzione allile.

Il peptide [2P] è stato quindi sintetizzato su resina PAL utilizzando la normale chimica Fmoc. Ogni residuo (4.5 equiv.) è stato introdotto con un singolo coupling con irraggiamento di microonde (59W; 75°C) per 30 minuti, utilizzando come attivatore l'HBTU. Lo sblocco del peptide dalla resina e la successiva analisi HPLC-MS, non ha più rilevato il segnale del prodotto. Si osserva invece la presenza di un composto (con un buon grado di purezza, >50%) con massa esatta del peptide [2P]-58 uma. L'ipotesi, avvalorata da successive prove sperimentali, è che il peptide, in presenza di base e sottoposto a prolungato irraggiamento con microonde possa subire una ciclizzazione intramolecolare in seguito all'attacco nucleofilo dell'azoto dell'ammide (tra Glu e Asp) sull'estere allilico dello stesso Asp, con conseguente perdita della funzione allilica e formazione dell'aspartimmide (Figura 10). Effettivamente l'analisi di massa del peptide in seguito alla rimozione delle funzioni alliliche (e sblocco dalla resina) riporta la massa esatta meno una sola funzione allilica (anziché due, una sul residuo Asp(OAll) ed una sul Glu(OAll)). E' escluso che questa ciclizzazione avvenga tra l'ammina N-terminale e l'allile sul Glu in quanto in questo caso non sarebbe presente il gruppo -NH₂ terminale, mentre è stato sperimentalmente verificato che è possibile acetilare questa ammina. E' interessante notare come nella sintesi di questo peptide [2P], questa reazione secondaria, già descritta in letteratura¹², avvenga con resa quantitativa. E' probabile che la formazione dell'aspartimmide sia fortemente favorita da una rigida organizzazione spaziale che avvicina i due gruppi interessati.

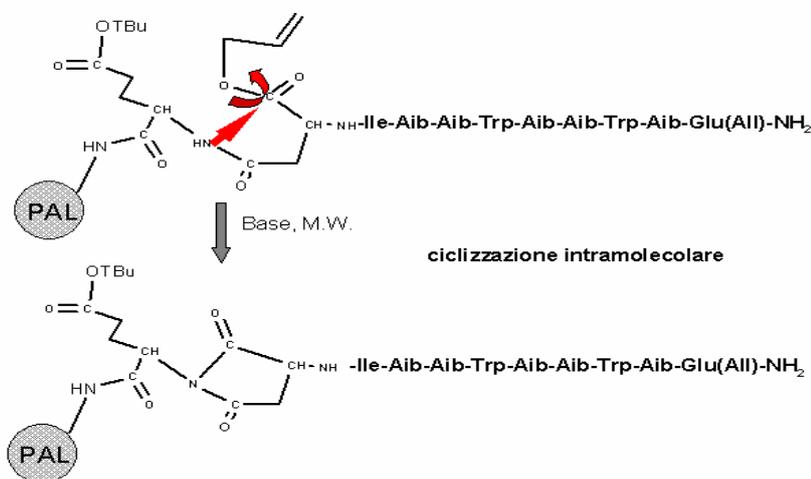


Figura 10. Reazione di ciclizzazione intramolecolare su resina PAL con formazione dell'aspartimmide.

In seguito a queste verifiche sperimentali la sequenza è stata modificata sostituendo il residuo Asp(All) con una Asn, presente anche nella sequenza naturale, considerando che il trietilenglicole e il glutammico rimasto dovrebbero essere sufficienti ad assicurare la solubilità del peptide. Ci si è quindi orientati verso la sequenza del peptide protetto **[3P]** (Tabella 1).

La sintesi di **[3P]** è stata condotta ancora su resina PAL, nelle medesime condizioni del precedente peptide **[2P]**, con un singolo coupling di 30 minuti di irraggiamento con MW, utilizzando HBTU come attivatore, e ottenendo lo sblocco del gruppo protettore Fmoc mediante reazione con una soluzione del 20% di piperidina in DMF, in presenza di HOBT 0.5M per inibire la formazione dell'aspartimmide. L'ultimo residuo, lo Fmoc-TEG-OH è stato legato a temperatura ambiente per una notte, utilizzando come attivatore PyBOP/HOBT. Dopo rimozione del gruppo protettore, l'ammina terminale è stata infine acetilata. L'analisi all'HPLC-MS dimostra chiaramente la formazione del prodotto con un grado di purezza molto elevato (85%, figura 11), senza reazioni di ciclizzazione indesiderate. E' interessante notare che questo tipo di procedura permette di ottenere il prodotto in poche ore, e senza la necessità di utilizzare attivatori (es. PyAOP, HATU..) particolarmente costosi. Con questa procedura è stato possibile ottenere una quantità sufficiente di peptide, anche se la resa non risulta molto elevata (circa 35%). E' probabile che anche la resina PAL non sia stabile ad un prolungato irraggiamento con MW.

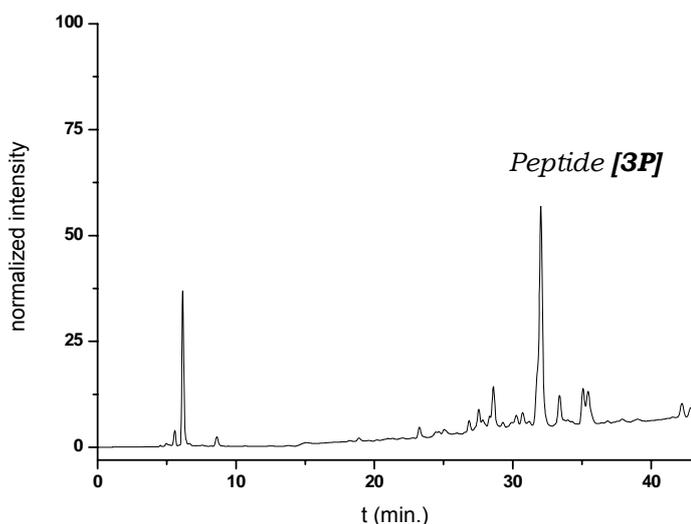


Figura 11. Spettro HPLC del peptide **[3P]** $\text{NH}_2\text{-CO-Glu(OH)-Asn-Ile-Aib-Aib-Trp-Aib-Aib-Trp-Aib-Glu(All)-TEG-NH-Ac}$ ottenuto dallo sblocco dalla resina PAL.

4.4 Analisi al dicroismo circolare del peptide [1]

In linea teorica, l'attività dell'inibitore progettato, dipenderà fortemente dalla capacità di questa sequenza di strutturarsi nella conformazione voluta. Per questo motivo è stata condotta un'analisi strutturale preliminare con studi di dicroismo circolare (CD). Nella figura 12 sono riportati i vari spettri CD ottenuti: il segnale in blu è stato ottenuto in tampone fosfato (PBS) a pH 7.0 e il segnale in rosso con l'aggiunta di TFE (25%). Un primo aspetto interessante è che il peptide risulta altamente solubile in solvente polare, inoltre ha una forte struttura secondaria che però non presenta i segnali diagnostici dell'elica 3_{10} , caratterizzata da due picchi negativi a 208 e 222 nm^{11b-d} ma probabilmente una struttura intermedia tra l'elica 3_{10} e l' α -elica. Aggiungendo il 25% di TFE, in ambiente meno polare, si nota uno spostamento dei segnali, verso i valori diagnostici per l'elica 3_{10} : è possibile ipotizzare che il peptide si possa strutturare nel modo desiderato in seguito all'interazione idrofobica con la sequenza bersaglio N-HR della gp41. L'assorbanza del peptide nell'esperimento di dicroismo circolare è, inoltre, fortemente influenzata dalla presenza di un cromoforo, quale il Trp ($\epsilon_{280\text{nm}} = 5500$). E' verosimile che per assegnare in modo univoco la struttura secondaria del peptide, si debbano condurre altre analisi (es. 2D-NMR).

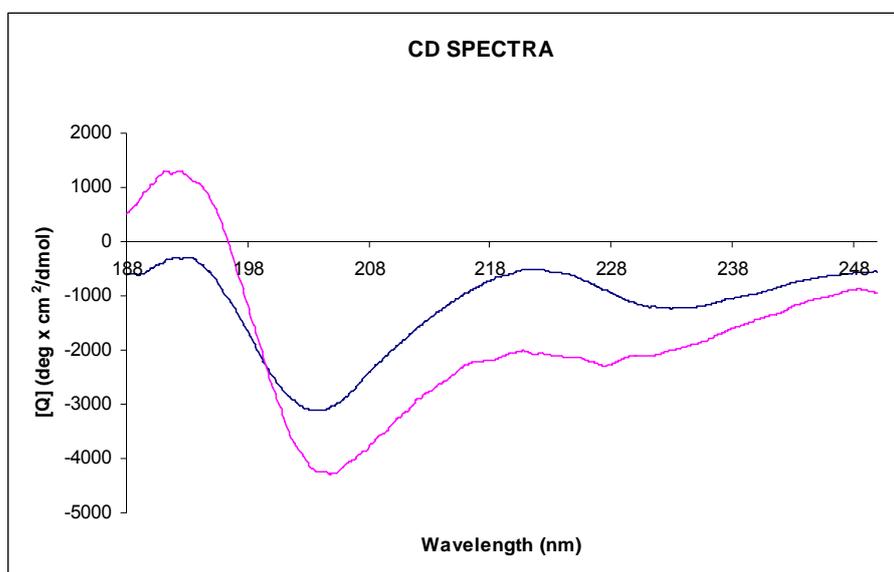


Figura 12. Spettro CD del **peptide [1]** AcNH-TEG-Glu-Aib-Trp-AibAib-Trp-AibAib-Ile-Asp-OH in tampone PBS pH7 (linea blu) e con il 25% di TFE (linea rossa).

4.5 Attacco del peptide mimetico della sequenza N-HR della gp41 [1] allo scaffold su fase solida

La seconda parte del progetto prevedeva la sintesi di un inibitore multivalente, funzionalizzando lo scaffold **1a** (1,3,5-tris-(amminoetil)-2,4,6-trietilbenzene) con tre peptidi **[1]** uguali. Utilizzando la metodologia sintetica descritta nel primo capitolo¹³, è stato possibile ottenere lo scaffold **1a** legato alla resina di Wang, funzionalizzato con tre residui di acido aspartico. Dopo rimozione dei gruppi protettori lo scaffold presenta tre gruppi amminici alle estremità, che vengono fatti reagire con uno spacer Fmoc-PEG(20)-OH di lunghezza pari a 20 atomi (Figura 13). A questo punto, in linea di principio, esistevano due diverse strategie per funzionalizzare la piattaforma molecolare con il peptide mimetico della sequenza N-HR. La prima era sintetizzare i tre peptidi facendoli crescere direttamente sullo scaffold, con una chimica Fmoc standard. La seconda era sintetizzare e purificare a parte il peptide **[3P]**, opportunamente protetto, per legarlo poi con un solo coupling allo scaffold sulla resina da cui, una volta rimossi i gruppi protettori, sarebbe stato possibile ottenere lo sblocco dell'inibitore multivalente progettato.

Inizialmente è stata seguita la prima strategia sintetica, operando con diversi attivatori (PyAOP; HATU; PyBOP) e in diverse condizioni (in presenza o in assenza di MW). Dalle prove sperimentali si nota chiaramente che, una volta legato il primo residuo Aib, indipendentemente dalle condizioni utilizzate nel coupling, la resa cala in modo inaccettabile. Con ogni probabilità questa via sintetica è fortemente limitata dalla necessità che ogni reazione sulle tre estremità dello scaffold avvenga contemporaneamente con rese superiori al 90-95% (cosa difficilmente ottenibile nella sintesi di peptidi contenenti amminoacidi tetrasostituiti). Per testare la seconda strategia sintetica è stato preventivamente sintetizzato e purificato il peptide **[3P]** (Tabella 1) con la catena laterale del residuo Glu (nella regione N-terminale) opportunamente protetta dalla funzione allile (resistente a trattamento con TFA). Il gruppo carbossilico libero sulla catena laterale del Glu nella posizione C-terminale è stato generato in seguito all'idrolisi dell'estere che ancorava il peptide alla resina.

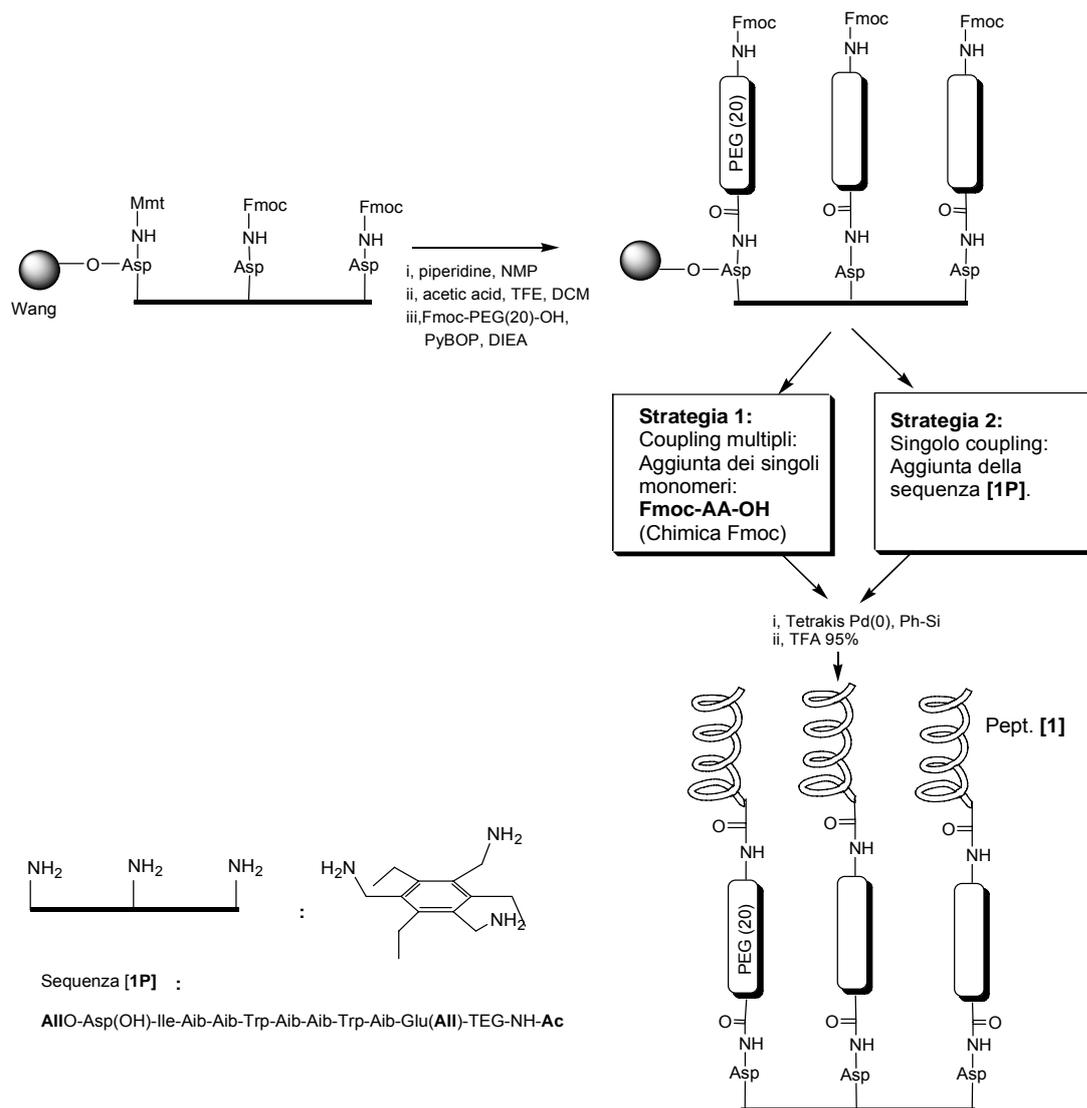


Figura 13. Strategie per la funzionalizzazione dello scaffold **1a** su fase solida con l'inibitore disegnato.

Una volta purificato il peptide **[3P]** è stato possibile procedere con il coupling dello stesso allo scaffold sulla resina. Inizialmente è stato condotto uno studio preliminare per selezionare le condizioni ottimali di reazione. A questo scopo si è eseguito un coupling tra lo scaffold **1a**, legato alla resina e funzionalizzato con il PEG(20) (**1a**-(Asp-PEG-NH₂)₃) e il residuo Fmoc-Asp(OH)-OAll (2 equiv.), utilizzando come attivatore PyBOP/HOBT (2.2 equiv.) in presenza di DIEA. L'analisi HPLC-MS del prodotto sbloccato dalla resina, porta alla formazione del composto desiderato (**1a**-(AlloAsp(Asp-PEG)-NH₂)₃) con resa quantitativa. Le stesse condizioni di reazione sono state utilizzate nel coupling su fase solida tra lo scaffold **1a**-(Asp-PEG-NH₂)₃ e il peptide protetto **[3P]** (2 equiv. 7.72 mmoli). In seguito la funzione allilica (utilizzata come gruppo protettore del Glu del peptide **[3P]**) è stata rimossa per trattamento riducente e il prodotto è stato sbloccato dalla resina. In questo caso

però, l'analisi HPLC-MS del grezzo di reazione ha rivelato la formazione del mono-adotto, mentre il di- e il tri-adotto, cioè il prodotto desiderato, erano presenti solo in tracce. L'ipotesi formulata è che le dimensioni e la forte struttura secondaria del peptide, possano aver sfavorito il coupling con lo scaffold sulla resina. Attualmente ci stiamo occupando di ottenere il peptide in quantità elevate, per ottimizzare la reazione con un maggiore eccesso di reagente ed in condizioni più spinte (coupling a 50°C per 2 giorni).

Sviluppi futuri

4.6 Sintesi dei peptidi da utilizzare per gli studi di attività

La parte finale di questo progetto prevedeva di studiare l'attività dell'inibitore in forma monomeric e multivalente, sia su un sistema modello sia in vitro.

L'idea era quella di studiare questo binding con uno studio ITC¹⁴ (Isothermal Titration Calorimetry) misurando il valore del calore scambiato (ΔH) nella titolazione di un modello della regione C-HR della gp41 con l'aggiunta dell'inibitore da studiare.

Come sistema modello si doveva sintetizzare il target trimerico ad α -elica (C-HR). In letteratura¹⁵ sono riportati diversi lavori per la sintesi di questa struttura, costituita essenzialmente da un peptide "chimera" con una regione N-terminale, derivata dalla proteina gp41, interessata nel binding con il recettore e una regione C-terminale, con una specifica sequenza (GCN4) in grado di indurre la formazione della tripla elica. Questo peptide chiamato "IZN17" di 41 amminoacidi, è stato sintetizzato su resina PAL, con coupling di 5 minuti con irraggiamento con microonde, attivatore HBTU. Il prodotto è stato ottenuto con un buon grado di purezza (>70%) caratterizzato con analisi MALDI e purificato in HPLC semipreparativa (colonna C4). E' stato anche sintetizzato il peptide di controllo "C16" corrispondente alla regione N-HR naturale della gp41, per avere un confronto negli studi delle attività di binding dell'inibitore (Figura 14). In questa sequenza è stato anche introdotto una Cys nella posizione N-terminale per consentire, se sarà necessario, il successivo inserimento di un probe fluorescente per studiare il binding per competizione⁷ con tecnica di fluorescenza polarizzata.

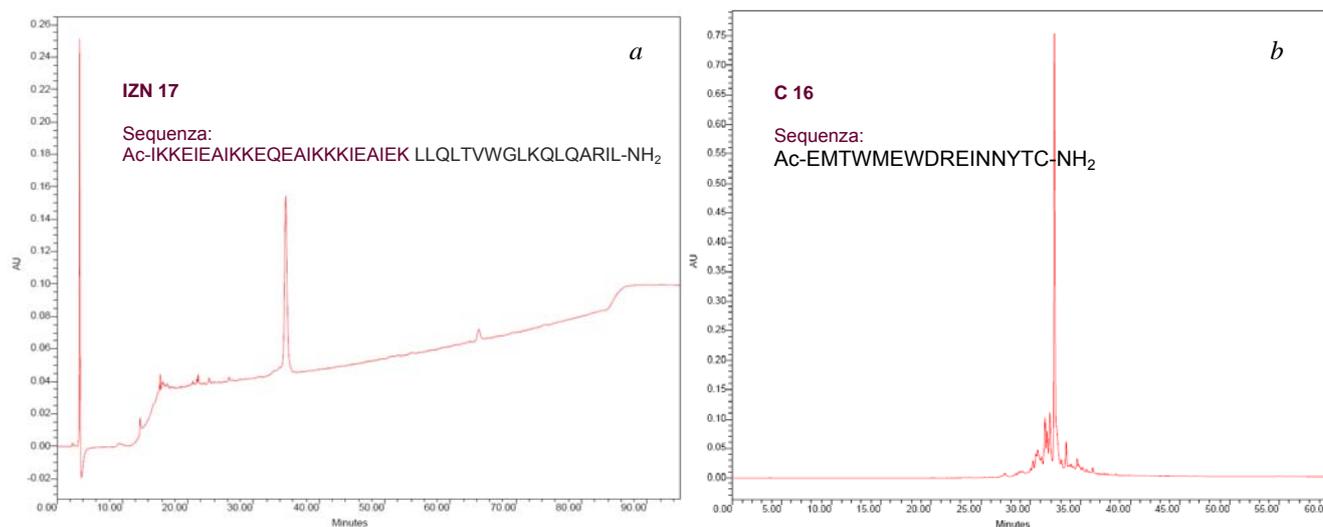


Figura 14. (a) Spettro HPLC C4 del peptide chimera (IZN 17) modello della regione C-HR. (b) spettro HPLC C4 del peptide wild type (C16) modello della regione N-HR della glicoproteina gp 41.

Attualmente sono in corso le misure ITC dell'inibitore sintetizzato in forma monomeric.

In seguito, grazie alla collaborazione con il laboratorio della prof. Ghirlanda (Phoenix), gli inibitori saranno studiati in alcune prove di fusione cellulare in vitro di linee cellulari mammifere, ingegnerizzate in modo da esporre il recettore gp41 dell'HIV-1.

Parte sperimentale

Le analisi riportate sono state ottenute nei laboratori dell'Università dell'Arizona (Phoenix) durante una collaborazione con la prof. Giovanna Ghirlanda. I solventi e i prodotti commerciali sono stati generalmente usati tal quali, senza ulteriori purificazioni.

4.7 Materiali e strumentazione

Gli spettri CD sono stati ottenuti con uno spettrometro J-710 (Jasco). I campioni sono stati preparati in tampone PBS 0.02M, pH 7, (anche con l'aggiunta del 25% di TFE) con una concentrazione di peptide tra 1.14×10^{-4} M e 0.86×10^{-4} M.

Gli spettri di massa sono stati ottenuti con uno spettrometro MALDI-TOF Voyager-DE™.

La sintesi dei peptidi su fase solida è stata condotta con riscaldamento con microonde, utilizzando uno strumento manuale CEM Discover SPS e un sintetizzatore automatico CEM Discover Library.

4.8 Procedura sintetica generale per la sintesi del peptide [3] e [3P] Nella sintesi, come supporto solido è stata utilizzata la resina commerciale PAL (5[4-(amminometil)-3,5-bis(metossi)-fenossi] acido valerico, 35-100 mesh) con un loading di 0.38 mmol/g. Il residuo Fmoc-AibAib-OH è stato sintetizzato con la procedura presente in letteratura^{11b}. Nella sintesi su fase solida è stato utilizzato il protocollo standard per la sintesi peptidica con la chimica Fmoc. Ciascun residuo è stato introdotto con un doppio coupling, il primo di 30 min. di riscaldamento con microonde (59W; 75°C) ed il secondo di 5 min. (59W; 75°C). Come attivatore è stato utilizzato l'HBTU (5 equiv.) in presenza di DIEA (9 equiv.) in una soluzione di DMF/NMP (7/1). Lo sblocco del gruppo protettore Fmoc è stato ottenuto in una soluzione del 20% di piperidina in DMF (in presenza di HOBT 0.5 M). L'ultimo residuo, lo Fmoc-TEG-OH (3 equiv.) è stato introdotto con un coupling a temperatura ambiente per una notte, utilizzando come attivatore PyBOP/HOBT (3.1 equiv.), in presenza di DIEA (7 equiv.) in una soluzione di DMF/NMP (7/1). L'ammina terminale è stata infine acetilata con anidride acetica (9 equiv), DIEA (9 equiv.) in DMF. A questo punto per ottenere la sequenza **[3P]** è stato sbloccato il peptide dalla resina con una miscela di TFA 95% (H₂O 5%). La sequenza **[3]** è stata invece ottenuta trattando il peptide su resina con una soluzione di Tetrakis(trifenilfosfina) palladio(0) (0.2 equiv.) e fenilsilano (15 equiv.) in CH₂Cl₂. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione per 2 ore in atmosfera inerte (in flusso di N₂). Dopo alcuni step di lavaggio (CH₂Cl₂, 2×), NMP/DIEA = 4/1 (2× 20 min), NMP (2×) and CH₂Cl₂ (2×), il peptide **[3]** è stato sbloccato dalla resina con una miscela di TFA 95% (H₂O 5%).

4.9 Caratterizzazione

Peptide [1]: AcNH-TEG-Glu-Aib-Trp-Aib-Aib-Trp-Aib-Aib-Ile-Asp-OH. Sono stati ottenuti 3.1 mg di un solido bianco con una resa <5% (grado di purezza, dal rapporto delle aree dei segnali all'HPLC: 35%) dopo purificazione con RP-HPLC. HPLC (Vydac C4; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 34 al 57% in 60 min, detector UV a 226 nm): 16.5 min (100%). MALDI-TOF [M+Na]⁺ teorica: 1382.65; trovata sperimentalmente: 1381.91.

Peptide [3]: NH₂CO-Glu(OH)-Asn-Ile-Aib-Aib-Trp-Aib-Aib-Trp-Aib-Glu-TEG-NHAc.

Sono stati ottenuti 2.4 mg di un solido bianco con una resa dell'84% dopo purificazione con RP-HPLC. HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 43 al 57% in 30 min, detector UV a 226 nm): 8.9 min (>95%). ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 1487.745; trovata sperimentalmente: 1487.731.

Peptide [3P]: NH₂CO-Glu(OH)-Asn-Ile-Aib-Aib-Trp-Aib-Aib-Trp-Aib-Glu(All)-TEG-NHAc.

Sono stati ottenuti 11.8 mg di un solido bianco con una resa dell'85% dopo purificazione con RP-HPLC. HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 10 al 75% in 30 min, detector UV a 226 nm): 32.7 min (>95%). ESI-MS [M+H]⁺ teorica: 1527.777; trovata sperimentalmente: 1527.751.

Peptide IZN 17: Ac-IKKEIEAIKKEQEAIKKKIEAIEKLLQLTVWGLKQLQARIL-NH₂

Sono stati ottenuti 2.3 mg di un solido bianco con una resa >80% (dopo purificazione con RP-HPLC (Vydac C4; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 45 all'80% in 75 min, detector UV a 226 nm): 36.2 min (100%). MALDI-TOF [M+H]⁺ teorica: 4855.3; trovata sperimentalmente: 4856.246.

Peptide C16: Ac-EMTWMEWDREINNYTC-NH₂

Sono stati ottenuti 4.3 mg di un solido bianco con una resa >85% (dopo purificazione con RP-HPLC (Vydac C4; gradiente: H₂O/TFA (0.1%)– CH₃CN/TFA (0.1%) dal 29 al 55% in 60 min, detector UV a 226 nm): 34.1 min (100%). MALDI-TOF [M+H]⁺ teorica: 2161.87; trovata sperimentalmente: 2163.71.

Bibliografia

- ¹ (a) Chan, D.C.; Kim, P.S. *Cell*. **1998**, *93*, 681.(b) Zwick, M.B.; Saphire, E.O.; Burton, D.R. *Nature Med.* **2004**, *10*, 133.(c) Markosyan, R.M.; Ma, X.; Cohen, F.S.; Melikyan, G.B. *Virology* **2002**, *302*, 174. (d) Gallo, S.A.; Finnegan, C.M.; Viard, M.; Raviv, Y.; Dimitrov, A.; Rawat, S.S.; Puri, A.; Durell, S.; Blumenthal, R. *Biochim.Biophys.Acta-Biomembranes* **2003**, *1614*, 36.
- ² Melikyan, G.B.; Markosyan, R.M.; Hemmati, H.; Delmedico, M.K.; Lambert, D.M.; Cohen, F.S. *J.Chem.Biol.* **2000**, *151*, 413.
- ³ (a) Pöhlmann, S.; Reeves, J.D. *Curr.Pharm.Design* **2006**, *12*, 1963. (b) Krambovitis, E.; Porichis, F.; Spandidos, D.A. *Act.Pharm.Sin.* **2005**, 1165.
- ⁴ Manfredi, R.; Sabbatani, S. *Curr.Med.Chem.* **2006**, *13*, 2369.
- ⁵ Chan, D.C.; Chutkowski, C.T.; Kim, P.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 15613. Sia, S.K.; Kim, P.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9756.
- ⁶ (a) Eckert, D.M.; Malashkevich, V.N.; Hong, L.H.; Carr, P.A.; Kim, P.S. *Cell* **1999**, *99*, 103. (b) Sia, S.K.; Carr, P.A.; Cochran, A.G.; Malashkevich, V.N.; Kim, P.S. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **2002**, *99*, 14664.
- ⁷ Stephens, O.M.; Kim, S.; Welch, B.D.; Hodsdon, M.E.; Kay, M.S.; Schepartz, *J.Am.Chem.Soc.* **2005**, *127*, 13126.
- ⁸ Ernst, J.T.; Kutzki, O.; Debnath, A.K.; Jiang, S.; Lu, H.; Hamilton, A.D. *Angew.Chem.Int.Ed.* **2002**, *41*, 278.
- ⁹ Ferrer, M.; Kapoor, T.M.; Strassmaier, T.; Weissenhorn, W.; Skehel, J.J.; Oprian, D.; Schreiber, S.L.; Wiley, D.C.; Harrison, S.C. *Nature Struct.Biol.* **1999** *6*, 953.
- ¹⁰ Weissenhorn, W.; Desson, A.; Harrison, S.C.; Skehel, J.J.; Wiley, D.C. *Nature* **1997**, *387*, 426. Chan, D.C.; Fass, D.; Berger, J.M.; Kim, P.S. *Cell*,
- ¹¹ (a) Karle, I.L.; Balarams, P. *Biochem.* **1990**, *29*, 6747 (b) Haynes, S.R.; Hagijs S. D.; Juban, M.M.; Elzer, P.H.; Hammer, R.P. *J. Peptide Res.* **2005**, *66*, 333. Bellanda, Mammi, (c) Pengo, P.; Pasquato, L.; Moro, S.; Brigo, A.; Focolari, F.; Broxterman, O.B.; Kaptein, B.; Scrimin, P. *Angew.Chem.Int.Ed.* **2003**, *42*, 3388 (d) S.; Geremia, S.; Demitri, N.; Randaccio, L.; Broxterman, Q.B.; Kaptein, B.; Pengo, P.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 407.
- ¹² Yang Y.; Sweeney, W.V.; Schneider, K.; Thörnqvist, S.; Chait B.T.; and Tam, J.P. *Tet.Lett.* **1994**, *35*, 9689.
- ¹³ (a) Guarise, C.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 11670. (b) Guarise, C.; Zaupa, G.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *J.Org.Chem.* **2008**, *Submitted manuscript*.
- ¹⁴ Samuel, K. S.; Peter, A. C.; Andrea, G.C.; Vladimир N.M.; Peter, S. K. *PNAS*, **2002**, *23*, 14664.
- ¹⁵ Debra, M. E.; Peter S.K. *PNAS*, **2001**, *98*, 11187.