

Alma Mater Studiorum
Università degli Studi di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACEUTICHE

Ciclo XX

Settore scientifico disciplinare di afferenza: **CHIM/06**

**ARCHITETTURE SUPRAMOLECOLARI DI
GUANOSINE SEMISINTETICHE PER LO
“SCAFFOLDING” DI GRUPPI FUNZIONALI**

Dott.ssa Carla Graziano

Coordinatore Dottorato

Prof. Maurizio Recanatini

Relatore

Prof. Gian Piero Spada

Esame finale anno 2008

INDICE

Capitolo 1. La Chimica Supramolecolare	1
1.1. Introduzione	1
1.2. Autoassemblaggio	1
1.3. Sistemi biologici supramolecolari	3
1.4. Chiralità supramolecolare	4
1.4.1. Sintesi diastereo-selettiva non covalente	4
1.4.2. Autoassemblaggio enantio-selettivo	6
Capitolo 2. Strutture supramolecolari elicoidali	9
2.1. Introduzione	9
2.2. Costruire supereliche da piccole molecole: qualche esempio pratico	9
2.3. Amplificazione chirale	12
Capitolo 3. G-Quartetti	16
3.1. Introduzione	16
3.2. G-quartetti in biologia molecolare e in chimica farmaceutica	17
3.2.2. G-quartetti e la replicazione del DNA	18
3.2.3. Inibitori della telomerasi stabilizzazione dei G-quartetti e terapia antineoplastica	18
Capitolo 4. Chimica supramolecolare dei derivati della guanosina	20
4.1. Introduzione	20
4.2. Autoassemblaggio di nucleotidi e oligonucleotidi guanidinici in acqua	20
4.3. Autoassemblaggio di derivati lipofili delle Guanosine (lipoG)	24
4.4. Chiralità supramolecolare dei derivati della guanosina	27
4.5. Autoassemblaggio di guanosine lipofile in assenza di cationi	29
4.6. Proprietà elettroniche dei derivati lipofili della guanosina	31
Capitolo 5. Nucleosidi modificati: autoassemblaggio di derivati lipofili della 8-ossoguanosina e 8-ossosinosina	35
5.1. Introduzione	35
5.2. Derivati lipofili della 8-ossoguanosina	37
5.2.1. Fasi liquido-cristalline	37
5.2.2. Autoassemblaggio in soluzione	40

5.2.3 Autoassemblaggio su superficie	43
5.2.4. Autoassemblaggio allo stato solido	43
5.2.5. Proprietà elettroniche	45
5.3. I derivati lipofili della 8-ossoinosina	47
5.3.1 Sintesi e autoassemblaggio dei derivati della 8-ossoinosina	48
5.4. Conclusioni	55
Capitolo 6. L'elica delle 8-ossoguanosine come template per lo scaffolding di gruppi funzionali	57
6.1. Introduzione	57
6.2. Elica supramolecolare delle 8-ossoguanosine ed acidi organici	58
6.3. Chimica supramolecolare della 2',3'-O-isopropiliden-8-ossoguanosina un'indagine preliminare	60
Capitolo 7. G-quadruplex per lo scaffolding di radicali persistenti: switch di interazioni spin-spin intermolecolari controllato dalla disponibilità del catione.	64
7.1. Introduzione.	64
7.2. Sintesi di derivati paramagnetici delle guanosine	64
7.3. Autoassemblaggio in presenza di cationi	67
7.4. Switch, controllato dal catione, dell'interazione di spin intermolecolare nel derivato supramolecolare di una guanosina paramagnetica.	72
Capitolo 8. Parte sperimentale	78

Capitolo 1. La Chimica Supramolecolare.

1.1. Introduzione.

Diverse sono le definizioni che si possono dare e sono state date per classificare la Chimica Supramolecolare come branca specifica delle scienze naturali, alcune più poetiche altre nettamente rigorose¹⁻⁴. A quarant'anni dalla sua nascita ufficiale, grazie alla fantasia e alla caparbia di ricercatori appartenenti alle più svariate discipline (chimici organici, inorganici, analitici, biochimici, biologi, scienziati dell'ambiente, ingegneri, fisici dei materiali e teorici) si è riusciti a dimostrare quanto le interazioni non covalenti siano un efficace, versatile ed affidabile strumento sintetico per l'ottenimento di architetture molecolari complesse e definite.

Scopo di questa tesi è illustrare come la nostra capacità di immagazzinare informazioni a livello molecolare sfruttando i processi e i metodi della sintesi chimica per ottenere molecole complesse e funzionalizzate, possa essere promossa a livello supramolecolare e garantirci il controllo dell'organizzazione spaziale dei materiali.

1.2. Autoassemblaggio.

I componenti di una struttura supramolecolare sono strutture complementari sia dal punto di vista sterico che elettronico e, nel caso più semplice di un complesso bimolecolare, si può fare riferimento ad essi come substrato ed accettore. Il legame selettivo di un substrato al suo recettore per dare una supramolecola implica il processo di riconoscimento molecolare attraverso una serie di interazioni intermolecolari strutturalmente ben definite. In una struttura recettoriale tipo, il riconoscimento molecolare consiste nella formazione di legami deboli tra i gruppi funzionali del substrato e i gruppi con cui è stato funzionalizzato il recettore al fine di garantire la complementarità. Diversi fattori intervengono in maniera determinante nel riconoscimento molecolare recettore-substrato: innanzitutto la complementarità, che dipende dalla struttura tridimensionale delle due molecole con un corretto posizionamento ed orientamento dei siti di legame; poi, la superficie di contatto tra substrato e recettore; tutti risultano essere determinanti sia per quanto riguarda la selettività che per quanto riguarda la stabilità del complesso. Progettare un recettore molecolare significa concepire e realizzare una molecola che possieda tali requisiti⁵.

Nel caso di sistemi che implicino un maggior numero di molecole ci si riferisce all'analogo fenomeno con il termine autoassemblaggio che pone l'accento su di una più estesa cooperatività delle interazioni.

L'autoassemblaggio è il processo con il quale specifiche componenti si associano spontaneamente a dare un'architettura supramolecolare complessa e definita.

La generazione spontanea di architetture complesse è guidata dal riconoscimento molecolare tra due o più subunità complementari, allorché queste presentino specifiche proprietà ottiche, elettriche, magnetiche o di legame l'organizzazione in una struttura sopramolecolare complessa comporterà l'assunzione di nuove caratteristiche.

In relazione alla natura delle subunità coinvolte, l'aggregazione può dare origine ad oligomeri composti da un numero discreto di molecole o ad assemblati polimolecolari estesi tipo film, strati molecolari, cristalli liquidi.

Differenti tipi di legami possono contribuire alla formazione di aggregati sopramolecolari: legami di coordinazione con ioni metallici, forze elettrostatiche, legami a idrogeno, effetti solvofobici, interazioni di van der Waals, interazioni donatore-accettore. Essi, ad eccezione del legame di coordinazione, implicano forze che singolarmente risultano essere molto più deboli di un legame covalente ma che complessivamente determinano una variazione entalpica favorevole all'associazione e sufficiente a compensare la diminuzione di entropia del sistema associata all'assemblaggio di molteplici unità chimiche a dare una singola specie. Ne deriva una struttura supramolecolare termodinamicamente meno stabile, più labile e dinamicamente più flessibile rispetto a strutture legate da legami covalenti. La riproducibilità di tali interazioni ci permette di riferirci ad essi come sistemi auto-organizzanti, ossia capaci di generare spontaneamente sistemi supramolecolari definiti dall'autoassemblaggio dei loro costituenti molecolari ⁶. Più specificatamente la capacità delle molecole autoassemblanti di riconoscersi ed organizzarsi autonomamente in strutture supramolecolari di dimensioni nanometriche è il principio base su cui si fondano le nanoscienze che rende possibile l'ottenimento e lo studio delle proprietà dei nanomateriali e delle loro applicazioni aprendo l'orizzonte della scienza alle nanotecnologie ⁷.

1.3. Sistemi biologici supramolecolari.

Molte strutture biologiche si originano spontaneamente per autoassemblaggio di strutture chimiche più semplici: L'assunzione della struttura quaternaria nelle proteine globulari idrosolubili deriva dall'associazione di più catene polipeptidiche tramite legami non covalenti, l'emoglobina è solo uno degli esempi possibili, esistono tra le proteine casi anche più complessi: la proteina di rivestimento del virus del mosaico del tabacco è una proteina globulare che ha ben 2120 subunità associate non covalentemente in una specifica struttura; le proteine fibrose come il collagene essendo caratterizzate da una struttura secondaria più regolare hanno la capacità di aggregarsi a dare complessi privi, almeno teoricamente, di un limite massimo dimensionale. Il complesso biologico supramolecolare più celebre è sicuramente il DNA. Quello a cui generalmente ci si riferisce come la molecola del DNA è infatti un aggregato di due distinte macromolecole polinucleotidiche trattenute insieme da interazioni non covalenti. L'appaiamento tra le basi è il migliore esempio di come fattori geometrici e specificità elettronica delle interazioni determinino l'assunzione della struttura supramolecolare garantiscano la funzionalità della struttura stessa.

La Natura ci dimostra come gli intenti del nostro lavoro, così come definito in precedenza, siano realizzabili: è possibile immagazzinare e trasferire informazioni sfruttando sistemi capaci di riconoscersi e rispondere a specifici stimoli e interagire tra loro (DNA), è possibile ideare e creare macchine molecolari efficienti per le funzioni cui sono preposte (enzimi), quindi dalla Natura dobbiamo imparare come fare. Da questa punto di vista mimare e riprodurre i sistemi biologici può essere visto come il vero obiettivo del chimico organico che si interessa di chimica supramolecolare ⁸.

Un aspetto da approfondire è come in natura i sistemi più specializzati siano chirali. Ad esempio molti enzimi catalizzano la reazione di uno solo degli stereoisomeri possibili allorché il loro substrato è chirale. Ciò dimostra quanto la disposizione spaziale di atomi e molecole possa influire su un sistema chimico. D'altro canto è ben noto che i sistemi biologici si compongono di soli L-amminoacidi e D-zuccheri, questa è una condizione indispensabile per la funzionalità delle biomolecole come dimostrato dal fatto che proteine che inglobino in maniera random D-amminoacidi non funzionano così come dovrebbero e acidi ribonucleici Levo non originano in ambiente fisiologico le strutture necessarie alla replicazione e alla trascrizione del codice genetico. L'origine dell'omochiralità delle biomolecole ⁹ resta uno dei campi più affascinanti della ricerca scientifica, ma altrettanto interessante ed utile potrebbe essere carpire i segreti dell'omochiralità per poterli applicare.

1.4. Chiralità supramolecolare.

La chiralità a livello molecolare deriva dalla assenza di simmetria riflessiva e fa riferimento alla presenza di uno stereocentro o all'assenza di piani di simmetria e, attraverso i suoi descrittori, illustra una specifica ed unica disposizione degli atomi nello spazio. Isomeri che si differenziano non per la connettività tra i loro atomi, ma per la sola disposizione spaziale degli stessi sono stereoisomeri e si dividono in enantiomeri (non sovrapponibili con la loro immagine speculare) e diastereomeri (che non sono l'immagine speculare l'uno dell'altro).

Analoga è la definizione della chiralità a livello supramolecolare, si tratta sempre di oggetti disposti in maniera dissimetrica, in questo caso la dissimetria può originarsi dalle proprietà dei componenti molecolari (si autoassemblano componenti chirali) oppure dal fatto che molecole achirali assemblino in un'architettura che risulti priva di piani di simmetria ^{10, 11}.

1.4.1. Sintesi diastereo-selettiva non covalente

Il metodo generale per controllare la chiralità a livello supramolecolare è l'introduzione di un centro chirale tra i *Building-Blocks* del sistema stesso. Ciò produrrà due differenti specie che sono in relazione tra loro come due diastereomeri. Si parla in questo caso di induzione asimmetrica o di sintesi diastereomerica non covalente.

Ad esempio in soluzione organica i calixareni riportati in figura 1 legano acidi barbiturici in strutture a doppia rosetta con stechiometria 3: 6 si ottengono oggetti che sono intrinsecamente chirali perché i due residui melamminici si orientano rispetto al calixarene in maniera antiparallela, ciò determina un twist tra le due rosette che potrà essere destrorso (P) o sinistrorso (M).

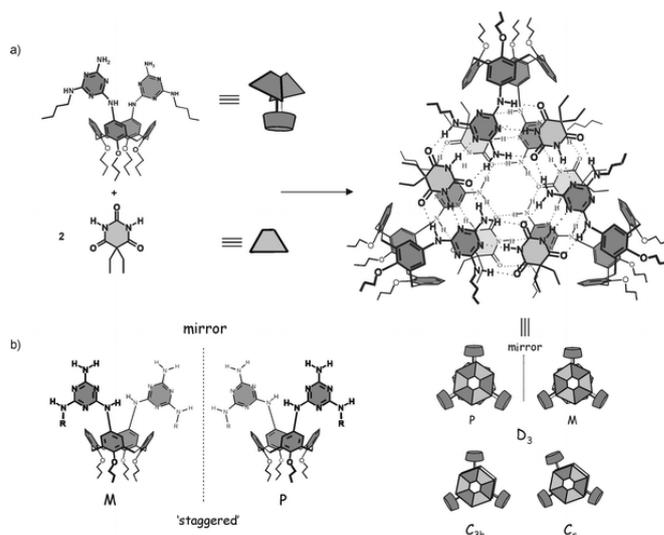


Figura 1.1. a) Formazione di doppie rosette da calixareni funzionalizzati con residui melamminici

b) Rappresentazione tridimensionale del calixarene con i residui melamminici antiparalleli

La sintesi selettiva di uno solo dei due diastomeri può essere ottenuta in differenti modi:

- Si possono introdurre centri chirali nella struttura supramolecolare usando un acido barbiturico chirale
- Un acido o un diacido chirale può essere aggiunto in soluzione dopo che si sia avuta l'aggregazione dei componenti achirali.

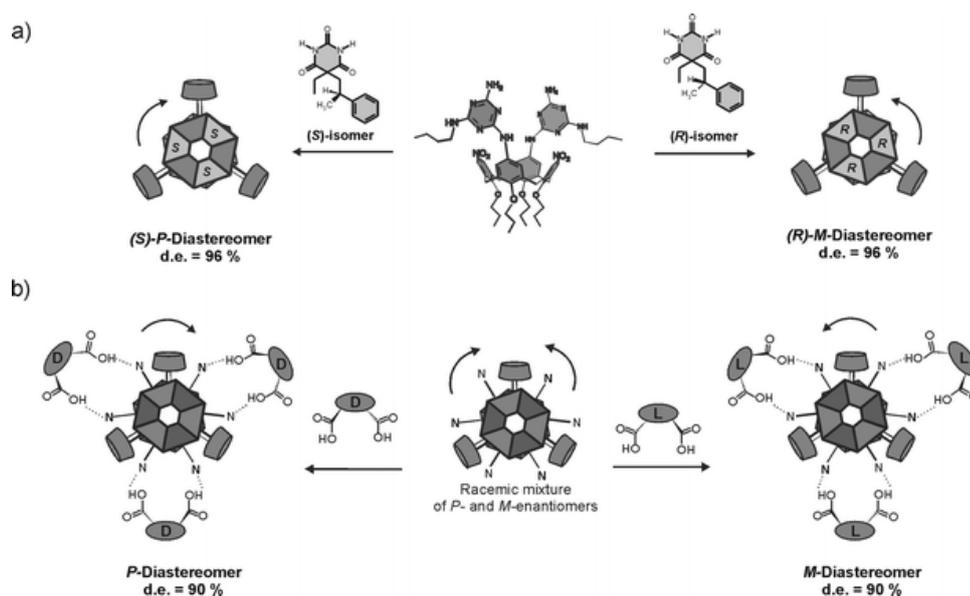


Figura 1.2. Sintesi diastereo selettiva di doppie rosette per complessazione con un acido barbiturico chirale (a) e per complessazione di diacidi carbossilici chirali (b).

1.4.2. Autoassemblaggio enantio-selettivo.

L'autoassemblaggio enantio-selettivo riferisce alla capacità di molecole che abbiano la stessa chiralità di riconoscersi in un sistema racemico generando la formazione di sistemi omochirali, è alla base del processo che permette la separazione di miscele racemiche per cristallizzazione ma oltre che allo stato solido è stata riscontrata anche in soluzione, in cristalli liquidi e in strati molecolari.

Riferendoci al sistema di cui al sottocapitolo 1.4.1, se un centro chirale viene introdotto sul calixarene da una miscela di (S,S) ed (R,R), si avrà la formazione di soli aggregati supramolecolari omochirali.

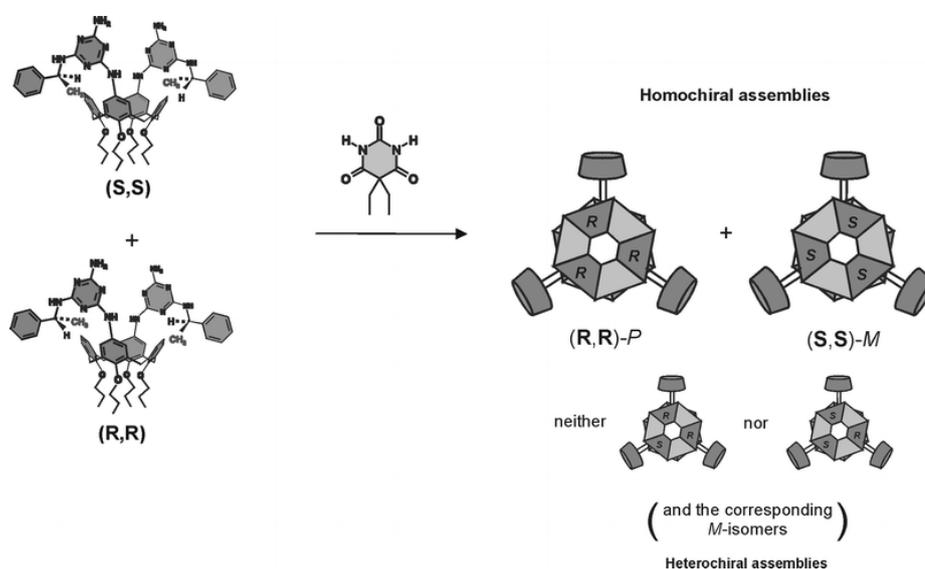


Figura 1.3. Risoluzione spontanea di doppie rosette in soluzione da una soluzione racemica dei componenti molecolari

Per ottenere lo stesso risultato si possono sfruttare anche altre proprietà dei sistemi supramolecolari.

La memoria chirale si riferisce alla capacità di questi di conservare la configurazione preferenziale indotta dalla presenza di un elemento chirale allorché questo viene rimosso o rimpiazzato. In figura 1.4 si riporta un esempio di competizione con un acido cianurico achirale, l'interazione di questo con i residui melamminici è più forte così rispetto al barbiturato che viene completamente spiazzato e si forma un assemblato enantiopuro. Risultati soddisfacenti possono essere ottenuti anche la formazione di una doppia rosetta in maniera dicastero-selettiva con un diacido chirale che poi sarà precipitato per salificazione con un' ammina.

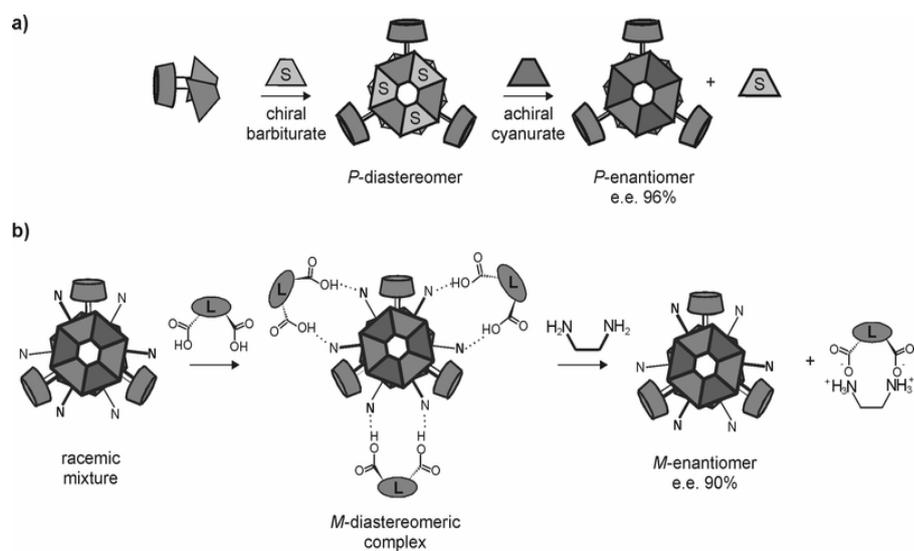


Figura 1.4. Rappresentazione schematica di sintesi enantioselettiva per induzione con un acido barbiturico chirale-sostituzione con un acido cianurico chirale (a) e per complessazione- precipitazione di un acido di carbossilico.

L' amplificazione chirale segue anche il principio così detto "sergeant and soldiers" drogando il sistema con un numero limitato di molecole chirali si induce un eccesso enantiomerico poiché le unità achirali verranno forzate a seguire il senso indotto dall' aggregazione di quelle chirali.

Bibliografia.

1. J.-M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 89.
2. J.L. Atwood, J.E. Davies, D.D. MacNicol, F. Vogtle and J.-M. Lehn, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Pergamon, Oxford, **1996**.
3. J. Steed and J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, Wiley New York, **2000**.
4. P. Levi, *La chiave a stella*, Einaudi, Torino, **1978**, p. 151.
5. R.J. Fitzmaurice, G. M. Kyne, D. Douheret and J. D Kilburn, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*, **2002**, 841.
6. L. F. Lindoy and I. M. Atkinson, *Self Assembly in Supramolecular Systems*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2000**.
7. E. Menna, *Innovare*, **2001**, 1, 18.
8. R. Fiammengo, M. Crego-Calama and D. N. Reinhoudt, *Curr. Op. Chem Biol.*, **2001**, 5, 660–673.
9. W. A. Bonner, *Origins Life Evol. Biosphere*, **1991**, 21, 59.
10. M. A. Mateos-Timoneda, M. Crego-Calama and D. N. Reinhoudt, *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, 33, 363.
11. A. R. A. Palmans and E. W. Meijer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 8948.

Capitolo 2. Strutture supramolecolari elicoidali.

2.1. Introduzione.

Differenti sistemi biologici vedono la loro funzionalità legata indissolubilmente alla capacità di assumere spontaneamente in condizioni fisiologiche una suprastruttura elicoidale ¹.

Costruire supereliche da piccole molecole sfruttando interazioni non covalenti è intuitivamente un metodo efficace per trasferire ed amplificare la chiralità molecolare a livello supramolecolare. La fattibilità di questo intento è stata per altro ampiamente supportata dai risultati ottenuti nello studio dell'amplificazione chirale in macromolecole polimeriche che adottino una conformazione elicoidale come i poliisocianati ².

Differenti assemblati supramolecolari elicoidali sono stati ottenuti negli ultimi anni sfruttando differenti tipi di interazioni, in questa breve trattazione si vuole dare una visione generale dello stato dell'arte con un interesse rivolto verso le possibili applicazioni dei sistemi illustrati.

2.2. Costruire supereliche da piccole molecole: qualche esempio pratico.

Fukushima e Aida hanno riportato un sistema nel quale forze di natura essenzialmente solvofobica inducono l'aggregazione di un *esa-peri*-esabenzocoronene (**1**) in un doppio strato molecolare e successivamente verso un livello di compattazione maggiore fino ad ottenere nanotubi passando per una struttura elicoidale ³.

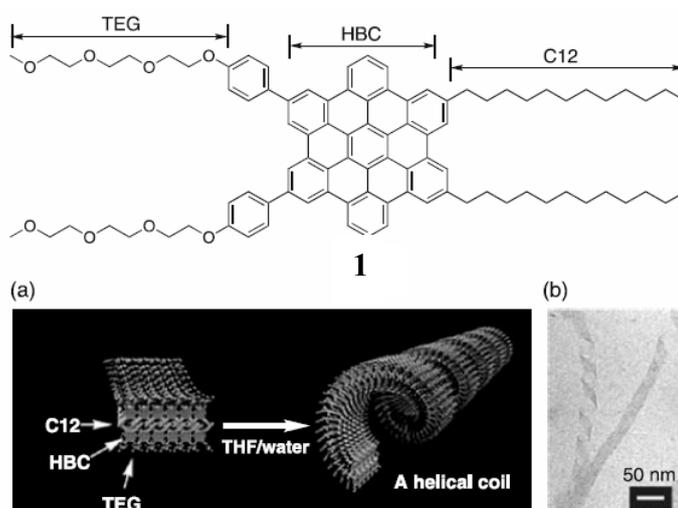


Figura 2.1: Rappresentazione schematica della formazione di un nanotubo di **1** in THF (a), immagine STM dello stesso in cui è evidente come la struttura elicoidale sia uno step intermedio nella formazione di un nanotubo (b).

Essendo questa molecola achirale chiaramente l'aggregazione produrrà una miscela racemica di eliche sinistrorse e destrorse, ma se un centro chirale viene introdotto sulla catena, sarà la chiralità della molecola a governare il senso dell'elica così come illustrato in figura 1.

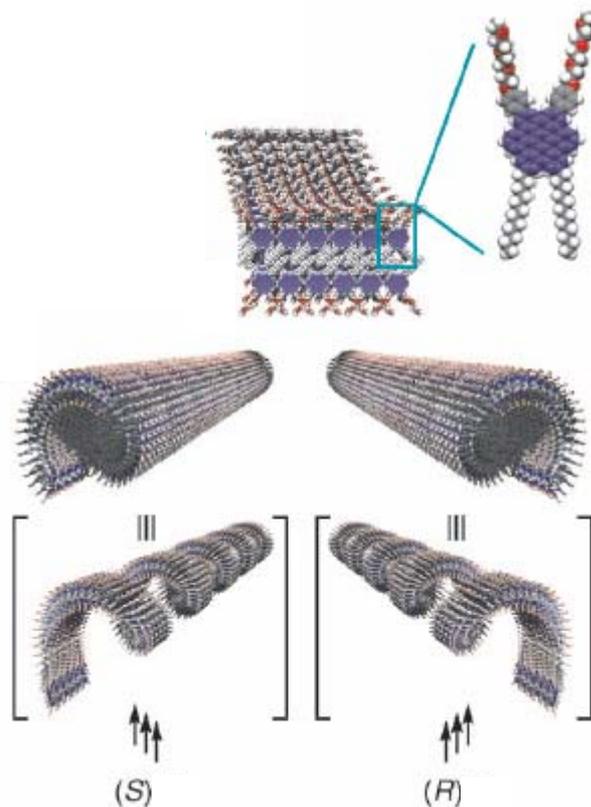


Figura 2.2: Rappresentazione schematica della formazione di nanotubi chirali ottenuti per trasposizione della chiralità molecolare in chiralità supramolecolare.

Essendo stata dimostrata l'importanza della disposizione elicoidale della matrice esagonale nei nanotubi di carbonio ai fini di garantire la loro conduttività⁴, è logico candidare questo sistema ad applicazioni nel campo delle nanotecnologie ed in particolar modo sembrerebbe poter realizzare il concetto di solenoide molecolare. Riprodurrebbe cioè a livello molecolare il comportamento di un solenoide macroscopico, un insieme di spire ravvicinate di materiale conduttore che se attraversato da corrente elettrica si comporta come un magnete a sbarra delle stesse dimensioni generando un campo magnetico uniforme al suo interno

Gli eliceni sono molecole rigide caratterizzate, come suggerisce il loro stesso nome, da un intrinseco carattere elicoidale, che in opportune condizioni possono aggregare in strutture di dimensioni discrete. È il caso della struttura riportata in figura 2.3 in cui si illustra schematicamente come l'elicene enantiopuro **2** funzionalizzato con un chinone alle estremità possa generare un'elica nella trattenuto da interazioni π - π ⁴.

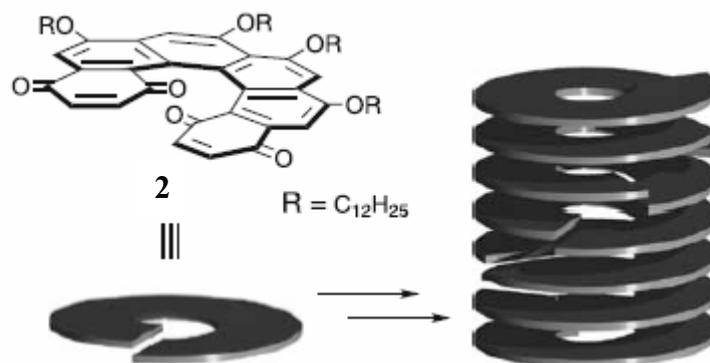


Figura 2.3: Formazione di un'elica supramolecolare da un elicene enantiopuro.

In alcuni casi differenti forze partecipano in maniera cooperativa alla formazione di una struttura supramolecolare complessa, i sistemi assemblanti possono cioè essere progettati per interagire tra loro attraverso differenti forze di legame, un esempio elegante è l'assemblamento di un oligo(*p*-fenilenvinilene) (OPV) chirale funzionalizzato con una ureidotriazina (**3**) proposto da Meijer⁵ (figura 2.4).

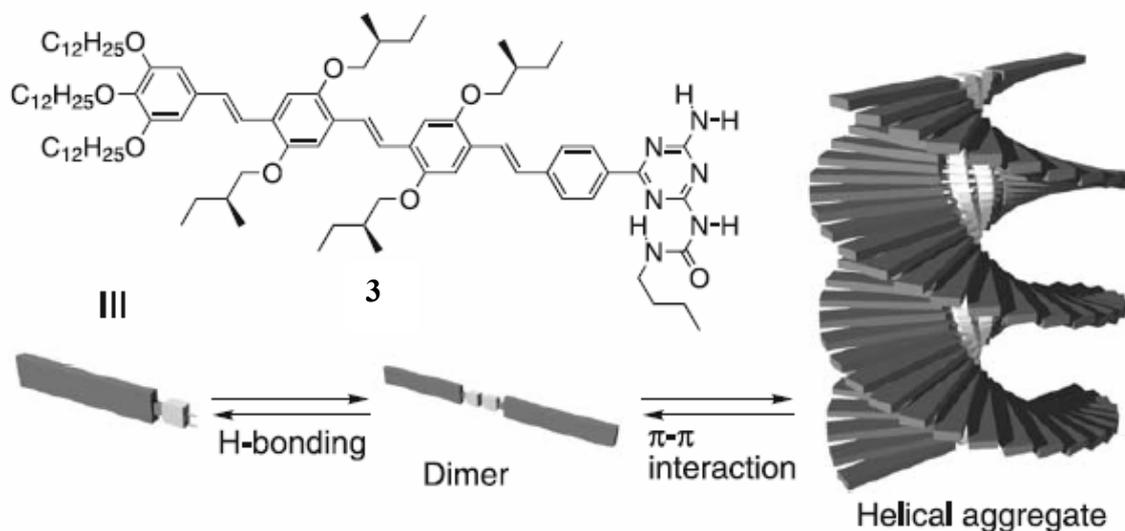


Figura 2.4: Rappresentazione schematica della formazione di un'elica supramolecolare dall' OPV **3** chirale.

Il riconoscimento molecolare è mediato dalle unità ureido-triaziniche che permettono la dimerizzazione; successivamente la struttura si accresce lungo l'asse perpendicolare a quello definito dal piano su cui giace il dimero per interazione π - π avvolgendosi a spirale.

Si noti come nella testa triazinica si alternino gruppi donatori e gruppi accettori di legami a idrogeno in un sistema pressoché planare, questo la rende particolarmente versatile come elemento di riconoscimento permettendole non solo l'autoriconoscimento e quindi la

dimerizzazione, ma anche di legare molecole diverse che soddisfino semplici requisiti geometrici (planarità, opportuna distanza dei siti di legame). Questa caratteristica è stata sfruttata per ottenere strutture di maggiore complessità: in ambiente apolare ad esempio questo sistema riconosce e lega stabilmente il perilene bisimmide riportato in figura 5 secondo una stechiometria 2:1 e per stacking genera una struttura elicoidale ⁶.

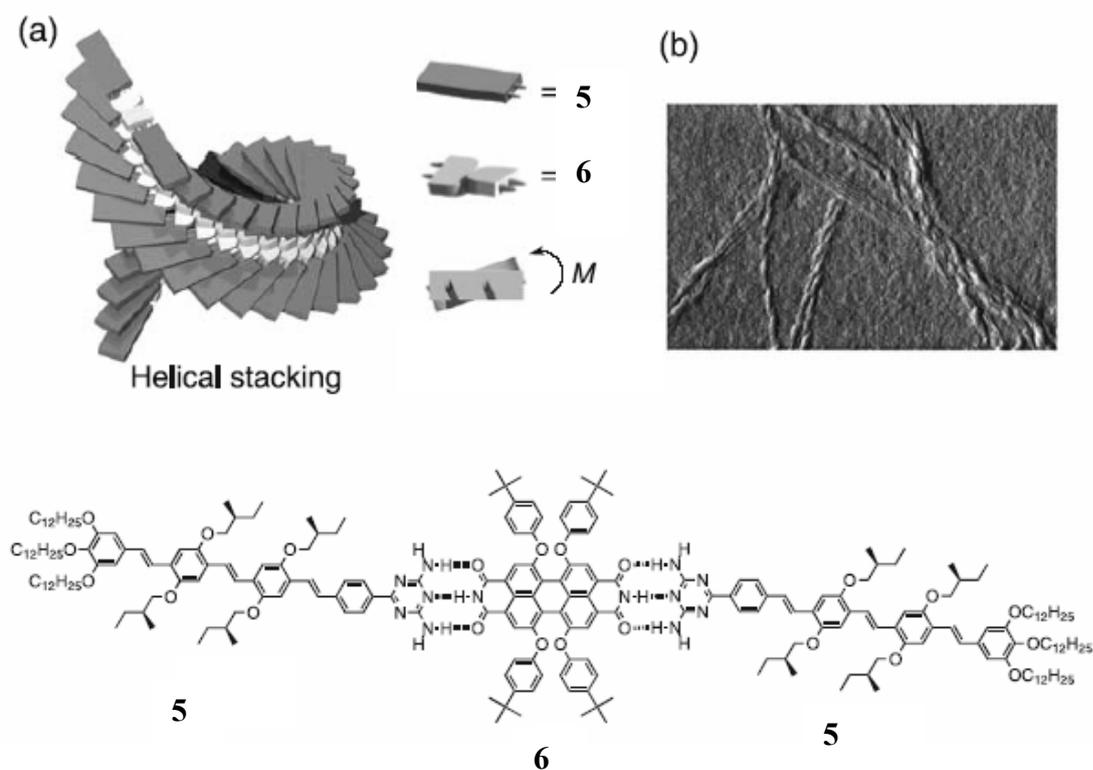


Figura 2.5. Formazione del complesso 2:1 di 5 e 6 e rappresentazione dello stacking chirale in ambiente apolare.

2.3. Amplificazione chirale.

È già stato accennato nel capitolo 1 a come l'enantioselettività a livello supramolecolare possa essere ottenuta per amplificazione chirale. Questo concetto sviluppato per l'ottenimento selettivo di eliche destrorse e sinistrorse da materiali polimerici è stato applicato con successo anche sistemi supramolecolari.

In Figura 2.6 si riporta l'illustrazione schematica di come una molecola composta due teste ureidotriaziniche legate da uno spacer di opportune dimensioni (7), autoassembli in acqua in strutture colonnari elicoidali per stacking di dimeri trattenuti da legami a idrogeno. La presenza del linker sembrerebbe essere essenziale per garantire un'alta concentrazione di residui aromatici che favorisca lo stacking: si creerebbe così un ambiente idrofobo che

sistemi può essere sfruttata anche per testare la chiralità molecolare. La molecola (**9**) forma spontaneamente un sistema esamerico trattenuto da legami a idrogeno che poi assembla a formare una miscela racemica di elementi colonnari a carattere elicoidale di senso destrorso e sinistrorso. La funzionalizzazione con un etere corona rende possibile la coordinazione di amminoacidi lungo la supramolecola, l'aggiunzione di un amminoacido chirale, ad esempio la L-Alanina, indurrà selettivamente l'assunzione di un senso dell'elica e l'interazione col suo enantiomero determinerà il senso opposto ciascuno dei quali corrisponderà ad uno specifico segnale di dicroismo anche questi in rapporto speculare tra loro. Tutti gli amminoacidi aventi la stessa configurazione produrranno un effetto Cotton dello stesso segno nello spettro CD, permettendo così per confronto con l'assorbimento differenziale indotto dall'amminoacido a configurazione nota, la determinazione della configurazione assoluta⁸.

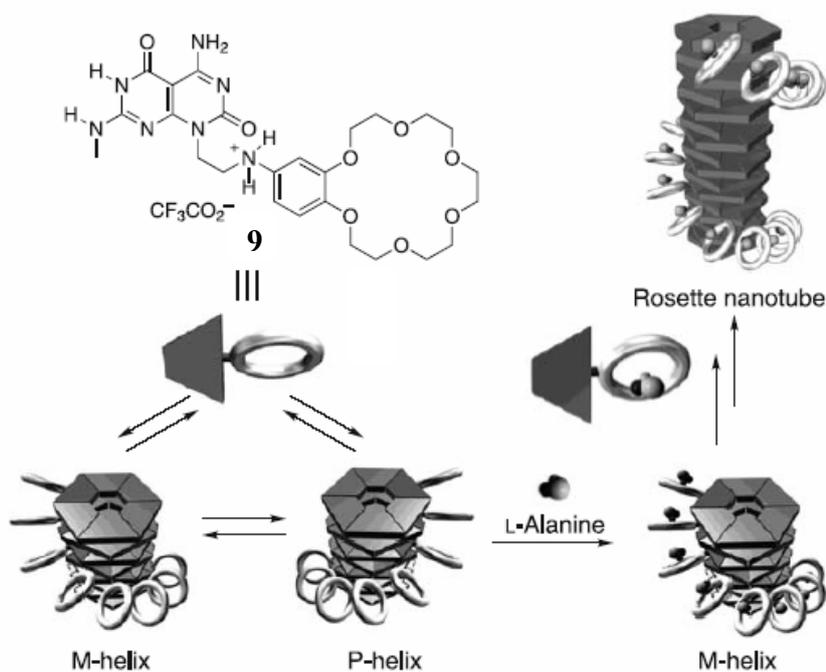


Figura2.7. Formazione di rosette sinistrorse di **9** per interazione con L-Alanina.

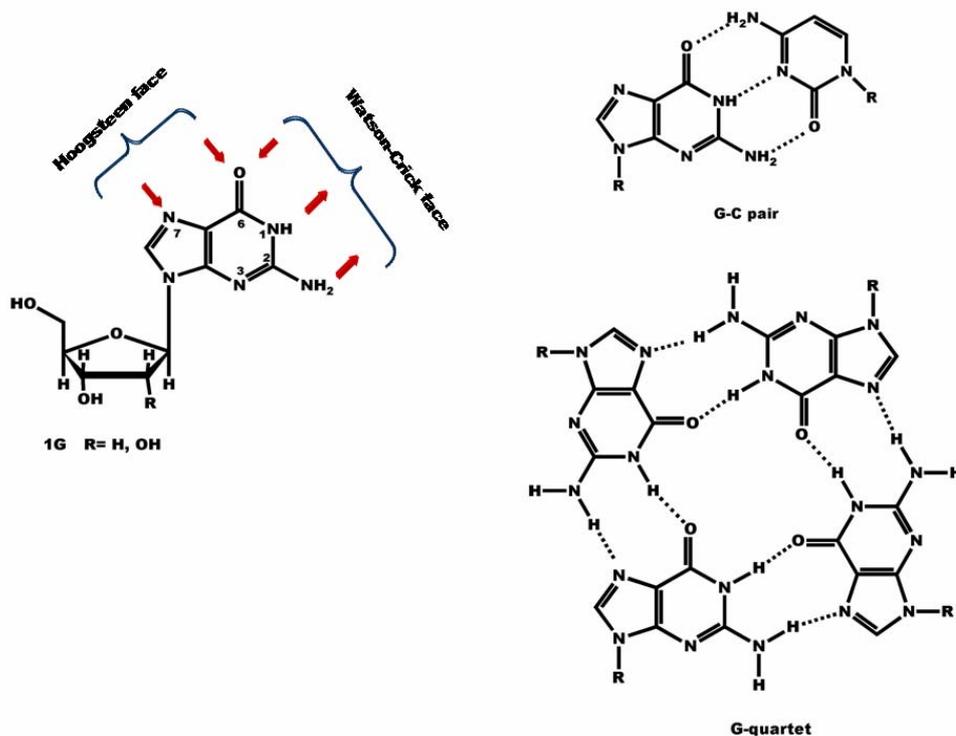
Bibliografia:

1. R.R. Saenden, *DNA Structure and Function*, Academic Press, New York, **1994**; D.R. Eyre, *Science* **1980**, *207*, 1315; A. Klug, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 565.
2. M M. Green, J.W. Park, T. Sato, A. Teramoto, S. Lifson, R.L.B. Selinger, J.V. Selinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3138.
3. W. Jin, T. Fukushima, M. Niki, A. Kosaka, N. Ishii, T. Aida, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 10801.
4. C. Nuckolls, T.J. Katz, G. Katz, P.J. Collings, L. Castellanos, *J Am Chem Soc*, **1999**, *12*, 79.
5. C.R.L.P.N. Jeukens, P. Jonkheijm, F.J.P. Wijnen, J.C. Gielen, P.C.M. Christianen, A.P.H.J. Schenning, E.W. Meijer, J.C. Maan, *J Am Chem Soc*, **2005**, *127*, 8280.
6. F. Wurthner, Z.J. Chen, F.J.M. Hoeben, P. Osswald, C.C. You, P. Jonkheijm, J. von Herrikhuyzen, A.P.H.J. Schenning, P.P.A.M. van der Schoot, E.W. Meijer, E.H.A. Beckers, S.C.J., Meskers, R.A.J. Janssen, *J Am Chem Soc*, **2004**, *126*, 10611.
7. J.H.K.K. Hirschberg, L. Brunsveld, A. Ramzi, J.A.J.M. Vekemans, R.P. Sijbesma, E.W. Meijer, *Nature*, **2000**, *407*, 167.
8. H. Fenniri, B.L. Deng, A.E. Ribbe, *J Am Chem Soc*, **2002**, *124*, 11064.

Capitolo 3. G-Quartetti.

3.1. Introduzione.

Il riconoscimento tra i filamenti del DNA nel modello a doppia elica di Watson-Crick è determinato dal preciso appaiamento delle basi che garantisce la corretta replicazione del DNA stesso; interazioni simili giocano un ruolo importante anche nella stabilizzazione di superstrutture di RNA. Anche se l'appaiamento secondo Watson-Crick è il più famoso e più comune sistema di legame delle nucleobasi altri sono possibili¹. Una particolare attenzione va dedicata ai sistemi di legame Hoogsteen che coinvolgono la faccia adiacente a quella coinvolta nelle interazioni Watson-Crick delle basi puriniche e cioè quella compresa tra il C6 e l'N7. Tra le basi puriniche, la guanina essendo l'unica avere due gruppi accettori di legami a idrogeno disposti sulla faccia Hoogsteen della molecola (N7 e O6), due donatori su quella adiacente (N1-H e N2-H) sembra essere stata preprogrammata dalla Natura per l'autoassemblaggio e può generare differenti sistemi (dimeri, nastri, macrocicli, ...). In particolare se i gruppi donatori N1-H e N2-H di una molecola si legano agli accettori N7 e O6 di un'altra molecola di guanosina adiacente si origina un macrociclo planare detto G-quartetto.



Schemal

3.2. G-quartetti in biologia molecolare e in chimica farmaceutica.

I G-quartetti si possono formare in vitro da oligonucleotidi di DNA e RNA aventi una sequenza di basi analoga sia a quella delle estremità telomeriche dei cromosomi che delle regioni promotrici dei geni, sia dei siti di ricombinazione o dei domini di dimerizzazione dell'RNA. Si è molto discusso riguardo ad un loro ruolo funzionale nelle cellule viventi. La scoperta dell'esistenza di proteine capaci di interagire con i G-quartetti e di facilitarne la formazione e che la forma B del DNA può convertirsi in G-quadruplex intermolecolari a determinate concentrazioni di cationi e l'esistenza di un'elicasi che svolge i G-quartetti sembrerebbero indicare che i G-quartetti sono strutture che si assemblano e disassemblano in maniera controllata e funzionale all'interno delle cellule.

3.2.1. Struttura del DNA a quadrupla elica.

La quadrupla elica del DNA (quadruplex) si può formare per assemblaggio intramolecolare o per associazione di due o quattro filamenti ricchi in guanosina. Deriva dallo stacking idrofobico di quartetti legati secondo lo schema Hoogsteen di legami ad idrogeno ed è stabilizzata dalla coordinazione da uno cationi (Na^+ o K^+) alloggiati tra due quartetti impilati trattenuti da un'interazione catione-dipolo con gli otto ossigeni carbossilici che sporgono all'interno della cavità che l'accoglie.

Differenti tipi di G-quadruplex sono stati isolati in vitro: sequenze ricche in guanosina possono interagire secondo Hoogsteen dando strutture secondarie caratterizzate da differenti geometrie (figura 3.1).

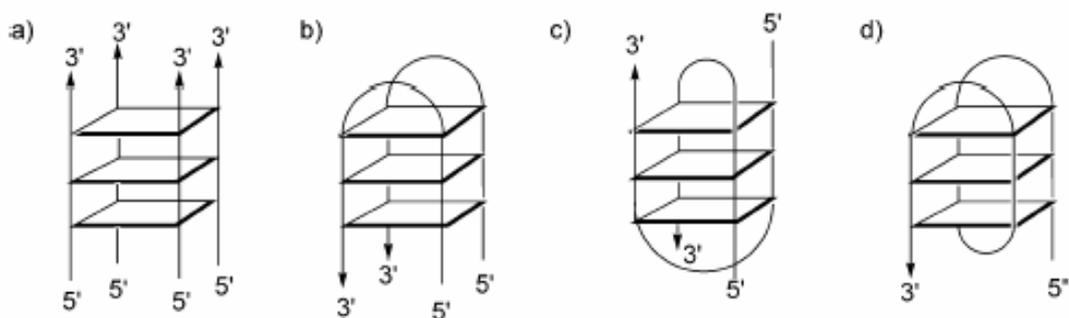


Figura 3.1. Differenti tipi di strutture del DNA a G-quartetto: a) G-quartetto tetramolecolare a filamenti paralleli, b) G-quartetto bimolecolare parallelo, c) G-quartetto con loop diagonale, d) G-quartetto monomolecolare.

3.2.2. G-quartetti e la replicazione del DNA.

I telomeri sono le terminazioni dei cromosomi, caratterizzati da sequenze ripetute che terminano in un segmento a filamento singolo all'estremità 3' ricco in guanosina.

Il mantenimento dell'integrità dei tratti a filamento singolo è essenziale per la cellula perché impedisce fusioni testa-testa tra i telomeri o erosioni le quali sono causa di instabilità genomica ed invecchiamento².

La telomerasi è una trascrittasi inversa la cui attività dipende dalla presenza di una molecola di RNA che è parte integrante dell'enzima e fornisce uno stampo mobile che supplisce all'assenza dello stampo di DNA nella parte terminale a filamento singolo durante la replicazione. La telomerasi riconosce e lega l'estremità 3', allunga il DNA di circa 100 nucleotidi che vengono utilizzati come stampo per la sintesi del filamento complementare ad opera della DNA-polimerasi, e si riposiziona in modo da far ripartire nuovamente il processo. Questo meccanismo garantisce l'integrità dei telomeri anche durante cicli ripetuti di replicazione cellulare. Durante la traslocazione della telomerasi il DNA assume transitoriamente una struttura a G-quartetto che sembrerebbe essere fondamentale affinché si abbia lo slittamento del DNA telomerico neosintetizzato dallo stampo di RNA, ma tuttavia i G-quartetti devono disassemblarsi perché il DNA telomerico possa subire in un altro ciclo di replicazione.

3.2.3. Inibitori della telomerasi: stabilizzazione dei G-quartetti e terapia antineoplastica.

In una cellula sana i telomeri si accorciano gradualmente ad ogni ciclo di divisione cellulare funzionando come un orologio biologico che limita l'intervallo di tempo nel quale la cellula può replicarsi.³

Le cellule tumorali aggirerebbero questo limite attraverso l'espressione di una telomerasi. Tale ipotesi è confermata dal fatto che in circa l'85% dei tumori l'enzima telomerasi è attivo e provvede a mantenere costante la lunghezza dei telomeri e da studi in vitro che hanno dimostrato che l'induzione dell'espressione di una telomerasi può causare la trasformazione di una cellula sana in una cellula maligna.

Un sistema per inibire la telomerasi potrebbe essere quello di bloccare l'interazione enzima-substrato. Perché tale interazione avvenga occorre che gli estremi 3' del DNA telomerico a singolo filamento siano lineari e distesi, la formazione dei G-quartetti impedisce il legame della telomerasi al DNA e quindi blocca l'allungamento dei telomeri. L'inibizione della telomerasi dipende quindi dall'equilibrio tra il DNA telomerico a singolo filamento e i G-quadruplex e un sistema per ottenere lo spostamento verso la forma ripiegata è quello di

stabilizzare i G-quartetti attraverso il legame di piccole molecole. Tali molecole note come inibitori della telomerasi (figura 3.2) sono tutti composti aromatici con sistemi ciclici poveri di elettroni la cui elettroneficanza può essere compensata dall'impilamento con i G-quartetti.

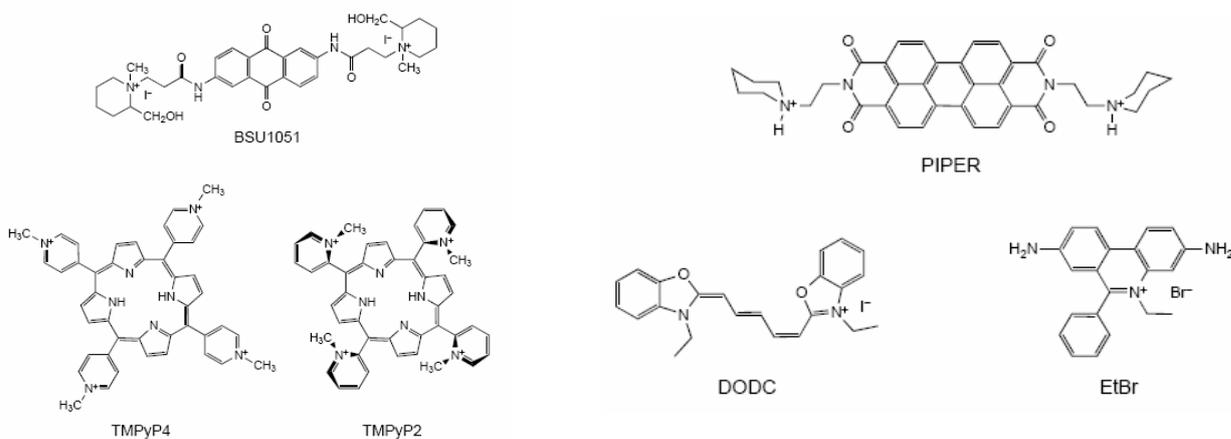


Figura 3.2. Esempi di differenti inibitori della telomerasi. Abbreviazioni:

- DODC, 3,3'-diethyloxadicarbocyanine; EtBr, ethidium bromide;
- PIPER, N,N'-bis [2-(1-piperidino)-ethyl]-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic diimide;
- TMPyP2, tetra-(N-methyl-2-pyridyl)porphine;
- TMPyP4, tetra-(N-methyl-4-pyridyl)porphine.

Sono stati proposti due modelli di interazione: uno prevede che gli inibitori intercalino tra i G-quartetti, l'altro che si impilino all'estremità: studi spettroscopici e cristallografici indicano che entrambe le modalità di interazione sono possibili.⁵

Molti composti sono stati individuati e studiati: antrachinoni, porfirine, perilene, bromuro di etidio, derivati delle acridine. Tra questi le porfirine hanno attirato maggiormente l'attenzione perché manifestano una buona selettività e quindi una minore tossicità e penetrano e si accumulano nei tessuti tumorali molto di più che in quelli sani.

Bibliografia.

1. J.L. Sessler, C.M. Lawrence, J. Jayawickaramajah, *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 314.
2. S. Borman, *Science/Technology*, **1998**, 5, 42.
3. T. De Lange, *Science*, **1998**, 279, 33.
4. D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 627.

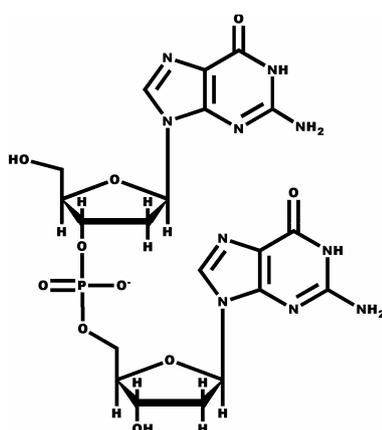
Capitolo 4. Chimica supramolecolare dei derivati della guanosina.

4.1. Introduzione.

Lo studio del comportamento delle guanosine è partito all'inizio degli anni ottanta¹ dall'analisi delle strutture liquido cristalline di nucleosidi e oligonucleosidi in soluzione acquosa e si è rivelato essere un lungo e proficuo filone di ricerca che ha permesso di chiarire molti aspetti strutturali dei sistemi supramolecolari delle guanosine e anche di proporre applicazioni pratiche delle conoscenze maturate.

4.2. Autoassemblaggio di nucleotidi e oligonucleotidi guanidinici in acqua.

L'attenzione nei confronti delle guanosine nasce dall'osservazione di fasi colesteriche ed esagonali in soluzioni acquose delle 2'deossiguanosina-(3'-5')-2'deossiguanosina o d(GpG), (G2), con una dipendenza dalla concentrazione che a temperatura ambiente risultava essere: Iso-2.5%-Chol-18%-Hex. Ciò è sorprendente se si considera che un analogo comportamento si può riscontrare nell'analisi di frammenti di DNA composti da almeno 100 paia di basi. Successivamente sono studiati sia i monomeri guanosina monofosfato che gli oligomeri superiori fino all'esamero d(GpGpGpGpGpGp) e in tutti casi si sono potuti osservare al microscopio ottico le due fasi liquido cristalline².



G2

Il liomesomorfismo del DNA può essere interpretato assimilandolo ad un cilindro avente una superficie idrofila con un core idrofobo, tali oggetti chirali possono interagire con un ordine di tipo colesterico o esagonale al variare della concentrazione. Questo modello in una prima analisi sembrava non poter essere esteso agli oligonucleotidi oggetto di studio poichè implica

un allungamento della molecola lungo un asse maggiore che non si riscontra in un dinucleotide.

Studi ai raggi X chiarirono che gli oggetti responsabili della formazione delle mesofasi sono strutture colonnari chirali con un diametro pari a 25 Å e le misure di diffrazione evidenziarono anche una periodicità di 3.4 Å, tipica dello stacking di sistemi aromatici.

Il diametro misurato è indicativo della formazione di G-quartetti secondo lo schema di legami a idrogeno di Hoogsteen e il passo compatibile con quello misurato nell'elica a quattro filamenti di acido poliguanilico, nella quale le molecole sono legate da ponti fosfodiesterici.³

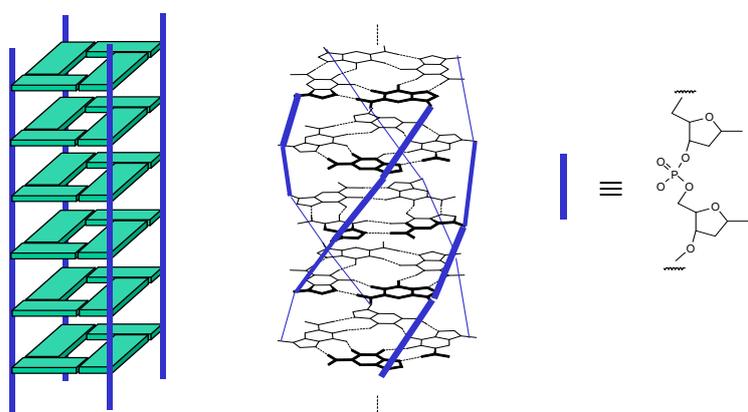


Figura 4.1. Rappresentazione schematica dell'elica a quattro filamenti dell'acido poliguanilico.

Se ne dedusse che gli oggetti molecolari in questione dovevano avere una struttura simile e si ipotizzò un iniziale assemblamento in tetrameri (figura 4.2), che avrebbe dato origine a G-quartetti isolati nel caso della guanosina monofosfato, o a G-quartetti legati da ponti fosfodiesterici nel caso degli oligoguanilati, i quali per sovrapposizione avrebbero dato lunghe strutture colonnari.

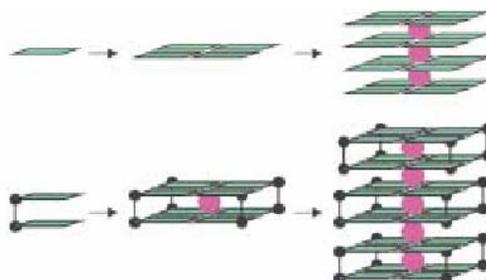


Figura 4.2. Rappresentazione schematica dell'autoassemblaggio di guanosine monofosfato (in alto) e di dimeri d(GpG) in basso.

Restava da chiarire quale elemento facesse da cementante tra i G quartetti di guanosina monofosfato e anche tra gli oligomeri in cui erano presenti pochi legami fosfodiesterici.

La soluzione definitiva al problema si ebbe con l'analisi cristallografica dell'esanucleotide d(TG₄T) svolta da Laughlan ⁴: due sistemi a quadruplo filamento si impilano coassialmente con polarità opposta legati da uno di ione sodio a dare un' elica a quadruplo filamento composta dai soli residui guaninici, le timine sporgono verso l' esterno (figura 4.3).

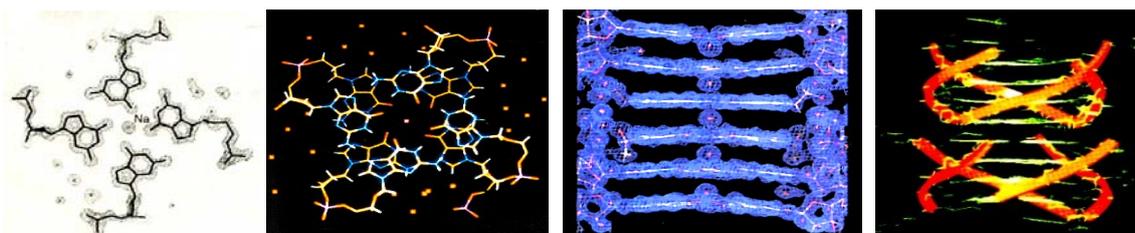


Figura 4.3. Risoluzione cristallografica della struttura a quartetti impilati di d(TG₄T).

In soluzione acquosa mono e oligonucleotidi della guanosina si assemblano a formare G-quartetti. La distanza tra il centro dei G-quartetti e i quattro ossigeni carbossilici è circa di 2.8 Å, la distanza tra due tetrametri è 3.3 Å, si crea così una cavità perfetta per la coordinazione dello ione K⁺ il cui raggio ionico è pari a 1.33 Å. Ciò permette ai G-quartetti di impilarsi l'uno sull'altro separati tra loro da uno ione anche in assenza di legami fosfodiesterici. In maniera analoga alla struttura del DNA, i G- quartetti ruotano gli uni rispetto agli altri di un angolo positivo o negativo dando origine a strutture elicoidali destrorse o sinistrorse. Incrementando la concentrazione questi oggetti interagiscono a dare due differenti mesofasi: a basse concentrazioni i sistemi colonnari mantengono un certo grado di libertà di movimento e la loro chiralità superficiale dà origine ad una fase colesterica, ad alte concentrazioni le deboli forze chirali sono vinte dalla limitazione dello spazio disponibile e si visualizza un arrangiamento di tipo esagonale (figura 4.4).

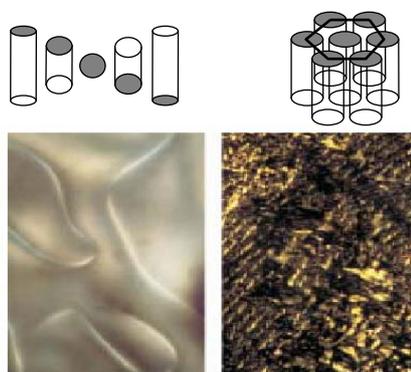


Figura 4.4. Tessiture osservate per il composto G₂ in soluzione acquosa: mesofase colesterica (a sinistra) ed esagonale (a destra).

Il ruolo cruciale degli ioni sodio e potassio è confermato dal fatto che all'aumentare della loro concentrazione si osserva un aumento della stabilità degli aggregati colonnari e una diminuzione della concentrazione critica alla quale la fase liquido cristallina si forma ⁵.

Il processo di autoassemblaggio dei derivati della guanosina può essere facilmente indagato attraverso il dicroismo circolare ⁶. Un esempio viene mostrato in figura 4.7, in cui sono riportati gli spettri CD delle diverse specie formate dall'aggregazione di d(Gp) in acqua a tre differenti temperature ⁷. A 30°C lo spettro corrisponde alla specie non assemblata, a 5°C alla specie colonnare in cui è evidente un couplet negativo nella regione di assorbimento della guanosina correlabile allo stacking sinistrorso di G-quartetti adiacenti, a 1°C appare un segnale negativo molto intenso dovuto alla formazione della mesofase colesterica.

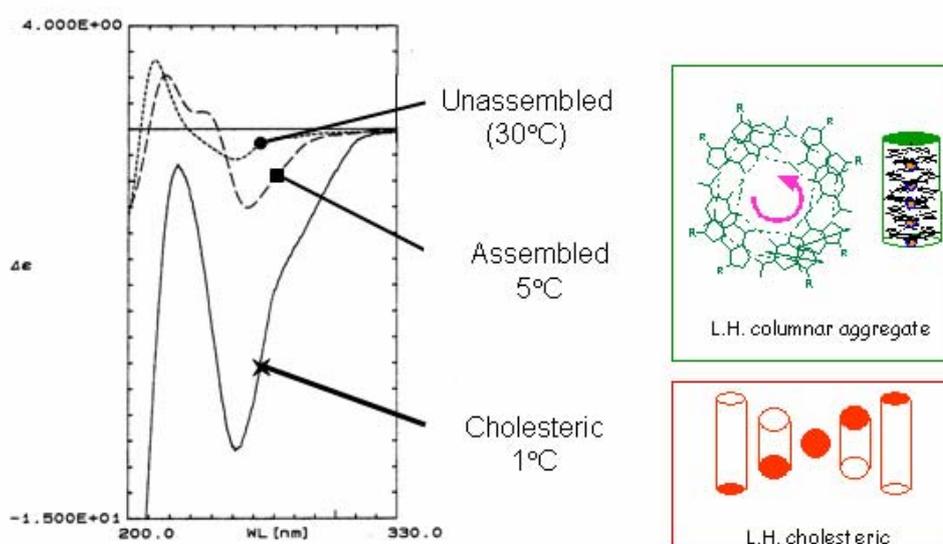
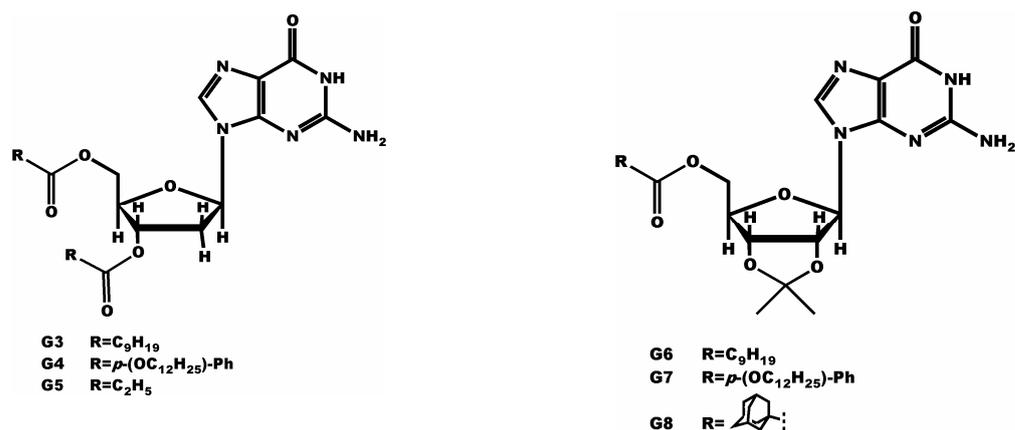


Figura 4.5. Studio CD in temperatura del comportamento supramolecolare di d(Gp).

4.3. Autoassemblaggio di derivati lipofili delle Guanosine (lipoG).

Sulla base dei risultati ottenuti nello studio dei derivati guanosinici in soluzione acquosa, e in particolare sul ruolo svolto dai cationi, è stato indagato il comportamento di derivati lipofili in solventi organici.

Le guanosine vengono rese lipofile per sostituzione degli ossidrili dello zucchero con residui alifatici o aromatici generalmente a lunga catena (**G3-8**).



Le lipoG possono estrarre ioni da una fase acquosa e trasportarli in una fase organica, come dimostrato con un semplice esperimento: se in una provetta contenente una soluzione acquosa di picrato di potassio si aggiunge un egual volume di soluzione cloroformica di lipoG (**G3-8**), previa vigorosa agitazione si ottiene il trasferimento della colorazione gialla tipica dei picrati alla fase organica (figura 4.6) ⁸.

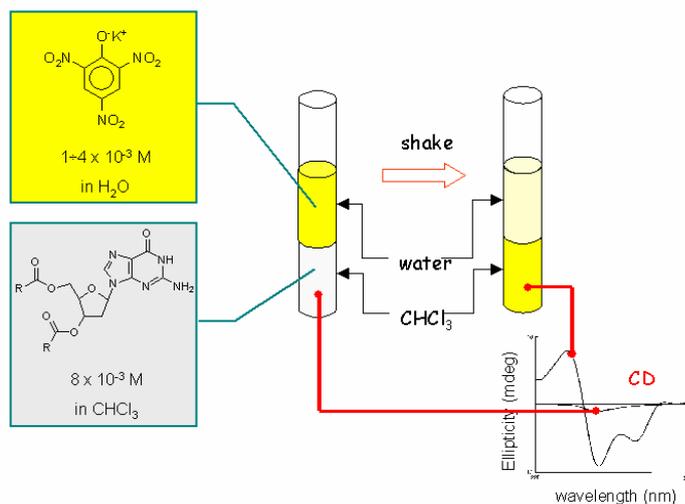


Figura 4.6. Esperimento di estrazione di picrato di potassio in una soluzione cloroformica di **G3**.

La differenza principale tra le lipoG e i comuni ionofori, tipo gli eteri corona, risiede nel fatto che, per comportarsi da ionofori, devono formare strutture composte almeno da due G-quartetti. Studi di spettroscopia NMR condotti su campioni contenenti differenti quantità relative di **G3** e di picrati dimostrarono che la stechiometria degli assemblati ed anche la loro struttura sono dipendenti dal rapporto Lipo-G/ picrati: se la quantità di picrati è bassa si hanno degli ottameri se aumenta dalla struttura tetramerica si passa ad una struttura colonnare o pseudopolimerica⁹.

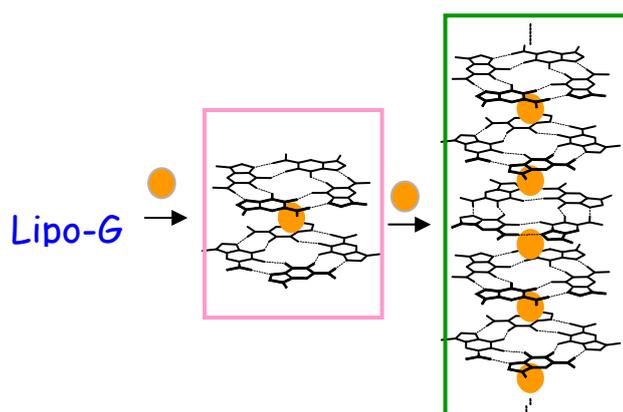


Figura 4.7. Autoassemblaggio diretto da cationi di guanosine lipofile.

L' autoassemblaggio delle lipo-G mediato da cationi comporta anche delle conseguenze di natura stereochimica. Le guanosine esistono in due conformazioni *syn* ed *anti*, in un G-quartetto le guanosine si trovano tutte nella stessa conformazione per cui si avranno G-quartetti *all-syn* e G-quartetti *all-anti*. In entrambi i tipi di G-quartetto, a causa della presenza degli zuccheri chirali legati a ciascuna base, si potranno distinguere due facce diastereotomiche una testa, “head”, e una coda, “tail”, viene indicata come testa la faccia del G-quartetto nella quale sia possibile percorrere i legami a idrogeno passando da NH verso CO muovendosi in senso orario.(figura 4.8).

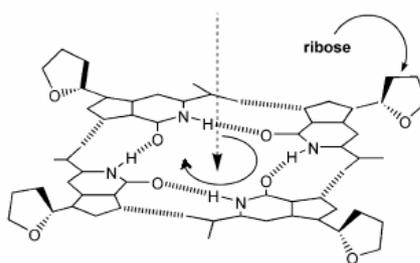
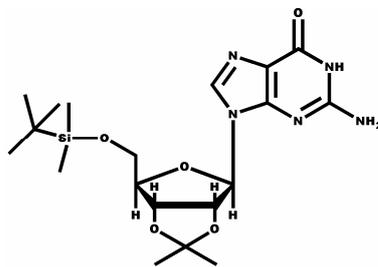


Figura 4.8.

La prima struttura a risoluzione atomica dell'aggregato colonnare è stato ottenuta per cristallizzazione di un silil-derivato di guanosina (**G9**) con potassio e cesio picrato¹¹.



G9

Il cristallo risultava essere costituito dall'esadecamero $[\mathbf{G9}]_{16} \cdot 3\text{K}^+ \cdot \text{Cs}^+ \cdot 4\text{Pic}^-$ nato dallo stacking di quattro G-quartetti distanti 3.3-3.4 Å e in particolar modo dalla sovrapposizione di due ottameri di tipo testa-coda, ciascun ottametro coordina centralmente uno ione Potassio e un terzo ione potassio li tiene uniti centralmente, in più un cesio è legato ad uno dei quartetti esterni. La struttura è ulteriormente stabilizzata dai picrati che formano ciascuno due legami a idrogeno con i gruppi amminici liberi (N2-H_B) che si proiettano verso l'esterno dai due G-quartetti centrali. Si evidenziò anche che, analogamente al DNA, i G-quartetti non si impilano allineandosi ma sono ruotati l'uno rispetto all'altro di circa 30 ° dando origine a una soprastruttura elicoidale che, nel caso delle guanosine oggetto di studio, risultò essere sempre sinistrorsa sia nei cristalli che in soluzione.

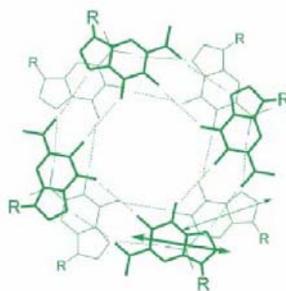


Figura 4.10. Impilamento chirale di due G-quartetti adiacenti.

4.4. Chiralità supramolecolare dei derivati della guanosina.

Davis e collaboratori hanno indagato circa la capacità di miscele di (D,L)-**G9** di risolversi spontaneamente in soluzioni in G-quartetti omochirali ottenendo un risultato interessante: l'omochiralità degli aggregati supramolecolari si presenta soltanto nelle soluzioni che hanno estratto sali di Ba²⁺, non in quelle contenenti K⁺. La dipendenza della diastereoselettività dal catione può essere spiegata in termini di variazione dell'energia libera del sistema: è noto

infatti che G-quadruplex trattenuti da cationi bivalenti (Ba^{2+} , Sr^{2+}) sono più stabili di quelli che coordinano i cationi monovalenti (K^+ , Na^+)¹², la maggiore variazione entalpica favorevole che accompagna la coordinazione del catione bivalente sembrerebbe essere indispensabile per compensare la diminuzione di entropia del sistema che accompagna la risoluzione nel sistema supramolecolare omochirale.¹³

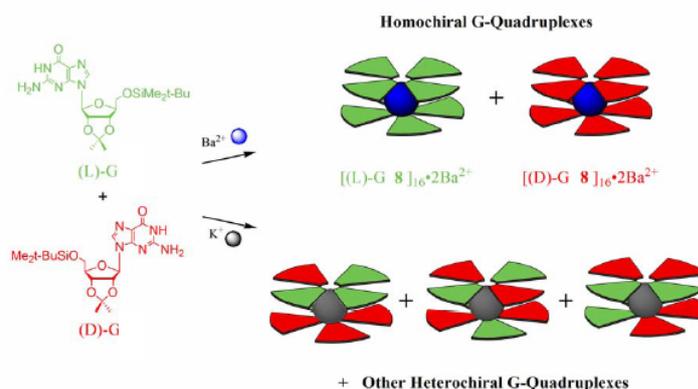


Figura 4.11. Rappresentazione schematica dell'autoassemblaggio di (D, L)-G9 in presenza di Ba^{2+} e K^+ .

In queste strutture gli anioni sono in stretto contatto con una struttura colonnare chirale che acquista la capacità di discriminare tra specie cariche negativamente di chiralità opposta. Questa proprietà è stata testata su sali di potassio di *N*-(2,4-dinitrofenil) amminoacidi¹⁴. La soluzione acquosa racemica del sale è stata posta a contatto con la soluzione organica di G5.

AA	ee (%)	X ^b	DS ^c
K(DNP-Trp)	25	D	0.071
K(DNP-Phe)	29	D	0.068
K(DNP-Ala)	5	L	0.015
K(DNP-Ile)	12	L	0.003
K(DNP-Pro)	2	L	0.008

Tabella 1. Risultati dell'estrazione di derivati di amminoacidi con nucleosidi.

Sebbene il valore di eccesso enantiomerico ottenuto non sia molto elevato in termini assoluti, rappresenta un ottimo risultato in quanto è un esempio non comune di discriminazione chirale mediata da un processo di auto-assemblaggio.

4.5. Autoassemblaggio di guanosine lipofile in assenza di cationi.

Durante lo studio sintetico delle lipoG si registrò la tendenza a dare dei gel birifrangenti sia in solventi idrocarburici che in cloroformio.

In particolare una mesofase liotropica si può ottenere per lenta evaporazione di una soluzione in solvente idrocarburico dell'estere decanoico della deossiguanosina (**G3**), fenomeno che non poteva essere dovuto alla formazione delle sovrastrutture note data l'assenza di cationi, si trattava di un nuovo processo di autoassemblaggio reso possibile dalla versatilità delle guanosine, capaci di dare differenti complessi supramolecolari caratterizzati da differenti networks di legami a idrogeno al variare delle condizioni sperimentali.

Lo spettro NMR di **G3** in CDCl_3 dimostrò la dipendenza degli spostamenti chimici degli idrogeni scambiabili (NH ed NH_2) dalla concentrazione, comportamento indicativo della formazione di legami a idrogeno. Lo spettro NOESY risultava essere compatibile con una struttura a nastro riportata in figura 4.12 e successivamente indicata come "ribbon B"¹⁵.

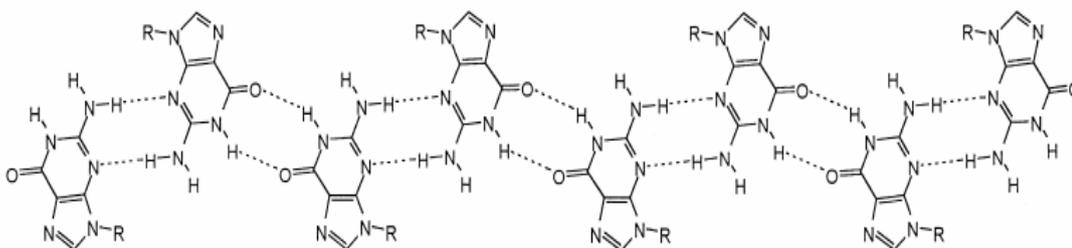


Figura 4.12. Ribbon B.

Studi di SAXS (Small Angle X-ray Scattering) confermarono l'esistenza di una fase liquido cristallina bidimensionale compatibile con il modello proposto sulla base degli studi NOESY. Successivamente si notò che lo spettro NMR registrato immediatamente dopo la dissoluzione in cloroformio anidro è diverso da quello registrato dopo un certo lasso di tempo. Studi NOESY indicarono l'esistenza di due differenti tipi di nastro: il ribbon B in soluzioni di cloroformio standard e un secondo ribbon A, in campioni "freschi" ed anidri (figura 4.13).

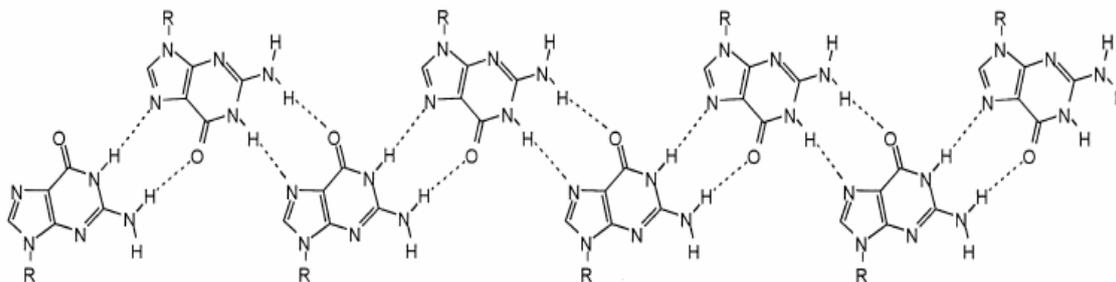


Figura 4.13. Ribbon A..

L'analisi ai raggi X a basso angolo di un campione solido ottenuto per lenta evaporazione da una soluzione cloroformica, evidenziò una struttura fibrosa disordinata compatibile con un arrangiamento di tipo ribbon A, organizzata in una soprastruttura bidimensionale con gli assi maggiori allineati e paralleli gli uni rispetto agli altri.

Si potè concludere che in assenza di cationi le lipoG esistono allo stato solido in due differenti strutture supramolecolari a nastro: il ribbon A è la struttura più stabile allo stato solido viene mantenuta al passaggio in soluzione in cloroformio per poi riarrangiare nella struttura ribbon B termodinamicamente più stabile in soluzione. La transizione è reversibile per allontanamento del solvente.

Nella figura 4.14 si riporta l'immagine SFM di un singolo nastro di **G4** su mica. Il diametro del nastro è di 6.2 nm, in accordo con quanto calcolabile dai modelli molecolari sulla base della struttura proposta. La lunghezza media di questi aggregati è di circa 100 nm, ma ne sono stati osservati alcuni lunghi fino a 8 μm .

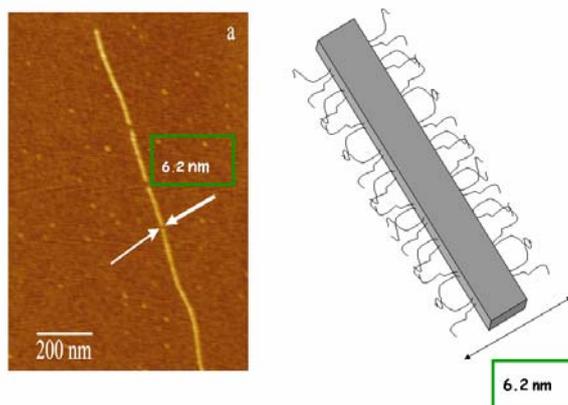


Figura 4.14. Immagine SFM (scanning force microscopy) del nastro di **G4** ottenuto per lenta evaporazione del solvente su substrato di mica. La larghezza del nastro misurata in circa 6.2 nm è perfettamente in accordo con la struttura proposta.

Nella figura 4.15 è invece riportata un'immagine STM di un monostrato dello stesso composto all'interfaccia grafite-soluzione, questa tecnica di microscopia permette una risoluzione quasi molecolare. E' possibile osservare parti chiare, costituite dalle porzioni aromatiche, separate tra loro da zone scure, le code alifatiche. Anche in questo caso le distanze misurate sono in accordo con il modello proposto.

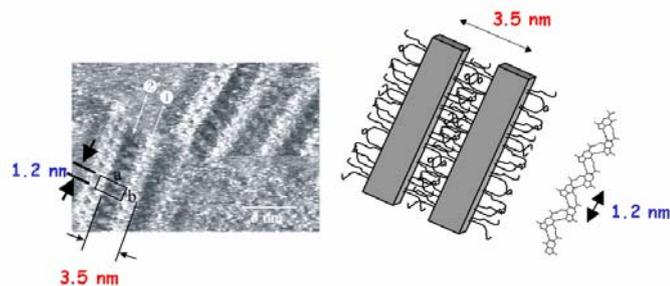


Figura 4.15. Immagine STM (scanning tunneling microscopy) del nastro di G4 registrata all'interfaccia grafite/soluzione, in cui si possono osservare i nastri vicini tra loro e interdigitati attraverso le catene lipofile.

4.6 Proprietà elettroniche dei derivati lipofili della guanosina.

La guanina possiede un dipolo elettrico permanente orientato lungo la retta che biseca i legami C(5)-C(6) e C(2)-N(3).

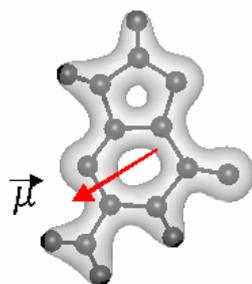


Figura 4.16.

Se si analizzano attentamente le due possibili strutture a nastro della deossiguanosina si può notare come dal punto di vista elettronico siano profondamente differenti: mentre nel nastro B le molecole sono arrangiate in modo tale che i vettori elettrici si annullino, nel nastro A le componenti dei vettori elettrici parallele alla direzione di accrescimento del nastro si sommano.

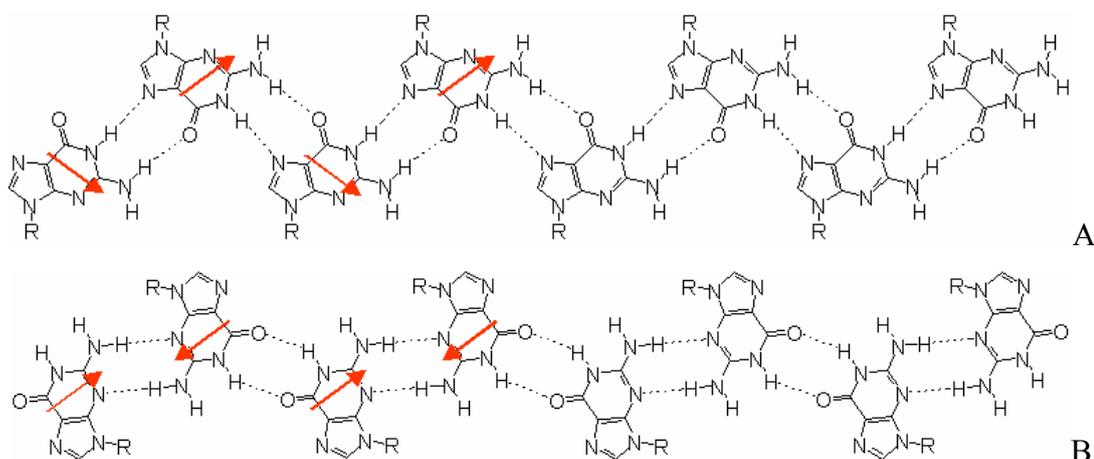


Figura 4.17

Allo stato solido le molecole si organizzano in una struttura a nastro di tipo A e i nastri si dispongono paralleli ed equiversi gli uni rispetto agli altri. Ciò comporta che le risultanti dei momenti di dipolo dei singoli nastri a loro volta si sommino così che il campione solido complessivamente risulti polare.

La collaborazione con Ross Rinaldi e Roberto Cingolani dell'Università di Lecce, esperti nella produzione di nanocontatti con la tecnologia Electron Beam Lithography, ha permesso lo studio delle possibili applicazioni delle proprietà elettroniche delle lipoG in campo nanotecnologico¹⁶⁻¹⁷.

Il primo dispositivo messo a punto è costituito da un supporto di Silicio su cui sono depositati due elettrodi in Oro, tra i due elettrodi si deposita una goccia di soluzione cloroformica di **G3**, che viene poi evaporata sotto vuoto (figura 4.18).

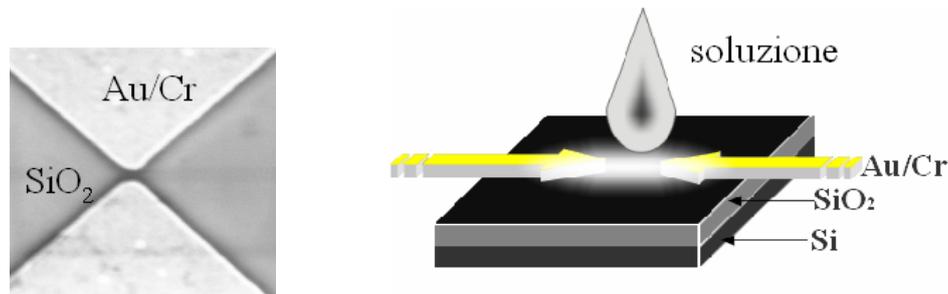


Figura 4.18. Dispositivo elettronico ibrido utilizzato consiste in due elettrodi Au/Cr (35/8 nm) depositati su un substrato di silicio attraverso la litografia a fascio elettronico.

Sono state eseguite misure di intensità di corrente in funzione del potenziale applicato che hanno permesso di evidenziare la dipendenza dell'andamento delle curve in funzione della distanza tra gli elettrodi: per distanze tra gli elettrodi di circa 800nm il dispositivo si comporta da condensatore (figura 4.19a), se la distanza è di circa 120nm si ottiene una curva simile a quella di un sistema metallo-semiconduttore-metallo (figura 4.19b), per distanze inferiori ai 60nm, che permettono la deposizione un singolo cristallo, il dispositivo esibisce un comportamento da diodo, ossia rettifica la corrente elettrica (figura 4.19c).

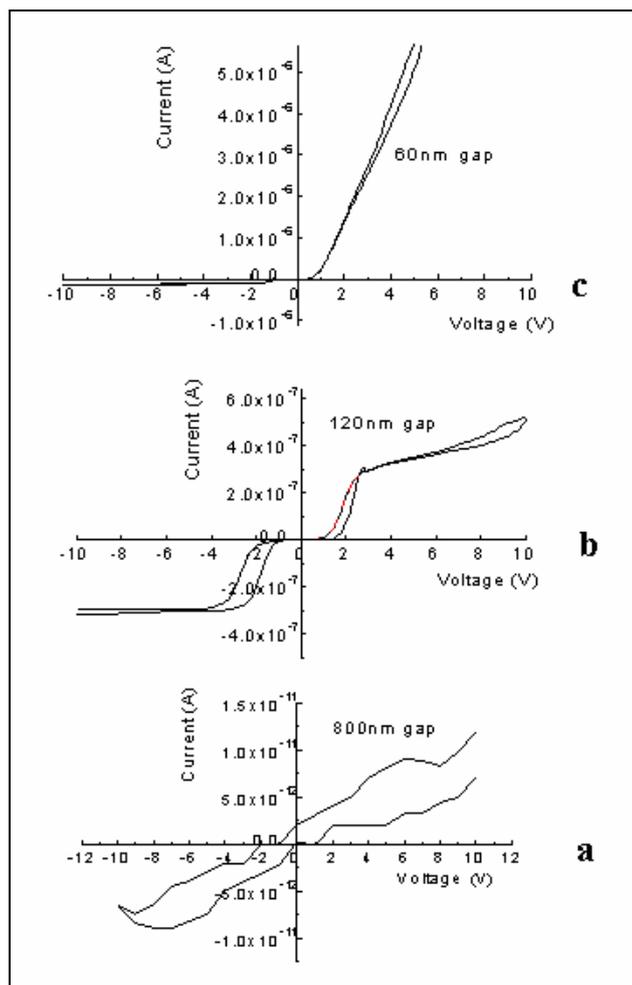


Figura 4.19. Grafico voltaggio-corrente per dispositivi con una distanza di a) 800 nm, b) 120 nm e c) 60nm.

Se si modifica quest'ultimo dispositivo per applicazione di un terzo elettrodo al di sotto del supporto di silicio (figura 4.20), la curva intensità-corrente assume un andamento tipico dei transistor: per ogni data differenza di potenziale tra i due elettrodi d'oro è possibile modulare l'intensità di corrente variando il potenziale applicato al terzo elettrodo.

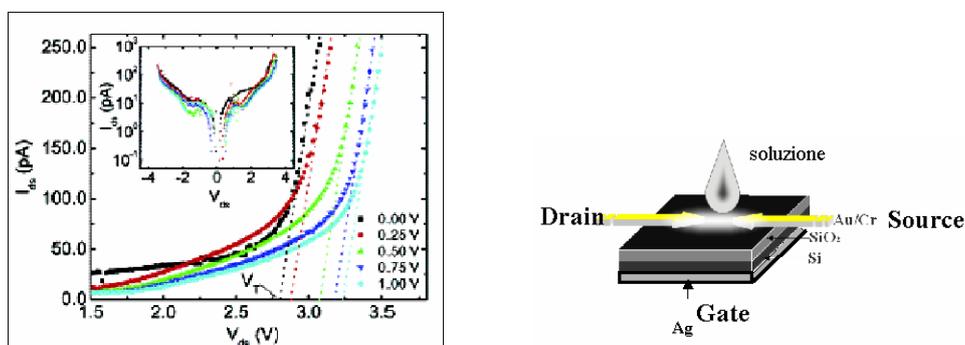


Figura 4.20. Curve voltaggio-corrente, all'aumentare del voltaggio applicato al terzo elettrodo, per il dispositivo in cui la distanza tra gli elettrodi è di 40 nm.

Bibliografia.

1. G. P. Spada, A. Carcuro, F. P. Colonna, A. Garbesi, G. Gottarelli, *Liq. Cryst.*, **1998**, *3*, 651; P. Mariani, C. Mazabard, A. Garbesi, G. P. Spada, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *11*, 6369.
2. S. Bonazzi, M. Capobianco, M. M. De Morais, A. Garbesi, G. Gottarelli, P. Mariani, M. G. Ponzi Bossi, G. P. Spada, L. Tondelli, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5809.
3. S. B. Zimmermann, G. H. Cohen, D. R. Davies, *J. Mol. Biol.*, **1975**, *92*, 181.
4. G. Laughlan, A. I. H. Murchie, D. G. Norman, M. H. Moore, P. C. E. Moody, D. M. J. Lilley, B. Luisi, *Science*, **1994**, *265*, 520.
5. G. Gottarelli, G. P. Spada, A. Garbesi, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry- Vol 9- Templating, Self-assembly and Self-organisation*, Edited by J. M. Lehn, Chair Ed. Board, J.-P. Sauvage, M. W. Hosseini, Vol. Eds. (Pergamon, Oxford, **1996**), Chpt.13.
6. G. Gottarelli, S. Masiero, G. P. Spada, *Enantiomer*, **1998**, *3*, 429; G. Gottarelli, G. P. Spada, in *Circular Dichroism, Principles and Applications*, 2nd ed., edited by N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody (Wiley-VCH, New York, **2000**), chpt. 19.
7. G. Gottarelli, G. Proni, G. P. Spada, *Enantiomer*, **1996**, *1*, 201.
8. G. Gottarelli, S. Masiero, G. P. Spada, *Chem. Commun.*, **1995**, 2555.
9. L. A. Marlow, E. Mezzina, G. P. Spada, S. Masiero, J. T. Davis, G. Gottarelli, *J. Org. Chem.*, **1996**, *64*, 5116.
10. E. Mezzina, P. Mariani, R. Itri, S. Masiero, S. Pieraccini, G. P. Spada, F. Spinuzzi, J. T. Davis, G. Gottarelli, *Chem. Eur. J.*, **2001**, *7*, 388.
11. S. L. Forman, J. C. Fettinger, S. Pieraccini, G. Gottarelli, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 4060.
12. X.D. Shi, F.C. Fettinger and K. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 6738.
13. X.D. Shi, K.M. Mullagh, F.C. Fettinger, Y. Jiang, S.A. Hofstadler, J.T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 10830.
14. V. Andrisano, G. Gottarelli, S. Masiero, E. H. Heijne, S. Pieraccini, G.P. Spada, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 2386.
15. G. Gottarelli, S. Masiero, E. Mezzina, S. Pieraccini, J. P. Rabe, G. P. Spada, P. Samori, *Chem.-Eur.*, **2000**, *6*, 3242.
16. R. Rinaldi, G. Maruccio, A. Blasco, V. Arima, V. Cingolani, T. Giorgi, S. Masiero, G. P. Spada, G. Gottarelli, *Nanotechnology*, **2002**, *13*, 398.
17. G. Maruccio, P. Visconti, V. Arima, S. D'Amico, A. Blasco, E. D'Amone, R. Cingolani, R. Rinaldi, S. Masiero, T. Giorgi, G. Gottarelli, *Nanoletters*, **2003**, *3*, 479.

Capitolo 5. Nucleosidi modificati:

autoassemblaggio di derivati lipofili della 8-ossoguanosina e 8-ossosina.

5.1. Introduzione.

Abbiamo già discusso di come le guanosine naturali possono essere modificate al fine di variarne le proprietà fisiche: la sostituzione degli ossidril dello zucchero ad esempio ne modifica la solubilità permettendo loro di assemblare in solventi organici in assenza di competizione da parte dell'acqua per la formazione dei legami ad idrogeno (vedi capitolo 4). Un altro obiettivo è quello di modificarle inserendo nuove funzioni al fine di variarne il comportamento supramolecolare.

Rivera ha dimostrato come la stabilizzazione dei G-quartetti possa essere ottenuta in 8-aryl-2'-deossiguanosina derivati (**G10**)¹.

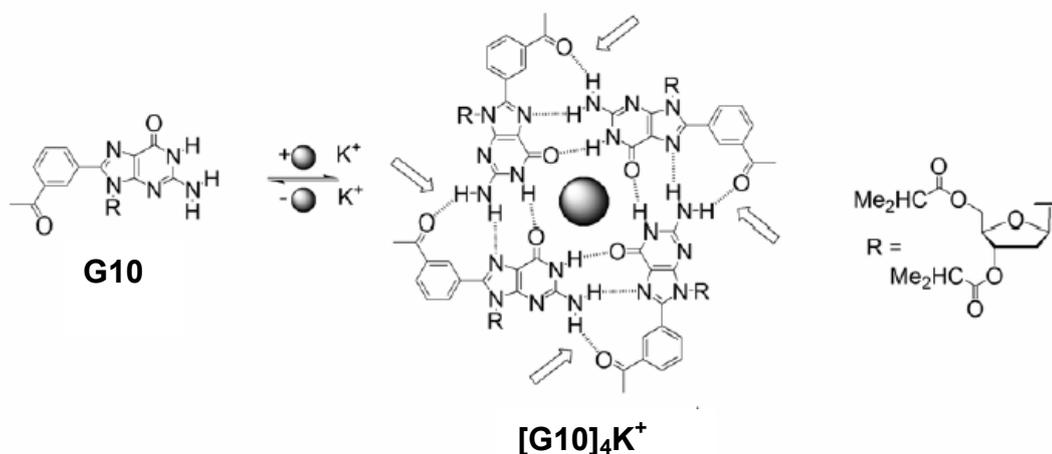


Figura 5.1. Un G-quartetto formato da **G10**.

L'accettore di legami a idrogeno in posizione 8 lega l' N2-H che non partecipa attivamente alla formazione del quartetto. Esperimenti in temperatura e per diluizione di soluzioni della specie aggregata $[G10]_{16} \cdot 3K^+$ hanno dimostrato che questo incrementa la stabilità rispetto all'analogo derivato non 8 sostituito. Ciò è dovuto a diversi fattori: la presenza di un sostituito in posizione 8 forza le guanosine in conformazione *anti* impedendo di fatto la formazione dei nastri; si produce un ampliamento della superficie aromatica che produce interazioni π - π più forti; si formano quattro legami a idrogeno in più per ciascun quartetto (figura 5.1).

Sessler invece ha sintetizzato un dinucleotide guanosina-citidina che si organizza in un macrociclo planare via Watson-Crick base pairing ².

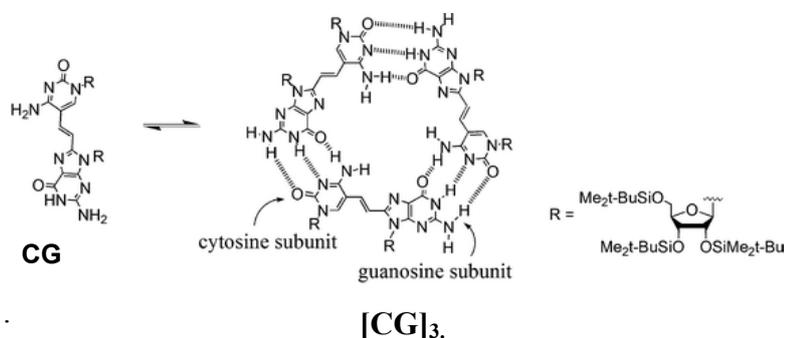


Figura 5.2. Autoassemblaggio del dinucleotide **CG** in **[CG]₃**.

Modifiche apparentemente più lievi se introdotte direttamente sulla base ganinica, e più in particolare sui residui che partecipano attivamente alla formazione dei legami a idrogeno, possono produrre variazioni notevoli nel comportamento supramolecolare.

È il caso dell'isoguanosina, un isomero strutturale della guanosina che differisce per la trasposizione dell'azoto e dell'ossigeno delle posizioni C2 e C6. Questa differenza, apparentemente minima, è tale per cui le due coppie di donatori e di accettori di legami a idrogeno che sono posizionati a 90° nella guanosina, vengono a trovarsi a 67° nella isoguanosina motivo per cui l'autoassemblaggio di quest'ultima non formerà un quartetto ma un pentamero. Questa differenza nello schema di autoassemblaggio e nella grandezza del macrociclo determina un aumento nelle dimensioni della cavità centrale che sarà ottimale per la coordinazione di uno ione cesio. Se la guanosina forma dei G-quartetti impilati in presenza di cationi metallici, l'isoguanosina forma dei pentameri che si impilano a formare un decamero in presenza di Cs⁺ (figura 5.3) ³.

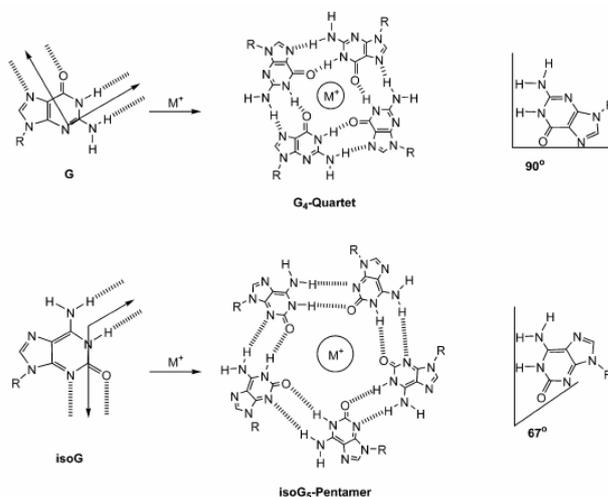


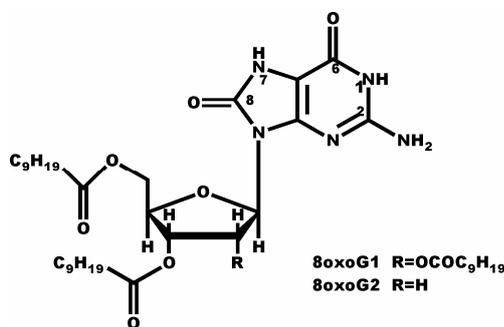
Figura 5.3. Autoassemblaggio di nucleotidi guanosinici (**G**) e isoguanosinici (**isoG**) in presenza di cationi.

In questo capitolo si descrive come la presenza di un gruppo accettore di legami a idrogeno in posizione 8 sull'anello guanosinico possa variare la chimica supramolecolare dei derivati lipofili della guanosina escludendo la possibilità di formare sia G-quartetti che nastri e favorendo la formazione di una nuova struttura supramolecolare ad elica continua ⁴.

5.2. Derivati lipofili della 8-ossoguanosina.

I derivati lipofili della 8-ossoguanosina sono dei modelli analoghi alle 8-ossoguanine, specie che si formano durante l'ossidazione del DNA⁵ con un potenziale di ossidazione più basso di quello delle guanosine che a loro volta presentano un potenziale di ossidazione molto basso rispetto a quello delle altre basi del DNA⁶⁻⁷. L'interesse scientifico nasce dall'osservazione che un potenziale di ossidazione così ridotto potrebbe produrre un'esaltazione delle proprietà elettroniche, sempre che l'architettura supramolecolare sia compatibile con il mantenimento del momento di dipolo.

Sono stati sintetizzati due derivati lipofili della 8-ossoguanosina (**8-oxoG1**, **8oxoG2**), ed è stato studiato il loro comportamento supramolecolare in soluzione, in fase solida e liquido cristallina applicando differenti tecniche ⁴.



5.2.1. Fasi liquido-cristalline.

8-oxoG1 e **8oxoG2** generano fasi liquido-cristalline liotropiche. Le mesofasi osservate sono differenti da quelle dei composti non sostituiti in 8. Al microscopio ottico si evidenziano due fasi birifrangenti in dipendenza della concentrazione di 8-ossoguanosina in eptano e in esano. Nel caso di **8-oxoG1** le due mesofasi si manifestano l'una, colesterica, per concentrazioni comprese tra 2 e 12 % w/w, l'altra, esagonale, per concentrazioni maggiori del 12% (figura 5.4). I derivati della guanosina non sostituita in 8 mostrano invece un'unica fase con una simmetria quadrata dovuta alla formazione dei nastri. Questo diverso comportamento è riconducibile alla presenza di una nuova funzione lattamica nel ciclo pentatomico che permette di nuovi assetti di legami a idrogeno.

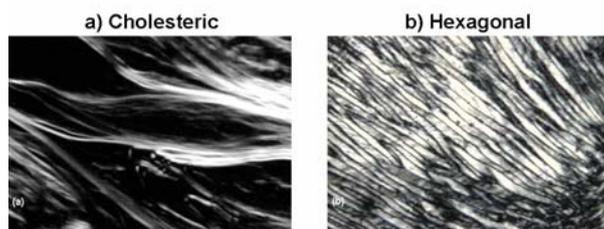


Figura 5.4. Tessiture osservate al microscopio ottico in eptano. a) $c=8\%$ p/p; b) $c=15\%$ p/p (ingrandimento 250x).

La corretta assegnazione delle mesofasi è stata confermata anche da studi di diffrazione ai raggi X: per concentrazioni di **8oxoG1** comprese tra 3e 12%, una banda diffusa si registra nel profilo di diffrazione a basso angolo la cui posizione, larghezza e intensità cambiano con la concentrazione indicando che la rimozione di solvente causa una diminuzione della periodicità e un aumento dell'ordine a lungo raggio.

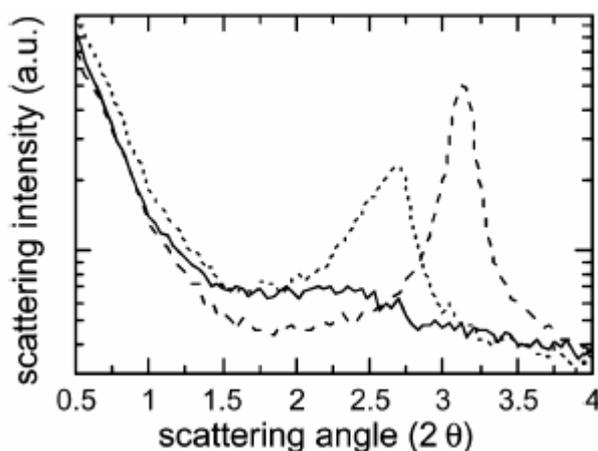


Figura5.5. Profilo di diffrazione ottenuto per il derivato **8oxoG1** in esano per $c=3\%$ (linea continua) $c=10\%$ (linea punteggiata) $c=20\%$ (linea tratteggiata).

Nessun picco si registra nella regione ad alto angolo, suggerendo che l'ordine tra gli elementi strutturali è basso, tipico di una fase liquido cristallina poco strutturata di natura nematica o colesterica. Se la concentrazione è superiore al 12% una serie di picchi di diffrazione appaiono nella regione a basso angolo, i picchi sono molto intensi e la loro posizione varia con la concentrazione. Per tempi di esposizione molto lunghi si riescono a registrare picchi di diffrazione di ordine superiore al primo in particolare compaiono due ulteriori picchi che consentono la determinazione della simmetria reticolare^{8,9}. Le distanze tra i picchi stanno tra loro in rapporto $1:\sqrt{3}:\sqrt{4}$, tipico e indicativo di un'organizzazione bidimensionale esagonale degli elementi strutturali.

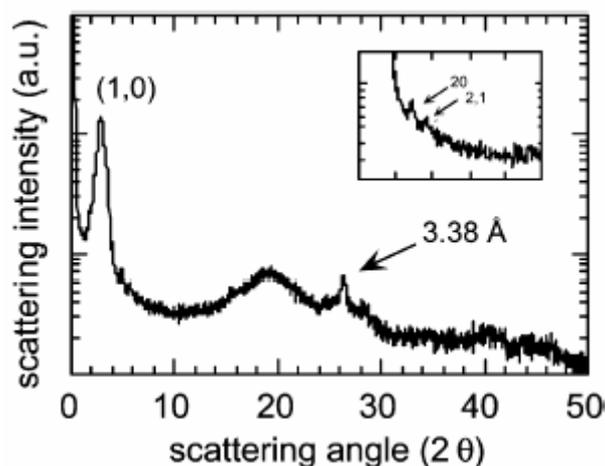


Figura 5.6. Profilo di diffrazione ottenuto per **8oxoG1** in esano al 20%.

Un picco si registra a circa 3.4 Å caratteristico delle strutture aromatiche impilate e indicativo della natura discotica colonnare della mesofase composta da 8-ossoguanosine.

Le strutture colesterica ed esagonale sono prodotte da aggregati colonnari e non sono possibili per una struttura a nastro, d'altra parte i G-quartetti non possono dare aggregati colonnari per impilamento in assenza di cationi. Possiamo quindi affermare che la fase liquido cristallina di **8oxoG1** ha una struttura colonnare esagonale formata da elementi allungati paralleli (rods) costituiti da 8-ossoguanosine impilate, ma la forza che trattiene le molecole impilandole una sull'altra non è legata alla coordinazione di ioni. Tali elementi strutturali sono immersi in una matrice idrocarburica che è responsabile della banda di scattering diffusa registrata 4.4 Å ($2\theta=19.5^\circ$), e riflette la natura disordinata dell'esano e delle catene alifatiche^{10,11}.

5.2.2. Autoassemblaggio in soluzione.

Assodato che le 8-ossoguanosine danno una struttura supramolecolare differente dai composti non sostituiti in 8, è stato condotto lo studio strutturale degli aggregati in soluzione per spettroscopia NMR.

Gli spettri NMR dei **8oxoG1** a tutte le concentrazioni (10^{-4} - 10^{-2} mol L⁻¹) e temperature (10-45 °C) indagate mostrano segnali molto allargati per cui non forniscono molte informazioni di carattere strutturale. Alcune informazioni possono essere dedotte dallo studio comparato di spettri registrati in CDCl₃ e DMSO-d₆.

In DMSO-d₆ i segnali relativi ai due protoni lattamici H1 e H7 sono quasi sovrapposti ($\delta=10.8$ ppm) e il singoletto dovuto ai due protoni dell' ammino gruppo esociclico cade a $\delta=6.5$ ppm. Aggiungendo CDCl₃ lo spettro resta invariato fino a percentuali di CDCl₃ molto alte (97%, 98%, 99%), in tali condizioni i protoni H1 e H7 danno un unico segnale molto allargato $\delta=11.2$ ppm e il segnale di H2 si sposta verso campi magnetici più alti indicando un coinvolgimento dei protoni lattamici H1 e H7 nella formazione di legami a idrogeno e una mancata partecipazione del gruppo NH₂.

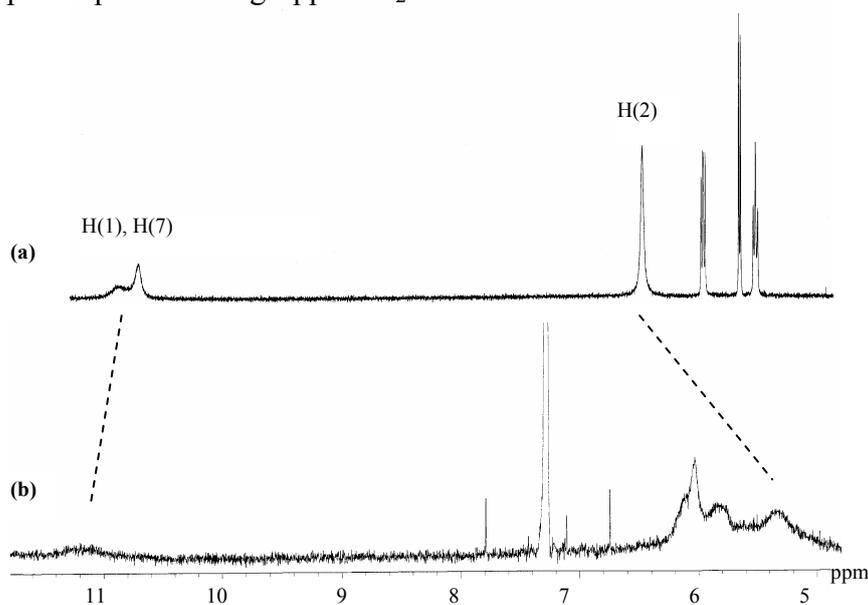


Figura 5.7. Spettri NMR a temperatura ambiente del composto **8oxoG1** in (a) DMSO-d₆ e (b) in CDCl₃.

Si noti che in nessuno dei modelli molecolari proposti per i derivati delle guanosine l'ammino gruppo era risultato essere libero.

Si è registrato lo spettro CD in differenti condizioni sperimentali, in un ambiente dissociante, ad esempio in metanolo, il segnale è molto debole, le bande sono più intense in cloroformio.

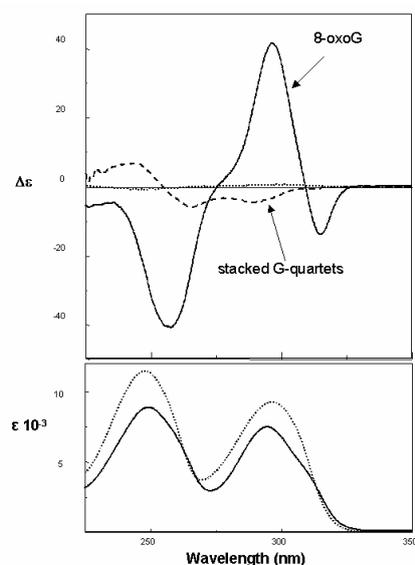


Figura 5.8. Spettri di dicroismo circolare (CD) e di assorbimento di **8-oxoG1** in metanolo (linea punteggiata), e in esano (linea continua), a titolo comparativo è riportato anche lo spettro CD degli aggregati colonnari ottenuti da **G3** per impilamento dei G-quartetti in presenza di K^+ registrato in CH_3Cl (linea tratteggiata).

Preso come riferimento lo spettro molecolare registrato in condizioni dissocianti (metanolo), l'aggregazione comporta la comparsa di segnali più intensi: in esano, al di sotto della concentrazione critica di transizione della prima mesofase, lo spettro CD è totalmente differente, caratterizzato da bande molto intense. Lo spettro non cambia per concentrazioni comprese tra 0.05 e 5 mM, ciò dimostra che la popolazione della specie chirale assemblata è indipendente dalla concentrazione. A concentrazioni superiori alla concentrazione critica, l'intensità del segnale aumenta e tutte le bande sono monosegnate, un comportamento tipico per le fasi colesteriche.

Anche se le transizioni elettroniche permesse della 8-ossoguanosina non sono note, da questi spettri CD è possibile ricavare comunque delle informazioni utili:

- (i) L'intensità dei segnali in esano è compatibile con una struttura altamente chirale.
- (ii) L'intensità non cambia con la concentrazione o temperatura, indicando una forte stabilità dell'architettura¹².
- (iii) Il rapporto tra l'intensità di dicroismo e di assorbimento (g-factor) è molto più alto che per le strutture colonnari delle guanosine basate su l'impilamento dei G-quartetti (vedi capitolo 4).

Considerato che la forma tautomerica dell'anello pentatomico è lattamica e quindi due gruppi in forma lattamica sono presenti in ciascuna molecola, esistono due nuove possibilità di

interazioni che non implicano la partecipazione dell' ammino gruppo, entrambe implicano la formazione di due coppie di legami a idrogeno ammide- ammide (Figura 5.9). Se il lattame del ciclo a pentatomico di una 8-ossoguanosina interagisce solo con il lattame del ciclo pentatomico di un'altra e lo stesso avviene per l'anello a sei termini si genererà una struttura a nastro (figura 5.9b). Se si formano legami a idrogeno tra i gruppi lattamici di un ciclo pentatomico con quelli del ciclo esatomico di un'altra molecola si genererà un quartetto (figura 5.10c). Si noti però come sia sufficiente una lieve inclinazione tra le basi perché lo stesso assetto di doppi legami presente nel quartetto determini l' assunzione di una soprastruttura ad elica continua (5.10d).

Tutti i dati sperimentali indicano che l'elica continua è la struttura supramolecolare preferibilmente adottata dai composti **8oxoG1** e **8oxoG2**.

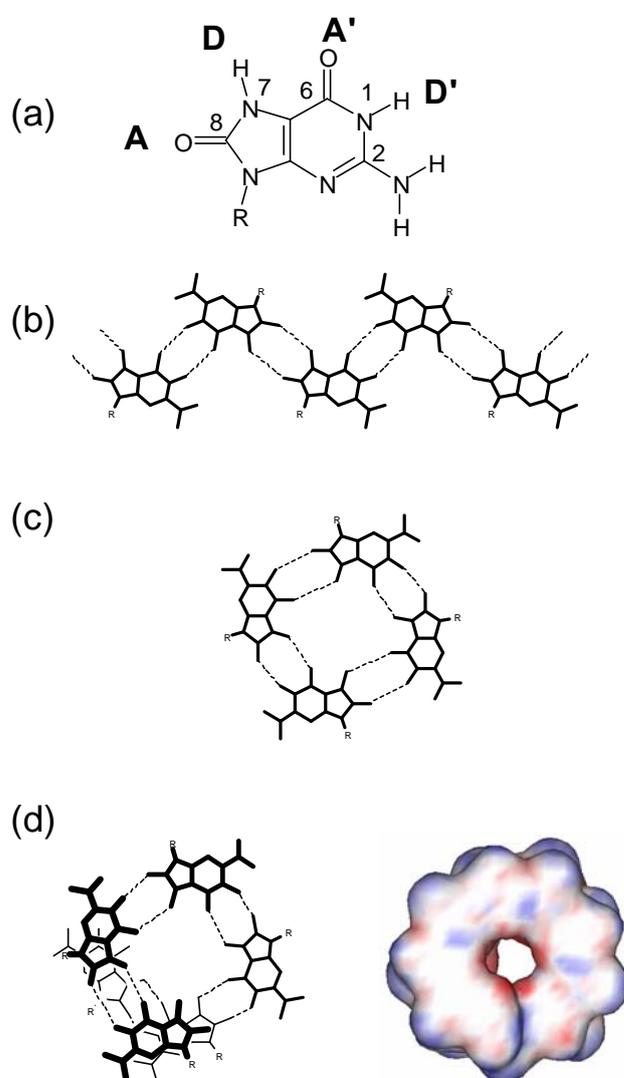


Figura 5.9.Rappresentazione schematica dei possibili modelli di aggregazione delle 8-ossoguanosine a) i due gruppi ammidici donatori e accettori di legami a idrogeno delle 8oxo guanosine, b) struttura a nastro, c) struttura a g-quartetto, d) struttura ad elica continua.

5.2.3 Autoassemblaggio su superficie.

In figura 5.10 è riportata l'immagine STM del derivato **8oxoG1** all'interfaccia grafite-soluzione nella quale è ben visibile un arrangiamento di quartetti a formare una cella elementare caratterizzata dai vettori $a = (3.8 \pm 0.2)$, $b = (3.4 \pm 0.2)$ e dall'angolo tra essi compreso $\alpha = (59 \pm 3)^\circ$ compatibile con una geometria di tipo esagonale. I punti più luminosi corrispondono alle regioni a più alta probabilità di tunnelling e possono essere attribuiti alle guanine¹³.

L'immagine conferma il modello colonnare proposto, i quartetti, ben visibili, possono essere intesi come sezioni trasversali della struttura elicoidale.

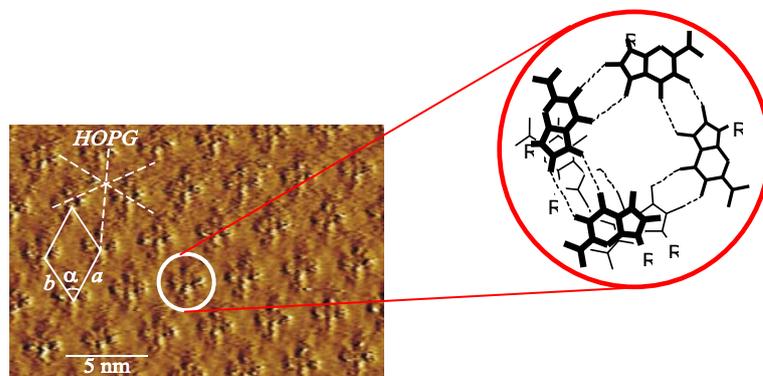


Figura 5.10. Immagine STM di 8oxoG1 su HOPG (Highly Ordered Pyrolytic Graphite), si riportano gli assi dei cicli esagonali della grafite (linea tratteggiata), il vettore a è orientato in maniera tale da formare un angolo di 22° con l'asse più prossimo ad esso.

5.2.4. Autoassemblaggio allo stato solido.

Non essendo stato possibile ottenere cristalli di **8oxoG1** o **8oxoG2** adatti alla cristallografia ai raggi X sono stati condotte misure di SAXS sul film ottenuto per evaporazione del solvente da una soluzione di **8oxoG1** in cloroformio (vedi figura 5.11)¹⁴. I dati confermano anche allo stato solido il mantenimento di una struttura colonnare a simmetria esagonale. Nella regione a basso angolo si registrano sette picchi di intensità $1:\sqrt{3}:\sqrt{4}:\sqrt{7}:\sqrt{9}:\sqrt{12}:\sqrt{1}$. La rielaborazione dei dati fornisce una dimensione della cella unitaria di dimensioni leggermente minori a quelle osservate nella mesofase in esano confermando la loro dipendenza dalla concentrazione.

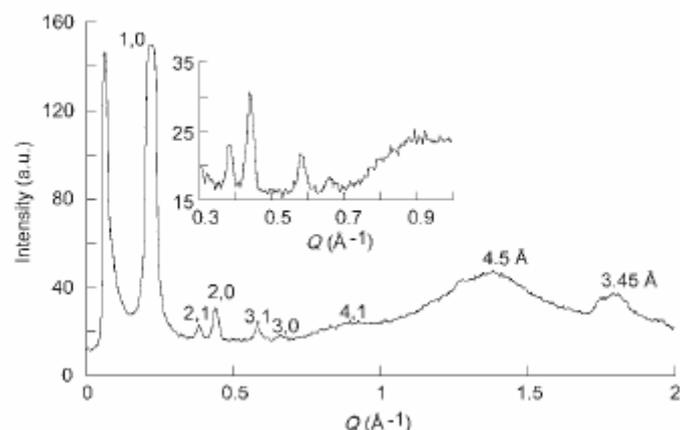


Figura 5.11. Profilo di diffrazione del film di **8oxoG1**.

La natura colonnare della mesofase resta confermata dal segnale registrato a $Q=1,81 \text{ \AA}^{-1}$, originatasi dallo stacking delle 8-ossoguanosine disposte quasi perpendicolarmente rispetto all'asse della colonna e distanti 3.45 \AA . La sezione trasversale della struttura colonnare ha un raggio di 9 \AA . Nella regione ad alto angolo anche in queste condizioni sperimentali si registra una banda allargata legata alla natura disordinata delle catene alifatiche.

Si riporta in figura 5.12 la mappa di distribuzione di densità elettronica calcolata dagli spettri di diffrazione in cui è evidente la disposizione circolare delle guanosine ma soprattutto la presenza di una cavità centrale all'interno del contorno tetramerico delle guanosine con densità all'incirca costante.

Il raggio misurato sulla mappa (10.5 \AA) è in ottimo accordo con quello calcolato sulla base della dimensione della cella.

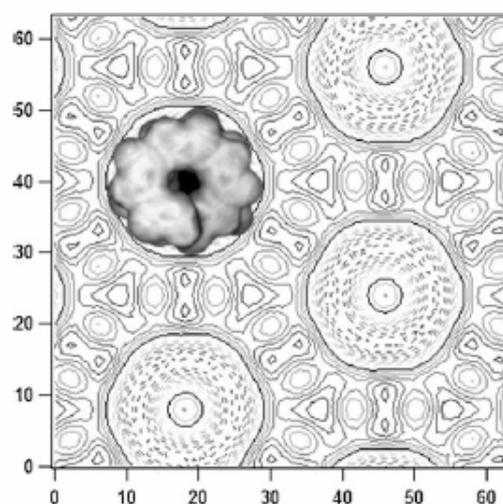


Figura 5.12. Mappa di distribuzione elettronica calcolata sul film di **8oxoG1**.

5.2.5. Proprietà elettroniche.

L'arrangiamento in un'architettura ad elica è interessante anche per la sua potenziale capacità di rettificare la corrente, questo farebbe degli 8-osso derivati dei possibili candidati per la fabbricazione di nanodispositivi bioelettronici e nanocircuiti ¹⁵.

Le proprietà elettroniche sono state determinate su dispositivi ibridi analoghi a quelli utilizzati per lo studio dei derivati della guanosina (vedi capitolo 4). Una goccia di soluzione cloroformica di **8-oxoG2**, ($c = 3 \text{ mM}$) è stata depositata, tra due elettrodi d'oro ancorati su substrato di SiO_2 .

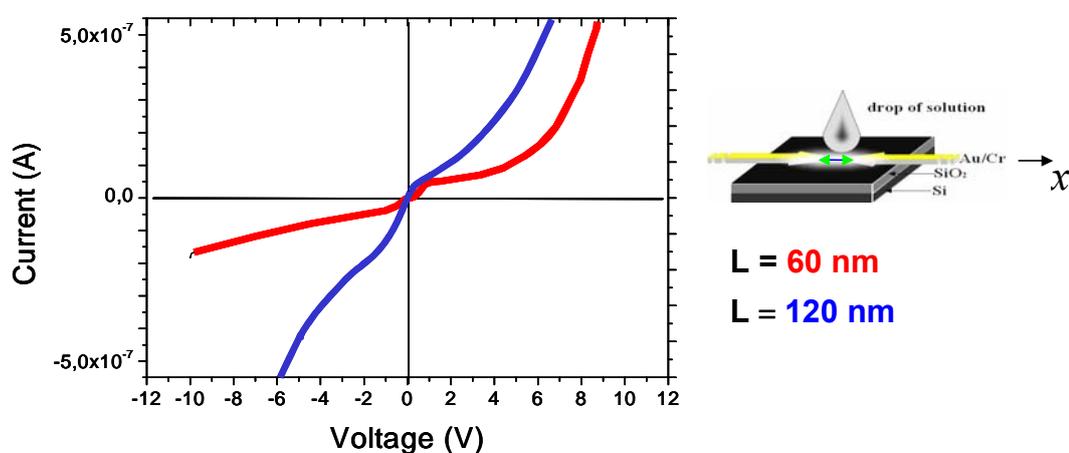


Figura 5.13. Curve I-V dei dispositivi con gap di 60 nm (linea rossa) e 120 nm (linea blu).

In figura 5.13 sono riportate le curve intensità-differenza di potenziale ottenute sperimentalmente. Per un gap tra i due nanoelettrodi di 60 nm, si è registrata la capacità della molecola di rettificare la corrente, ma con una intensità di corrente di due ordini di grandezza più bassa di quella registrata per il dispositivo ottenuto con i derivati della guanosina.

Per quanto riguarda il dispositivo con gap di 120 nm le curve $I-V$ evidenziano una sensibile riduzione della regione a corrente-zero con una resistenza di circa $8 \times 10^6 \Omega$.

I dispositivi ottenuti con le 8-ossoguanosine non hanno dato i risultati sperati sulla base del loro basso potenziale di ossidazione. Va comunque rilevato che il potenziale di ossidazione ridotto favorisce la conduzione nei dispositivi aventi $L > 100 \text{ nm}$ come indicato dalla riduzione della regione di corrente zero, dall'elevata intensità di corrente registrata per ogni dato potenziale applicato e dall'assenza di fenomeni di saturazione.

Le proprietà misurate hanno delle importanti implicazioni strutturali per poter comprendere le quali bisogna considerare che la capacità di rettificare la corrente è legata alla al momento di

dipolo intrinseco che conferisce la polarità al dispositivo ed all'allineamento della struttura supramolecolare rispetto agli elettrodi.

La 8-ossoguanosina è una molecola polare, il momento di dipolo è orientato lungo la secante dei legami C8-N7 e N2-C3. Poiché conduce corrente, l'orientazione delle molecole nella struttura supramolecolare dovrà essere tale da garantire un momento di dipolo non nullo al materiale solido.

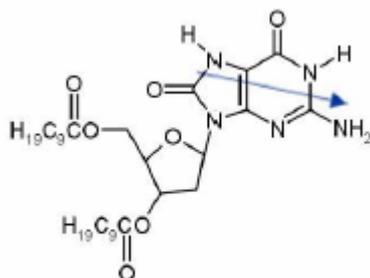


Figura 5.14. La freccia azzurra indica l'orientazione del momento di dipolo intrinseco.

L'autoassemblaggio in una struttura ad elica continua produce una forte riduzione del momento di dipolo rispetto al modello a nastro, mentre una struttura a quartetto, a causa della sua simmetria, ha un momento di dipolo nullo (figura 5.15). Anche le proprietà elettroniche forniscono un'ulteriore conferma del modello ad elica continua proposto per la struttura supramolecolare delle 8-oxoguanosine.

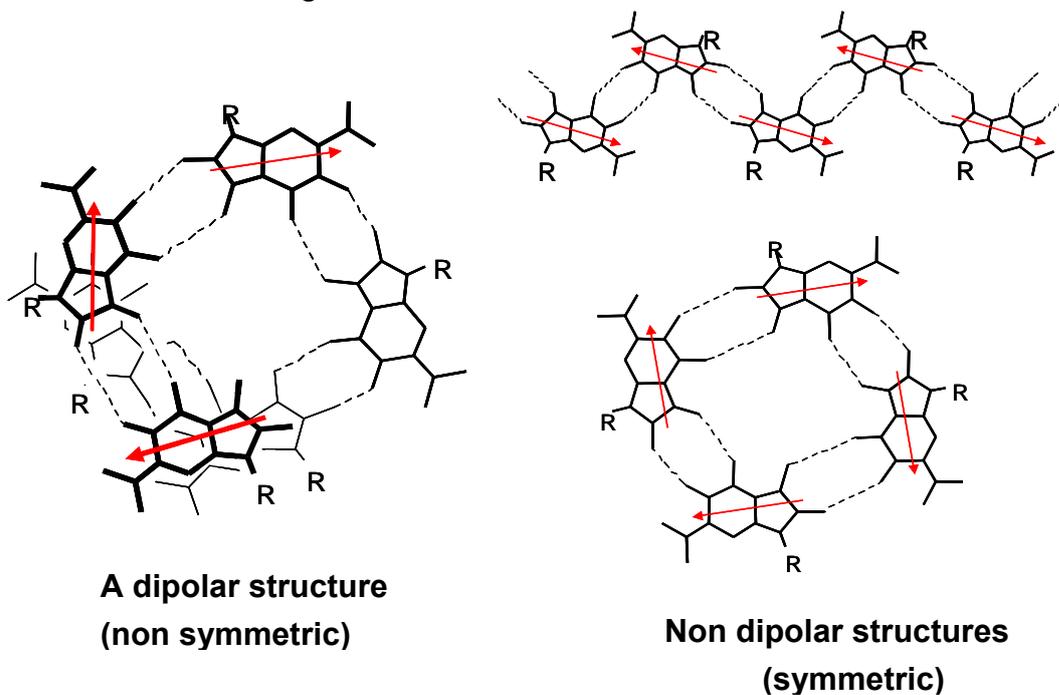
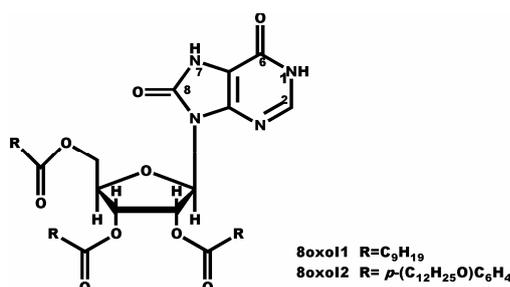


Figura 5.15.

5.3. I derivati lipofili della 8-ossosina.

Per dimostrare la corretta assegnazione della struttura supramolecolare ad elica continua delle 8-ossoguanosine, sono stati sintetizzati e caratterizzati due derivati della 8-ossosina¹⁴, un analogo strutturale della 8-ossoguanosina in cui manca l'amminogruppo esociclico. Questa differenza non dovrebbe precludere la possibilità di assemblare in un'elica continua secondo il modello proposto per le **8oxoG**, in quanto il network di legami a idrogeno alla base della suprastruttura elicoidale si compone solo di legami ammid-ammid.



Di seguito verrà descritto l'autoassemblaggio dei derivati lipofili della 8-ossosina e la fase liquido-cristallina formata dal derivato **8oxoI2** nei solventi idrocarburici. Va notato che solo il derivato **8oxoI2**, si autoassembla fino a formare delle mesofasi; il derivato **8oxoI1**, sostituito con dei decanoili sullo zucchero, non manifesta questa proprietà probabilmente a causa delle sue più ridotte proprietà amfifiliche.

In figura 5.16 vengono riportate le strutture supramolecolari ipotizzabili per i derivati della 8-ossosina sulla base della disposizione dei gruppi accettori e donatori di legami a idrogeno.

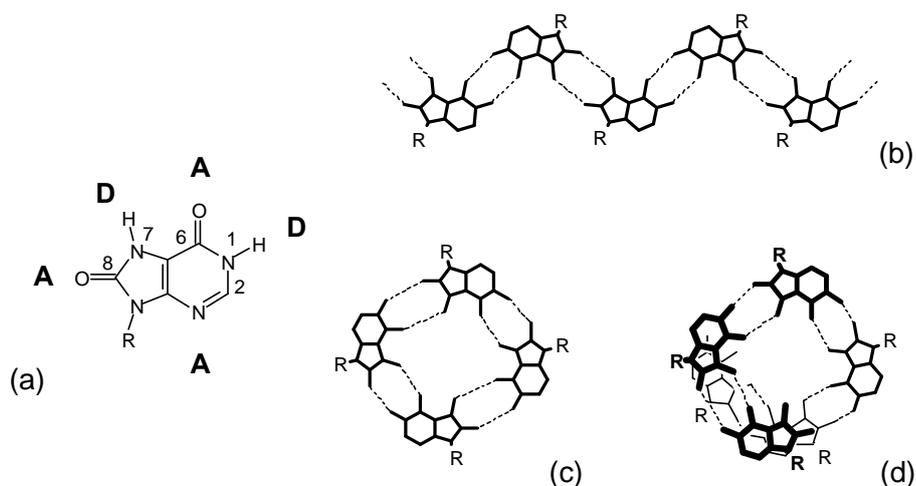
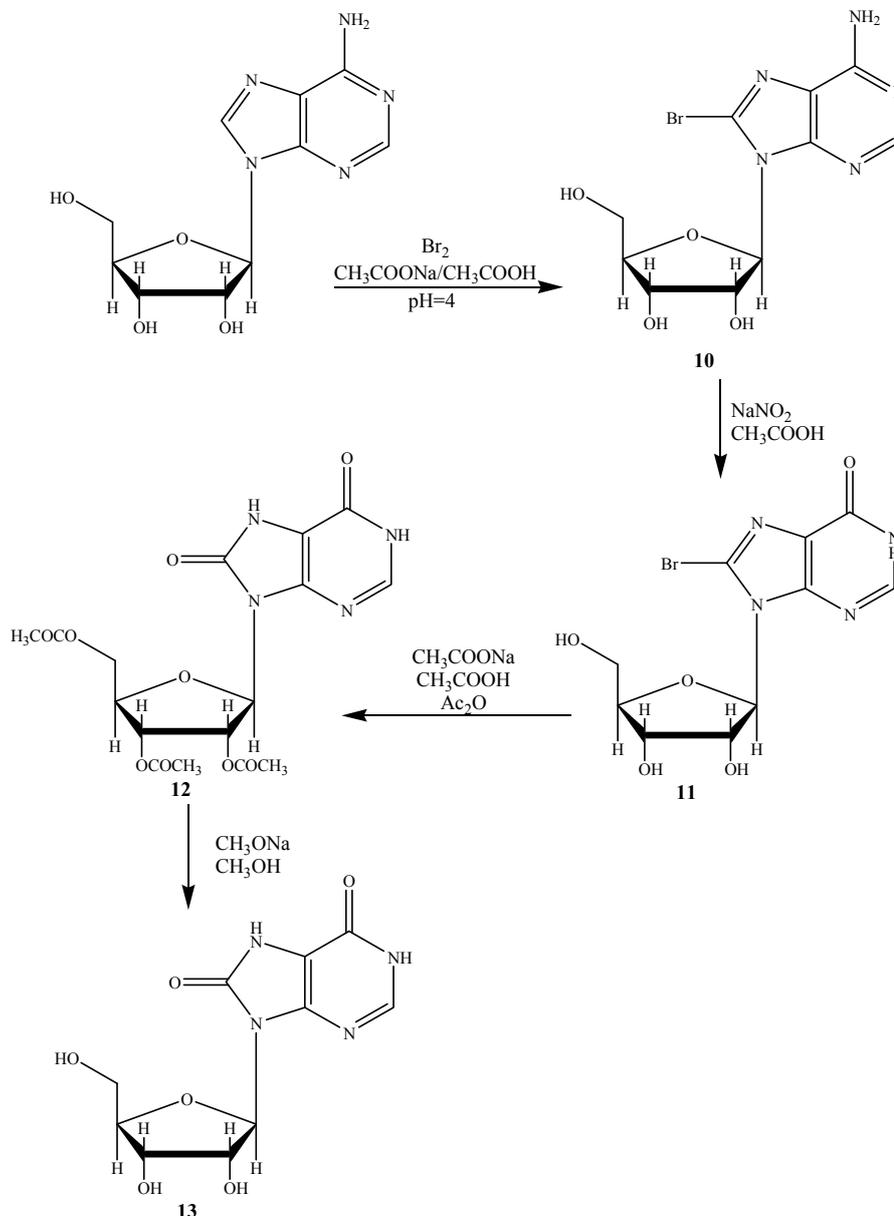


Figura 5.16. Gruppi accettori/donatori (a) e tre possibili architetture supramolecolari: nastro (b), quartetto (c), elica continua (d).

5.3.1 Sintesi e autoassemblaggio dei derivati della 8-ossinosina.

I derivati **8oxoI1** e **8oxoI2** sono stati sintetizzati secondo lo **schema1**



Schema 1

Si effettua la bromurazione diretta dell' adenosina in una soluzione tampone di sodio acetato, successivamente la 8-Br-adenosina viene convertita in 8-Br-inosina per diazotazione in ambiente acido con nitrito di sodio a freddo; si forma come intermedio lo ione diazonio che idrolizza in situ per dare la 8-bromoinosina. La sintesi del composto **12** consiste in una sostituzione nucleofila aromatica del bromo da parte dell'acetato che, per addizione-eliminazione alla funzione carbossilica, dà l'osso-derivato e libera una molecola di acido acetico. Le condizioni di reazione comportano l'acetilazione dei gruppi ossidrilici, i legami esterei sono stati scissi con metossido di sodio.

Dal composto **13**, per transesterificazione con l'anidride mista corrispondente si ottiene **8oxoI1**. Per ottenere l'**8oxoI2** è stato necessario sintetizzare il cloruro dell'acido paradodecilossibenzoico data la scarsa reattività sia dell'anidride simmetrica che delle possibili anidridi miste.

Nessuna mesofase è stata osservata per la **8oxoI1** in cloroformio e in esano, per concentrazioni inferiori al 80% *p/p*. Inoltre, negli stessi solventi, gli spettri di dicroismo circolare (figura 5.17) mostrano dei segnali molto deboli corrispondenti al cromoforo della 8-ossoinosina. La forma e l'intensità degli spettri CD suggeriscono l'assenza di un ordine di tipo elicoidale nella struttura supramolecolare.

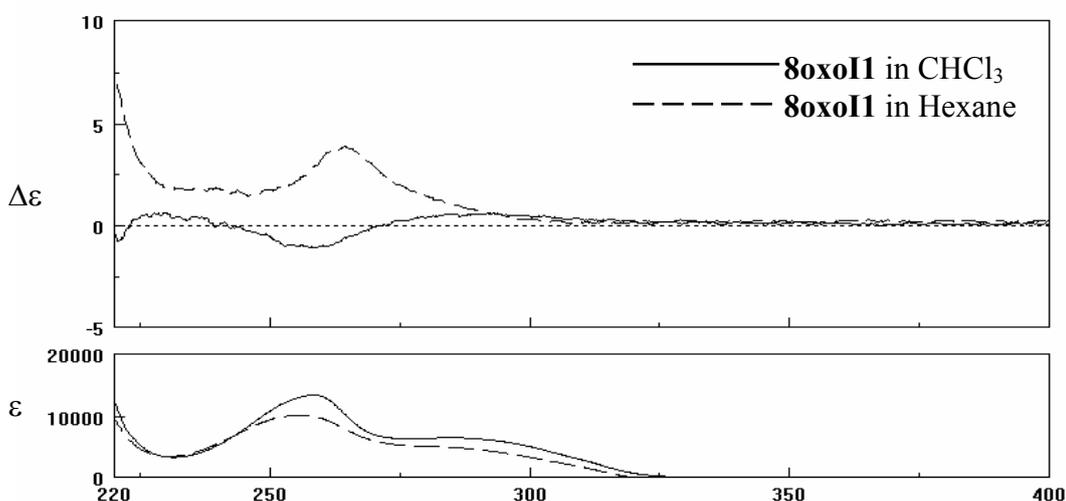


Figura 5.17. Spettri di dicroismo circolare e di assorbimento di **8oxoI1**.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 è molto simile a quello in DMSO: il passaggio da un ambiente disaggregante ad un ambiente lipofilo e privo di competitor per la formazione di legami a idrogeno che, nel caso di **8oxoG1**, favoriva l'aggregazione, non produce uno spostamento significativo dei chemical shift dei segnali o un allargamento di banda.

Questo comportamento potrebbe essere attribuito ad effetti di tipo solvofobico. Il liomesomorfismo è un comportamento tipico di molecole anfifile che presentano una parte lipofila ed una idrofila, nelle quali la spinta all'autoassemblaggio deriva dalla sottrazione della parte non affine al solvente dal contatto con esso. Nel composto **8oxoI1** l'assenza dell'ammino gruppo esociclico comporterebbe un aumento delle lipofilia della base che diverrebbe troppo simile a quella delle catene idrocarburiche venendo così a mancare la spinta termodinamica che è alla base dell'autoassemblaggio. Per verificare tale ipotesi è stato sintetizzato il composto **8oxoI2** nel quale i gruppi ossidrilici sono legati alla catena idrocarburica tramite un estere benzilico. La presenza della funzione aromatica rende più

lipofili i residui esaltando la differenza tra il core della molecola e la matrice che la circonda. In effetti il composto **8oxoI2** dà fasi liquido cristalline: al microscopio ottico si è osservata la presenza di una fase birifrangente in esadecano e in eptano per concentrazioni superiori al 2.3% e 3.5%, rispettivamente (figura 5.16).



Figura 5.18. Immagine ottenuta al microscopio ottico in luce polarizzata di una soluzione al 10% (p/p) in esadecano (ingrandimento 100x).

Esperimenti di diffrazione dei raggi X hanno confermato la presenza di un ordine liquido-cristallino. Per concentrazioni superiori al 15%, sono stati osservati una serie di picchi di diffrazione, come mostrato in figura 5.19. La regione di diffrazione dei raggi X a basso angolo è dominata da un picco intenso, la cui posizione dipende dalla concentrazione del solvente, mentre picchi di diffrazione di ordine più alto possono essere osservati solo con tempi di esposizione più lunghi. In condizioni ottimali, sono stati individuati due o tre picchi ulteriori che hanno permesso l'assegnazione della simmetria. Le spaziature reciproche dei vari picchi sono in rapporto $1:\sqrt{3}:\sqrt{4}:\sqrt{7}:\sqrt{9}$, che sta ad indicare un ordine di tipo esagonale degli elementi strutturali.

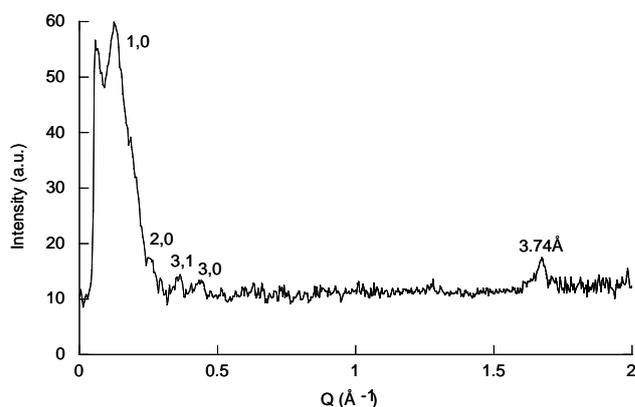


Figura 5.19. Profilo di diffrazione dei raggi X ottenuto per una soluzione del composto **8oxoI2** in esano ad una concentrazione = 30% p/p.

Nella regione ad alto angolo, è stato osservato un picco caratteristico centrato a circa 3.74 Å, la cui posizione è indipendente dalla concentrazione e riferisce della natura colonnare degli aggregati in accordo con l'ipotesi di arrangiamento delle basi impilate in una struttura ad elica e con quanto osservato per le 8-ossoguanosine. Assumendo che la distanza di impilamento tra i residui di 8-ossinosina sia il valore standard di 3.4 Å, il valore di 3.74 Å trovato, suggerisce che l'angolo formato dalle basi rispetto al piano perpendicolare dell'asse maggiore della struttura colonnare sia di circa 23°. Analogamente al derivato lipofilo della 8-ossoguanosina, la regione ad alto angolo è caratterizzata inoltre dalla presenza di una banda larga a $Q = 1.4 \text{ \AA}^{-1}$, correlabile alla disposizione disordinata dei sostituenti lipofili nella matrice idrocarburica.

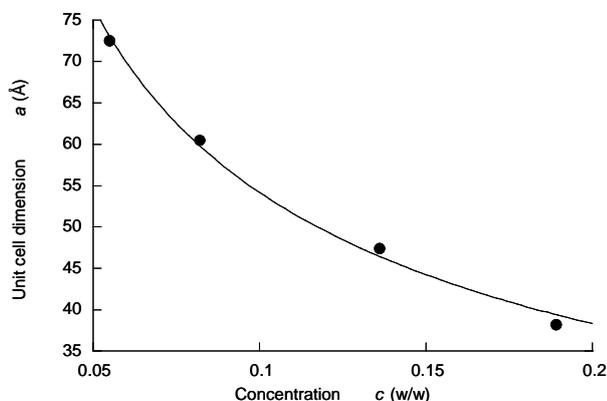


Figura 5.20. Dipendenza dalla concentrazione della dimensione della cella unitaria, misurata per la fase esagonale.

È interessante notare che la dipendenza della concentrazione dalle dimensioni dell'unità di cella è $c_{v,G}^{-1/2}$, ha cioè un andamento iperbolico che si adatta bene al modello di interazione di elementi colonnari (rods) di lunghezza infinita che si allontanano reciprocamente per diluizione. La rielaborazione dei dati ottenuti ha permesso di ricavare il raggio della sezione dell'elica della 8-ossinosina che misura circa 9 Å e di disegnare la mappa di distribuzione della densità elettronica riportata in figura 5.19. In confronto a quella ottenuta per il derivato della 8-ossoguanosina si nota una risoluzione sperimentale più bassa, che non impedisce di apprezzare una forte similitudine sia nella forma che nella dimensione.

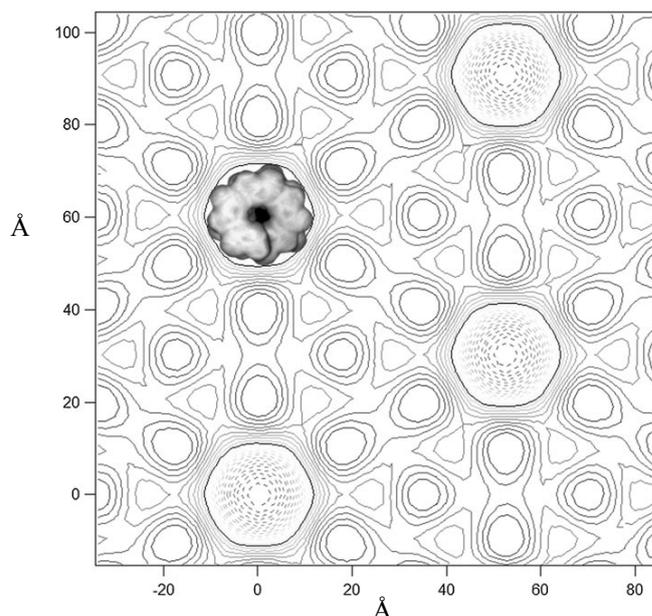


Figura 5.21. Mappa di distribuzione della densità elettronica per la mesofase formata dal composto **8oxoI2**.

Per ottenere delle informazioni sulla struttura supramolecolare adottata da **8oxoI2** in soluzione, è stato condotto uno studio comparato degli spettri in cloroformio e DMSO. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMSO registrato a temperatura ambiente mostra una singola serie di picchi, i cui chemical shift sono riportati in **tabella 2**. Per tutti i protoni, si sono registrati segnali di larghezza praticamente sovrapponibile ad esclusione dei protoni scambiabili, N1-H e N7-H, i quali sono circa sette volte più allargati. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in cloroformio alla stessa temperatura mostra anch'esso una singola serie di segnali, tuttavia questi sono significativamente più allargati: in particolare i segnali H-2, quelli relativi ai protoni dello zucchero e ai protoni ammidici sono fino a 40-50 volte più allargati e appiattiti.

Table 2. ^1H NMR (400 MHz) chemical shifts for a 13 mM solution of **2b** (25 °C). Assignments were made on the basis of COSY, NOESY, and ROESY spectra.

Solvent	NH(1)	NH(7)	H(2)	H(1')	H(2')	H(3')	H(4')	H(5'/5'') ^[a]	Ph protons
CDCl_3	12.39	11.20	7.81	6.35	6.53	6.16	4.70	4.77, 4.67	8.07–7.84, 6.82
$[\text{D}_6]\text{DMSO}$	12.68	11.59	7.92	6.07	6.30	6.04	4.65	4.59, 4.48	7.88–6.88

[a] Diastereotopic protons have not been assigned.

Tabella 2.

Quando, come nel nostro caso, si possiede un modello di aggregazione della molecola, la conferma dell'assunzione di quella particolare struttura supramolecolare in soluzione può essere fatta discriminando negli spettri NOESY registrati in cloroformio i cross-peak intermolecolari per confronto con l' analogo spettro in DMSO. Nel nostro caso, non è stato possibile applicare questa procedura poiché la massa molecolare ($M_w=1149.50$) è tale che in

entrambi i solventi i segnali dei cross-peak sono dello stesso segno della diagonale. Ciò nonostante una prova indiretta dell'aggregazione è stata ottenuta attraverso l'analisi degli spettri ROESY, i quali sono stati preferiti ai NOESY per la loro possibilità di distinguere tra un cross-peak generato da un'interazione attraverso lo spazio e uno generato da uno scambio chimico¹⁷. In soluzione possono essere ipotizzati due modelli di autoassemblaggio: uno basato su legami ad idrogeno tra il gruppo ammidico N7H-C8O di una molecola e il gruppo ammidico N1H-C6O di un'altra molecola, l'altro basato su legami ad idrogeno intermolecolari dei due gruppi ammidici N7H-C8O e dei due gruppi ammidici N1H-C6O. Il primo modello porta ad un assemblato tipo G-quartetto o elica continua, il secondo modello porta invece un assemblato tipo nastro. Per dimostrare che l'arrangiamento supramolecolare ad elica, ipotizzato attraverso gli esperimenti di diffrazione dei raggi X, esiste anche in soluzione isotropica, siamo partiti dalla considerazione che, in accordo con i modelli, un tale arrangiamento implica una distanza intermolecolare tra l'N7-H di una molecola e l'H-2 di un'altra situata ad un livello superiore lungo l'elica, minore della distanza intramolecolare degli stessi (5.9 Å). Pertanto, nella struttura ad elica, si dovrebbe registrare un intenso cross-peak ROESY tra l'N7-H e l'H-2 in cloroformio che non esiste in DMSO. Gli esperimenti ROESY eseguiti hanno segnalato l'effettiva presenza di questo cross-peak nella sola soluzione in cloroformica avente con un segno contrario a quello della diagonale a dimostrazione della genuinità del segnale ROE. Gli accoppiamenti NOE di cui sopra, evidenziati in figura 5.22, si generano per l'accoppiamento degli idrogeni appartenenti a molecole in stacking, questo dato considerato singolarmente non prova l'esistenza in soluzione della super-elica ma esclude in modo definitivo la possibilità dell'esistenza di un aggregato tipo nastro in cloroformio.

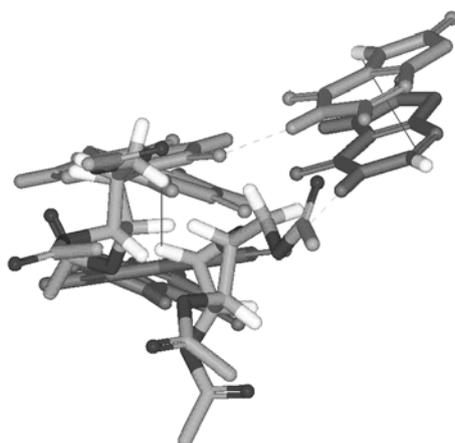


Figura 5.22. Rappresentazione molecolare di un frammento di elica supramolecolare del composto **8oxoI**. Le linee rappresentano i contatti ROE tra H(1')-H(5'/5'') e H(2)-N(H7).

L'autoassemblaggio di **8oxoI2** è stato studiato anche attraverso il dicroismo circolare (figura 5.23). Nello spettro di assorbimento si registra una prima intensa banda intorno a 250-260 nm (con una spalla a 275 nm) e una seconda banda intorno a 215 nm. In metanolo (in cui le strutture supramolecolari della guanosina sono generalmente assenti) lo spettro CD mostra un segnale debole per entrambe le lunghezze d'onda. Al contrario, lo spettro CD registrato in solventi idrocarburici mostra un segnale molto più forte nella regione intorno ai 230-280 nm e un segnale eccitonico bi-segnato molto intenso centrato a 215 nm che non cambia con la concentrazione in un range di 0.01-1 mM.

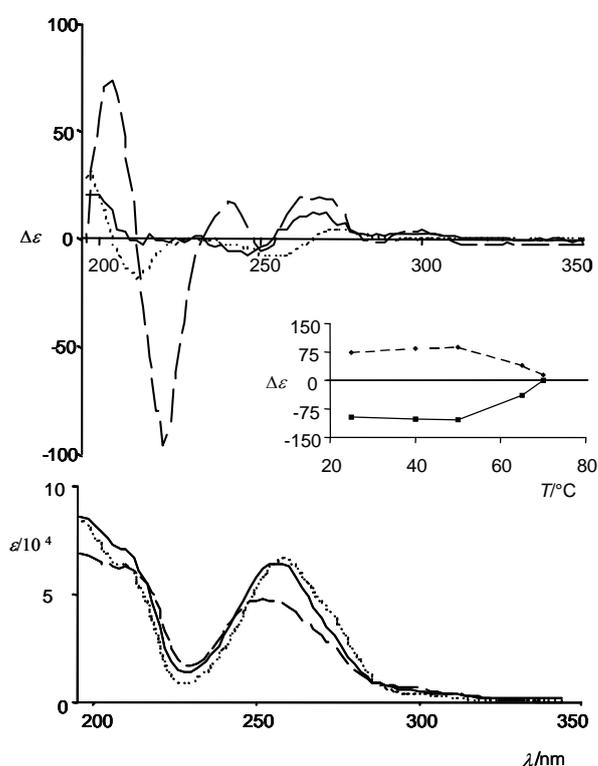


Figura 5.21. Spettri CD e assorbimento di una soluzione 1 mM del composto **8oxoI2** in metanolo (25°C, linea punteggiata), in cicloesano a 25°C (linea tratteggiata) e a 70°C (linea continua). Nel riquadro: il profilo di melting in cicloesano a 203 nm (linea tratteggiata) e a 220 nm (linea continua).

Con l'aumento della temperatura, la forma dello spettro CD si mantiene costante fino a circa 50°C inizia poi diminuire e a 70°C l'accoppiamento eccitonico a 215 nm è praticamente scomparso. Siccome gli assegnamenti delle transizioni elettroniche per il cromoforo 8-ossoipoxantina non sono disponibili e poiché, inoltre, nel composto **8oxoI2** il cromoforo benzilico contribuisce al segnale CD, un'analisi dettagliata dello spettro non è possibile. Comunque, possono essere fatte alcune considerazioni importanti: 1) gli andamenti degli

spettri in metanolo e cicloesano assomigliano a quelli registrati per gli **8-oxoG** derivati³⁰; 2) l'intensità del segnale CD e il g-factor ($\Delta\epsilon/\epsilon$) in cicloesano sono compatibili solo ammettendo l'esistenza di una struttura estremamente chirale, molto più che le strutture chirali formate dai G-quartetti impilati.

5.4. Conclusioni.

Considerando che 1) è riportata in letteratura la formazione di G-quartetti anche in assenza di cationi, ma che in tali condizioni essi non possono impilare in aggregati colonnari chirali¹⁷, 2) che il fattore di anisotropia, g, dei derivati 8-osso, è molto più alto di quello visto per i G-quartetti impilati di guanosine lipofile, 3) che gli spettri ¹H-NMR mostrano un singolo set di segnali diversamente da quelli registrati per le strutture colonnari basate su G-quartetti impilati che mostrano set di segnali multipli¹⁸, è verosimile ipotizzare che la struttura supramolecolare adottata preferenzialmente dal derivato **8oxoG1** e da **8oxoI2** sia quella ad elica continua e in cui l'ammino-gruppo esociclico non partecipa alla formazione dei legami a idrogeno.

Bibliografia.

1. V. Gubala, J. E. Betancourt, J. M. Rivera, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 4735.
2. J. L. Sessler, J. Jayawickramarajah, M. Sathiosatham, C. L. Sherman and J. S. Brodbelt, *Org. Lett.*, **2003**, 5, 2627.
3. M. M Cai, A. L. Marlow, J. C. Fettinger, D. Fabris, T. J. Haverlock, B. A. Moyer, J. T. Davis, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2000**, 39, 1283.
4. T. Giorgi, S. Lena, P. Mariani, S. Masiero, S. Pieraccini, J. P. Rabe, P. Samorì, G. P. Spada, G. Gottarelli, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 14741.

5. C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1109; M. Berger, C. Anselmino, J.-F. Mouret, J. J. J. Cadet, *Liq. Cromatogr.*, **1990**, 13, 929; R. N Goyal, N. Jain, D. K. Garg, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1997**, 43, 105; H. Ikeda, M Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 836.
6. W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*; Springer-Verlag: New York, 1984; p 21; E. Dias; J. L Battiste, J. R. Williamson, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4479; C. Altona, M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 8205.
7. M. Polissiou, T. Theophanides, *Inorg. Chim. Acta* **1987**, 195.
8. V. Luzzati, In *Biological Membranes*; D. Chapman Ed.; Academic Press: London, **1968**, 71.
9. G. Gottarelli, G. P. Spada, P. Mariani, In *Crystallography of Supramolecular Compounds*; G. Tsoucaris, J. L. Atwood, J. Lipkowski Eds., Kluwer: Netherlands, **1996**, 307.
10. P. Mariani, C. Mazabard, A. Garbesi, G. P. Spada, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 6369.
11. S. Bonazzi, M. Capobianco, M. M. De Morais, A. Garbesi, G. Gottarelli, P. Mariani, M. G. Ponzi Bossi, G. P. Spada, L. Tondelli, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 5809.
12. N. Sreerama, R. W. Woody, In *Circular Dichroism: Principles and Applications*; N. Berova, K. Nakanishi, R. Woody, Eds.; Wiley: New York, NY, **2000**, 601 and DNA (Johnson, W. C. In *ibid.*, 703).
13. R. Lazzaroni, A. Calderone, J. L. Brédas, J. P. Rabe, *J. Chem. Phys.*, **1997**, 107, 99.
14. S. Lena, M. A. Cremonini, F. Federiconi, G. Gottarelli, C. Graziano, L. Laghi, P. Mariani, S. Masiero, S. Pieraccini, G. P. Spada, *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 3441.
15. R. Rinaldi, G. Maruccio, A. Biasco, V. Arima, R. Cingolani, T. Giorgi, S. Masiero, G. P. Spada, G. Gottarelli, *Nanotechnology*, **2002**, 13, 398.
16. D. Haldar, H. Jiang, J. M. Léger, I. Huc, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5609; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 5483.
17. J. L. Sessler, M. Sathiosatham, K. Doerr, V. Lynch, K. A. Abboud, *Angew. Chem.*, **2000**, 112, 1356; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1300; F. W. Kotch, V. Sidorov, Y. F. Lam, K. J. Kayser, H. Li, M. S. Kaucher, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 15140; T. N. Pham, S. Masiero, G. Gottarelli, S. P. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 16018.
18. E. Mezzina, P. Mariani, R. Itri, S. Masiero, S. Pieraccini, G. P. Spada, F. Spinozzi, J. T. Davis, G. Gottarelli, *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 388.

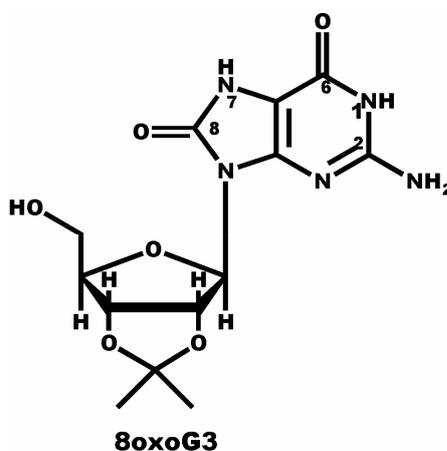
Capitolo 6. L'elica delle 8-ossoguanosine come templatato per lo scaffolding di gruppi funzionali.

6.1. Introduzione.

L'interesse per la chimica supramolecolare delle guanosine non è soltanto di natura teorica, ma è soprattutto rivolto alle numerose potenziali applicazioni nei diversi settori delle nanotecnologie: l'obbiettivo ultimo è quello di sfruttare la capacità delle guanosine di aggregarsi in strutture definite e con un buon livello di riproducibilità per ottenere nanomateriali funzionali ossia per orientare e disporre elementi con proprietà fisiche, elettroniche, ottiche secondo una geometria definita e sperabilmente ottimale per l'esaltazione delle proprietà suddette.

Nell'ipotesi di utilizzare l'elica delle 8-ossoguanosine come templatato per organizzare intorno all'aggregato piccole molecole abbiamo identificato due possibili strategie:

1. cercare le condizioni ottimali per indurre un'interazione tra l'ammino gruppo che non partecipa alla formazione dei legami a idrogeno e la funzione carbossilica di acidi organici;
2. funzionalizzare il nucleoside con una molecola achirale covalentemente legata che assorba nella regione del visibile per poter seguire la formazione dell'elica dalla comparsa nello spettro CD di un segnale di dicroismo nella zona spettrale del visibile. A questo scopo è stata sintetizzato il composto **8oxoG3** da usare come modello semplificato per la sintesi di guanosine funzionalizzate in 5'.



6.2. Elica supramolecolare delle 8-ossoguanosine ed acidi organici.

Nel tentativo di valutare la possibilità di sfruttare l'elica supramolecolare delle **8oxoG1** e **8oxoG2**¹ per lo scaffolding di acidi organici attraverso l'interazione con la funzione amminica libera sono stati saggiati differenti acidi organici con proprietà ottiche, lipofilia e struttura molto differenti.

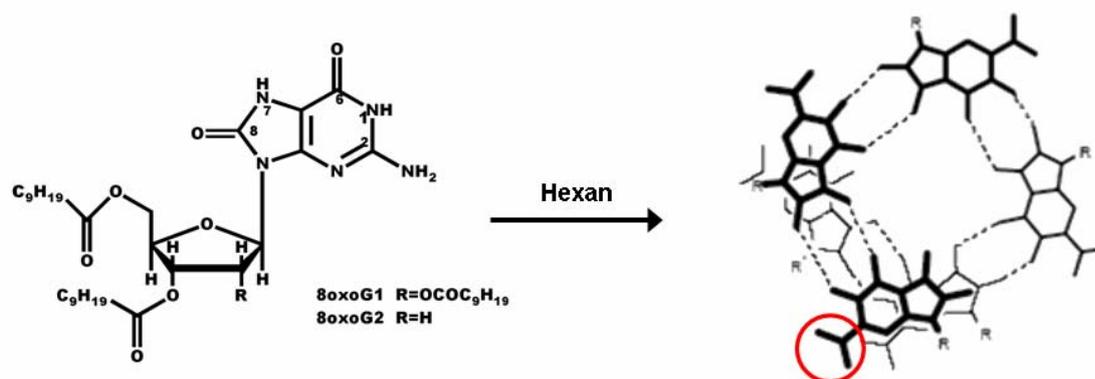


Figura 6.1. Elica supramolecolare delle 8-ossoguanosine in esano, in evidenza la funzione amminica che non partecipa alla formazione di legami a idrogeno.

Una punta di spatola di acido 3,5-dinitrobenzoico è stata aggiunta ad una aliquota di soluzione di **8-oxoG2** in esano, solvente nel quale l'acido è insolubile. La sospensione è stata lasciata in agitazione per una notte quindi abbiamo registrato spettro CD e UV del surnatante. Lo spettro è meno intenso e il segnale è totalmente diverso ma tende ad aumentare nel tempo così come riportato in figura 6.2 e non coincide con lo spettro CD della sola 8-ossoguanosina dissociata.

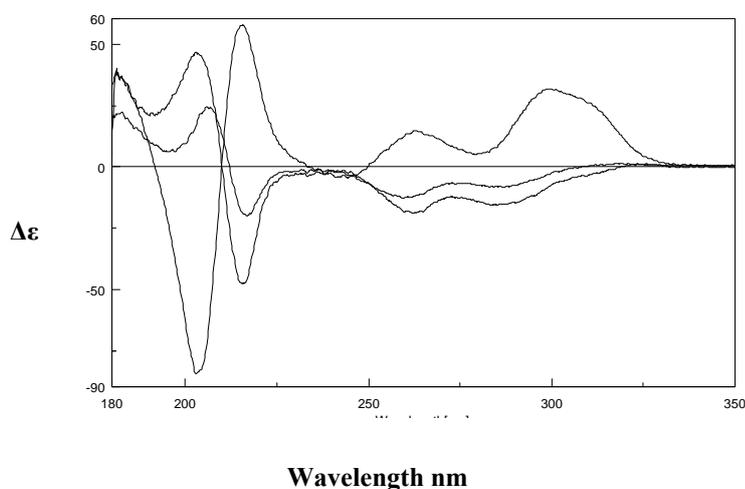


Figura 6.2. Spettro CD dopo estrazione di acido dinitrobenzoico dopo 24h (linea tratteggiata); dopo 4gg (linea continua), soluzione madre **oxoG2** 1.6mM in esano (linea punteggiata).

Dallo spettro di assorbimento si è potuto valutare che la quantità di acido che viene estratto è costante nel tempo, e che quindi la solubilizzazione dell'acido è un processo veloce mentre è lento il processo di riorganizzazione della struttura supramolecolare.

La struttura formatasi non è stabile termicamente, inizia a disaggregare già a 45°C e il segnale CD si riporta irreversibilmente a quello di **8oxoG2** dissociata a 60°C.

L'estrazione dello stesso acido da una soluzione di **8oxoG1** non produce alcuna variazione dello spettro di dicroismo circolare della soluzione madre ma una lieve modifica dello spettro di assorbimento che indica che una minima percentuale di acido è passata in soluzione.

Lo studio di stabilità per diluizione e per riscaldamento delle strutture supramolecolari di **8oxoG1** e **8oxoG2** in esano ha evidenziato una maggiore instabilità del derivato deossi che si manifesta anche con una scarsa riproducibilità nel grado di assemblaggio delle molecole. Ciò potrebbe indurre nel derivato **8oxoG1** una maggiore plasmabilità della struttura supramolecolare e quindi aumentare la propensione all'interazione con l'acido.

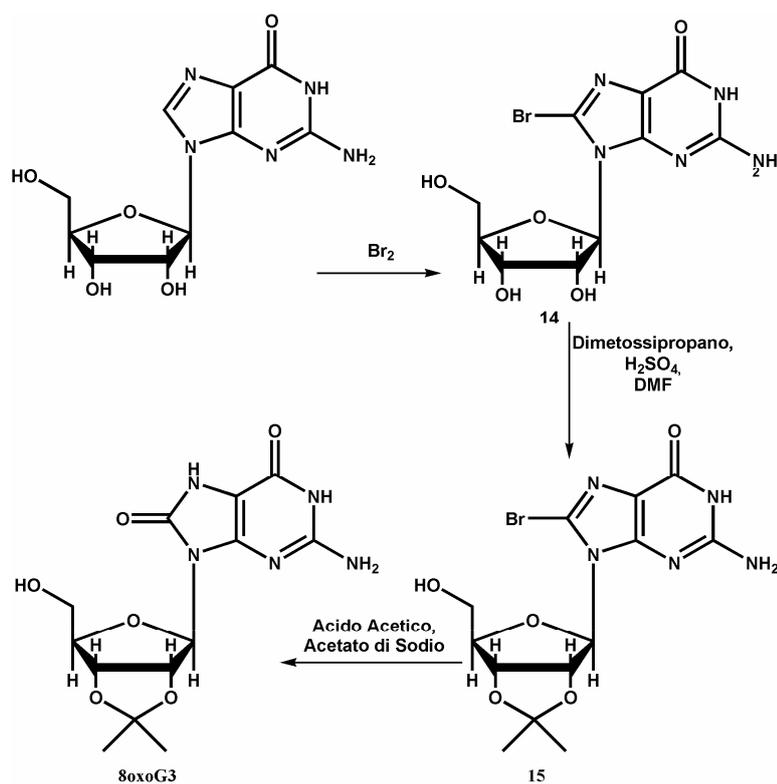
Abbiamo saggiato l'interazione con l'acido paradodecilossibenzoico, l'acido benzoico, acido adipico, acido trifluoroacetico e in nessun caso si è ripresentato lo stesso fenomeno.

Poiché è noto che i sistemi aromatici con due sostituenti nitro possono interagire con i G-quartetti impilati da cationi² per valutare se non si riproducesse anche in questo sistema una interazione simile, abbiamo saggiato anche l'attività della 3,5-dinitrobenzammide e dell'estere metilico dell'acido 3,5-dinitrobenzoico. È stata poi valutata l'interazione con molecole recanti un cromoforo che assorbe nel visibile per poter evidenziare l'eventuale comparsa di un segnale di dicroismo indotto dalla associazione: né il bis-(3,5-dinitro-fenil)-diazene, né l'acido retinoico hanno indotto l'inversione del segnale di dicroismo sul cromoforo guanina e neppure è comparso CD indotto in corrispondenza dei nuovi cromofori.

Non si è potuto in nessun caso registrare un'interazione del tipo riportata per l'acido dinitrobenzoico. Generalmente, se si esclude il caso dell'acido 3,5-dinitrobenzoico, in relazione alla solubilità dell'acido nel solvente, la **8oxoG2** o non estrae l'acido e quindi mantiene il suo stato di aggregazione oppure la dissoluzione dell'acido nella soluzione determina la disaggregazione.

6.3. Chimica supramolecolare della 2',3'-O-isopropiliden-8-ossoguanosina: un'indagine preliminare.

Data la struttura supramolecolare ad elica continua di 8-ossoguanosine la funzionalizzazione del nucleoside con una molecola achirale che assorba nella regione del visibile dovrebbe comportare la comparsa nello spettro CD di un segnale di dicroismo indotto. Ciò avrebbe due importanti ripercussioni: da una parte fornirebbe un modo per ottenere e indagare con facilità la formazione di materiali funzionalizzati che, a seconda dei sostituenti inseriti, potrebbero trovare una loro applicazione nel campo delle nanotecnologie e dei nanomateriali, dall'altra fornirebbe un'ulteriore e inequivocabile prova della veridicità del modello di autoassemblaggio proposto per gli 8-ossoderivati. A questo scopo è stata sintetizzato il composto **8oxoG3**, secondo lo schema 3 riportato, da usare come modello semplificato per la sintesi di guanosine modificate in 5'.



Schema 3.

Durante la sintesi ci si è resi conto che **8oxoG3** forma gel in etanolo. Questo comportamento è abbastanza anomalo in quanto, come precedentemente esposto nel corso di questa trattazione (vedi capitoli 3-5), fino a questo momento era stata descritta la formazione di gel in acqua per le guanosine fosfato³ e in solventi apolari per le guanosine lipofile^{1,4}.

Al 3% (70 mM) la **8oxoG3** dà una soluzione birifrangente, all' 8.7% (0.22 M) il campione si presenta come un gel birifrangente. Una diversa tessitura è stata visualizzata al microscopio ottico in luce polarizzata per concentrazioni superiori al 10% (0.26 M). Su un campione del gel al 6% la diffrattometria a basso angolo ha evidenziato un picco a 3,4 Å che attribuisce la formazione del gel all'impilamento di basi aromatiche.

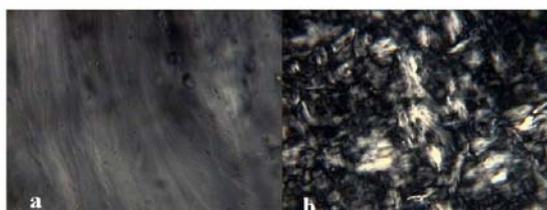


Figura 6.2. Immagini registrate al microscopio ottico in luce polarizzata di 8oxoG3 in etanolo all' 8.7% (a) e al 10% (b).

Nello spettro di dicroismo nessun segnale indicativo della formazione di una supramolecola chirale compare fino alla concentrazione 7.4×10^{-2} M (3%p/p). Per concentrazioni superiori il segnale aumenta ma è sempre monosegnato, comportamento che in genere si riscontra in mesofasi ordinate.

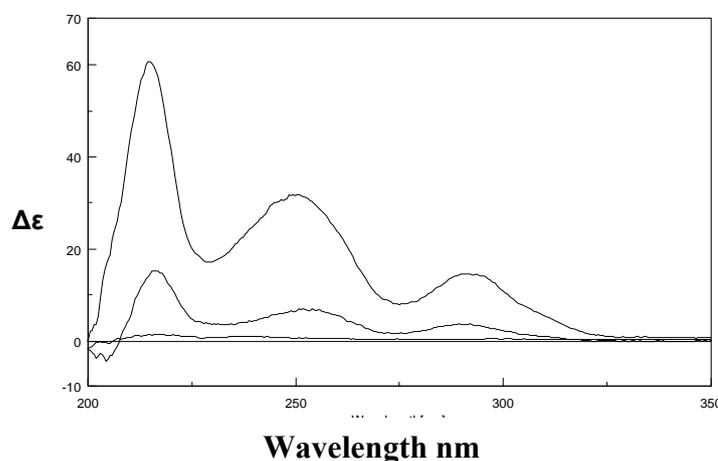


Figura 6.4. Spettri di dicroismo circolare di 8oxoG3 in etanolo 5×10^{-3} M (linea continua), 7.4×10^{-3} M (linea tratteggiata), 0.12 M (linea punteggiata).

Un comportamento simile a quello osservato nello studio in concentrazione è stato rilevato anche nello studio in temperatura. Partendo dalla soluzione 0.12 M o 7.4×10^{-2} M a temperatura ambiente, reversibilmente si ottiene un aumento del segnale di dicroismo per raffreddamento a 5°C e la disaggregazione a 70°C.

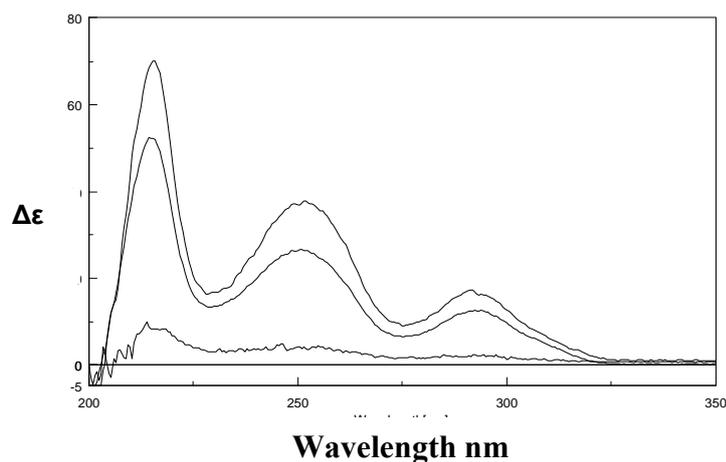
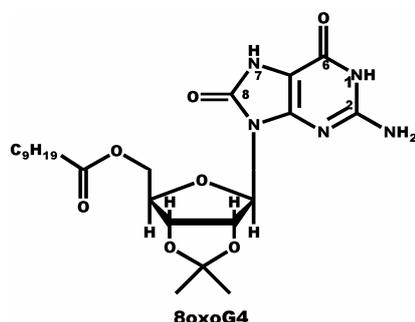


Figura 6.5. Spettri di dicroismo circolare di 8oxoG3 in etanolo 0.12 M a temperatura ambiente (linea punteggiata), a 68°C (linea tratteggiata), a 5°C (linea continua).

Prima di procedere allo studio di derivati di **8oxoG3** funzionalizzati occorre assicurarsi che la chimica supramolecolare dei derivati 8-osso-2',3'-isopropilidenici sia analoga a quella dei derivati ribo precedentemente caratterizzati motivo per cui ne è stato sintetizzato l' estere decanoico (**8oxoG4**).



Una prima analisi ha evidenziato la formazione di un gel scarsamente birifrangente tissotropico per concentrazioni comprese tra 0.4% e 15% p/p. È stato ottenuto da acetonitrile un precipitato birifrangente il cui habitus osservato al microscopio ottico è strutturato come dei nastri che si avvolgono su loro stessi tutti nello stesso verso, ma che purtroppo non è risultato essere adatti per la cristallografia ai raggi X .



Figura 6.6. Immagine al microscopio ottico del precipitato di **8oxoG4** da acetonitrile.

Bibliografia.

1. T. Giorgi, S. Lena, P. Mariani, S. Masiero, S. Pieraccini, J. P. Rabe, P. Samorì, G. P. Spada, G. Gottarelli, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 14741.
2. S. L. Forman, J. C. Fettinger, S. Pieraccini, G. Gottarelli, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 4060.
3. S. Bonazzi, M. Capobianco, M. M. De Morais, A. Garbesi, G. Gottarelli, P. Mariani, M. G. Ponzi Bossi, G. P. Spada, L. Tondelli, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5809.
4. G. Gottarelli, S. Masiero, E. Mezzina, S. Pieraccini, J. P. Rabe, G. P. Spada, P. Samorì, *Chem.-Eur.*, **2000**, 6, 3242.

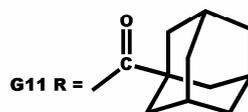
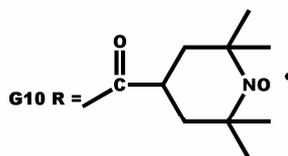
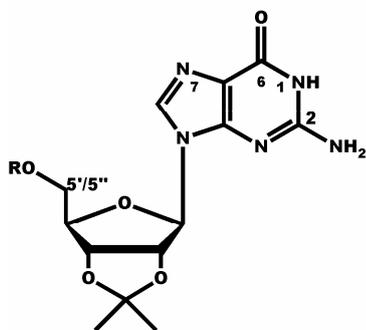
Capitolo 7. G-quadruplex per lo scaffolding di radicali persistenti: switch di interazioni spin-spin intermolecolari controllato dalla disponibilità del catione.

7.1. Introduzione.

Riuscire ad indurre e sopprimere reversibilmente le interazioni di spin in radicali organici rappresenta uno dei primari obiettivi per poter sviluppare nanodispositivi magnetici¹. Perché si possano registrare delle forti interazioni di spin i centri radicalici dovranno trovarsi molto vicini nello spazio, ovviamente questa condizione è relativamente semplice da realizzare in sistemi covalenti, in cui l'interazione avviene lungo i legami, e che pertanto sono stati molto ben codificati², mentre l'interazione tra radicali organici nello spazio è molto più difficile da ottenere perché i sistemi di spin spaiati devono trovarsi a breve distanza. Questo ultimo caso però è ben più interessante dato che il controllo dell'arrangiamento spaziale dei centri radicalici si tradurrebbe nel controllo delle interazioni di spin³. In questo capitolo illustrerò come i sistemi supramolecolari delle guanosine possano essere utilizzati per orientare nello spazio centri paramagnetici e come il controllo della struttura supramolecolare delle guanosine al variare delle condizioni sperimentali possa essere utilizzato per controllare l'accoppiamento di centri radicalici persistenti.

7.2. Sintesi di derivati paramagnetici delle guanosine.

Per verificare l'ipotesi di utilizzare le strutture supramolecolari delle guanosine lipofile per lo scaffolding di radicali persistenti abbiamo sintetizzato il derivato **G10** sostituito in 5' con un residuo 4-carbonil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Carbonil-TEMPO).



Abbiamo scelto di sintetizzare l'estere dell'acido carbossi-TEMPO perché è un radicale stabile e persistente. Schematicamente e in termini semplici la stabilità può essere attribuita alla possibilità di descrivere una struttura di risonanza a separazione di carica in equilibrio con

la forma radicalica; la persistenza si origina dall'assenza di idrogeni in posizione 3 che rende impossibili le reazioni di disproporzionamento.

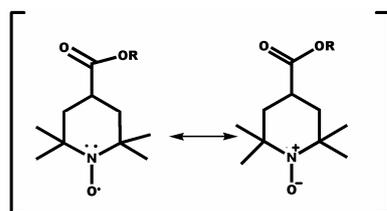
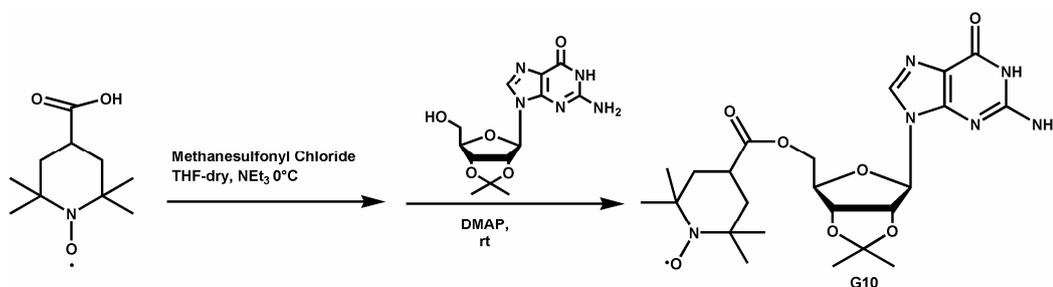


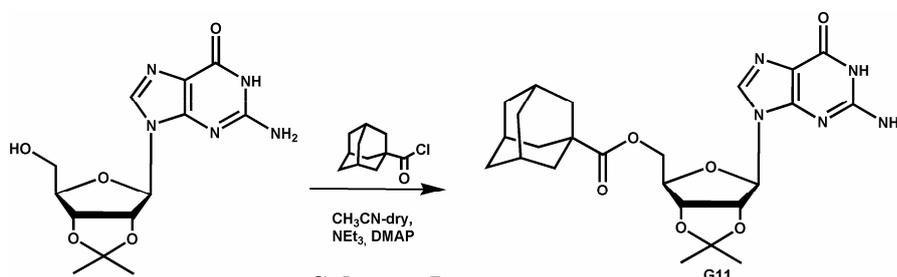
Figura 7.1. Strutture di risonanza di carbossi-TEMPO.

La sintesi di **G10** (schema 4), apparentemente semplice, è complicata dalla presenza del radicale che rende difficile la caratterizzazione del derivato. In particolare rende pressoché impossibile lo studio NMR.



Schema 4.

La caratterizzazione di **G10** è stata possibile in DMSO- d_6 previa riduzione in situ con fenilidrazina⁴ (maggiori dettagli al capitolo 8, parte sperimentale) mentre l'indagine NMR del comportamento supramolecolare di **G10** ha richiesto la sintesi del derivato **G11** molto simile a **G10** in quanto ad ingombro sterico sulla funzione 5' ma diamagnetico.



Schema 5.

7.3. Autoassemblaggio in presenza di cationi

Lo studio del comportamento supramolecolare di **G10** è iniziato dalla valutazione al CD della capacità dello stesso di produrre, in cloroformio in presenza di cationi, aggregati per impilamento di G-quartetti.

Dopo estrazione solido-liquido di potassio picrato si registra un intenso segnale nella zona compresa tra 250-300 nm, tipico di una struttura colonnare chirale composta da un minimo di due G-quartetti impilati^{5,6}. Prove di stabilità in temperatura e per diluizione hanno dimostrato che questa struttura resiste anche a notevoli modificazioni delle condizioni sperimentali: l'intensità del segnale CD non varia per concentrazioni comprese tra 0.05-10 mM e scaldando fino a 60°C.

Un segnale CD di minore intensità si registra anche nella soluzione madre di **G10** in cloroformio ed è stato attribuito alla contaminazione del campione da parte di ioni sodio, cosa per altro inevitabile data la nota forte tendenza delle guanosine 2',3'-*O*-isopropilidene a coordinare i cationi. La veridicità di tale ipotesi resta confermata dalla scomparsa dello stesso per aggiunta in soluzione di criptando [2.2.2] un agente chelante il potassio, ma che possiede una buona affinità anche per il sodio.

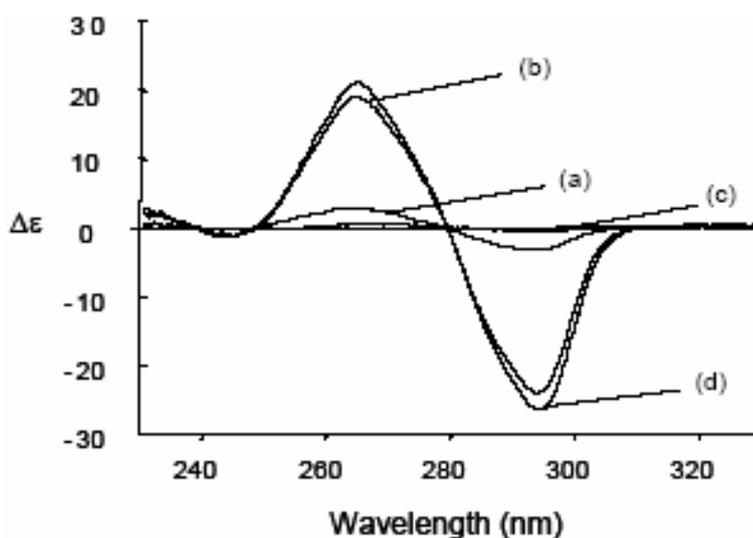


Figura 7.2. Spettri CD di **G10** 0.5mM in CHCl_3 (a), dopo estrazione di potassio picrato e lavaggio con acqua (b); (c) soluzione b dopo addizione di [2.2.2] criptando (0.25mM) alla soluzione; (d) soluzione c dopo addizione di picrato di potassio (1 mol/mol di [2.2.2] criptando). Lo spettro della soluzione c è perfettamente sovrapponibile a quello ottenuto per addizione di criptando alla soluzione cloroformica.

Lo studio EPR dei derivati supramolecolari di **G10** è stato possibile grazie alla collaborazione del Prof. Marco Lucarini dell'Università di Bologna.

Lo spettro EPR di **G10** presenta tre righe come atteso per specie nitrossido mono radicaliche ($a_N=15.9$ G, $g=2.0057$) in cui l'elettrone spaiato si accoppia solo con l'azoto avente numero quantico di spin nucleare $I=1$. Dopo estrazione di picrato di potassio cambia drasticamente e

presenta cinque righe equidistanziate separate da $a_N/2$. Ciò suggerisce la presenza in soluzione di un assemblato supramolecolare in cui i radicali nitrossido si vengono a trovare sufficientemente vicini da poter interagire nello spazio con un'interazione spin-spin avente una costante di accoppiamento $J \gg a_N$.

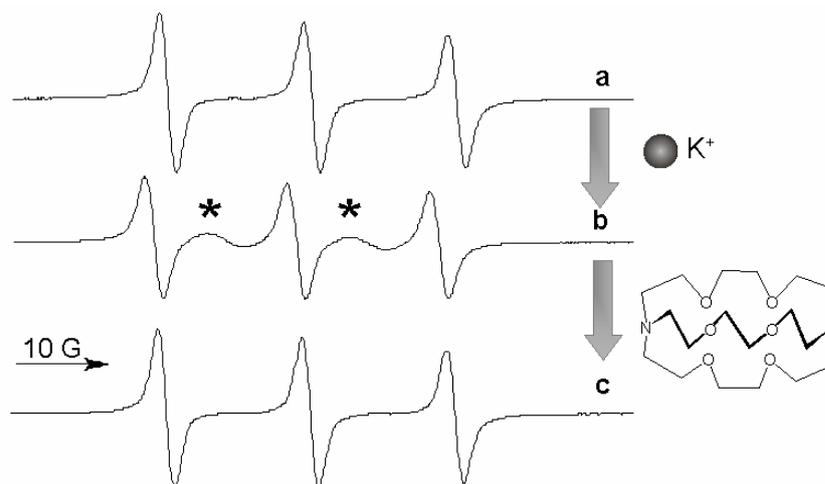


Figura 7.3. Spettri EPR di soluzioni di **G10** (0.5 mM) in CHCl_3 prima (a) e dopo (b) l'estrazione solido-liquido di picrato di potassio (c) soluzione b dopo lavaggio con acqua e addizione [2.2.2] criptando 1 mM.

La seconda e la quarta riga tendono a divenire più strette e più definite aumentando la temperatura, ma anche a 60°C , limite massimo raggiungibile in cloroformio, il rapporto d'integrazione dei segnali non raggiunge il valore teorico di 1:2:3:2:1 atteso per un biradiale (non covalente). La differenza tra l'integrazione dei segnali attesa e quella registrata è attribuibile alla sovrapposizione di due distinte specie paramagnetiche in equilibrio tra loro che interscambiano secondo tempi che sono lenti nella scala dei tempi EPR, l'uno generato da nitrossidi che non interagiscono tra loro ($J = 0$) l'altro dovuto a nitrossidi che possono interagire ($J \gg a_N$) in dipendenza della loro orientazione.

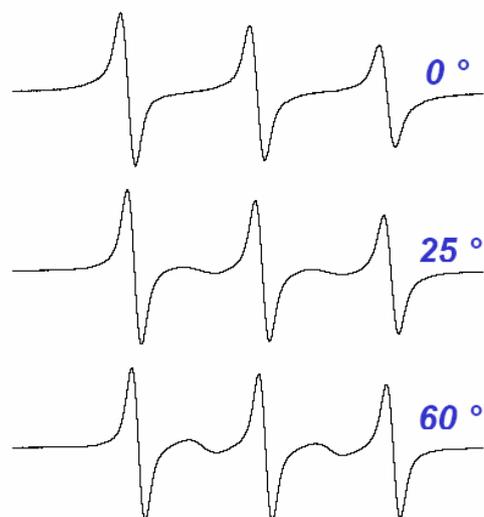


Figura 7.4. Spettri EPR di soluzioni di **G10** (0.5 mM) in CHCl_3 dopo estrazione di picrato di potassio a differenti temperature (scansione completa 75.6 G).

In figura 7.5 riporto lo spettro ^1H NMR di **G10** prima e dopo l'estrazione di picrato di potassio. A causa della presenza dell'unità paramagnetica gli spettri NMR sono caratterizzati da una scarsissima risoluzione ma alcune informazioni possono comunque essere ricavate dopo un'attenta osservazione.

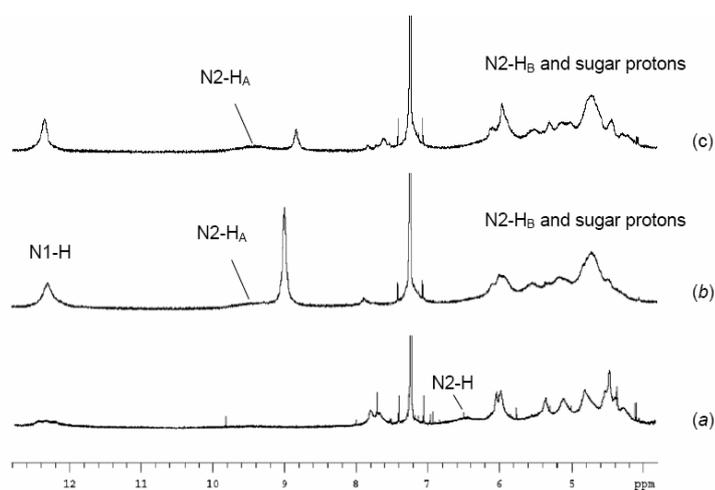


Figura 7.5. Spettri ^1H -NMR (600 MHz) di **G10** (10mM) in CDCl_3 prima (a) e dopo estrazione (b) di picrato di potassio; (c) soluzione b dopo lavaggio con acqua.

Uno dei protoni amminici N2-H si sposta da *ca.* 6.5 ppm (in DMSO $\delta = 6.6$ ppm) a 9.4 ppm, indicando la sua partecipazione alla formazione di legami ad idrogeno, così come si registra sempre nelle guanosine impegnate nella formazione di G-quartetti ⁸.

La determinazione della stechiometria del complesso dopo estrazione di picrato di potassio non è possibile sulla base degli spettri in figura 7.5, la scarsa risoluzione rende praticamente impossibile la corretta integrazione dei segnali. La diluizione della soluzione in DMSO-d₆ permette di ottenere dei segnali leggermente più risolti, sia perché la densità dei centri paramagnetici diminuisce e anche per la disaggregazione indotta dal solvente, in tali condizioni si è potuto misurare un rapporto **G10**/ K⁺ dopo estrazione solido-liquido di 2:1 descritto da una formula empirica [**G10**₈K₄](Pic₄), in seguito confermato anche da misure spettrofotometriche (vedi capitolo 8, Parte Sperimentale). Dopo lavaggio esauriente con acqua si forma una nuova specie con un rapporto molare **G10**/K⁺ 8:1 corrispondente all'aggregato [**G10**₈K](Pic). I due complessi hanno spettri CD (vedi figura 7.12) ed EPR (vedi figura 7.10) ed NMR (vedi figura 7.5) praticamente sovrapponibili.

La capacità delle guanosine di estrarre cationi in quantità superiore a quella massima coordinabile nella cavità centrale dei G-quartetti e anche la possibilità di rimuovere i sali per lavaggio con acqua sono note, anche se non del tutto chiarite, in letteratura ^{6,9}

Malgrado la pessima risoluzione è anche chiaro che gli spettri ¹H NMR di entrambi i complessi, 2:1 e 8:1, sono caratterizzati dalla comparsa di un unico set di segnali che riferisce della formazione in soluzione di una specie ottamerica composta di due quartetti che interagiscono con un'orientazione testa-testa o coda-coda (vedi capitolo 4). ^{6,8-10}.

Per poter raccogliere maggiori informazioni sull'aggregato ottamerico di **G10** abbiamo sintetizzato il derivato **G11** in cui il radicale nitrossido è stato sostituito da un adamantanoile strutturalmente e stericamente correlato con il carbonil-TEMPO ma diamagnetico.

Inizialmente è stata valutata la coincidenza del comportamento supramolecolare di **G11** con quanto osservato per **G10**. Gli spettri CD (figura 7.6) rispecchiano perfettamente quelli registrati per il derivato paramagnetico nelle medesime condizioni sperimentali.

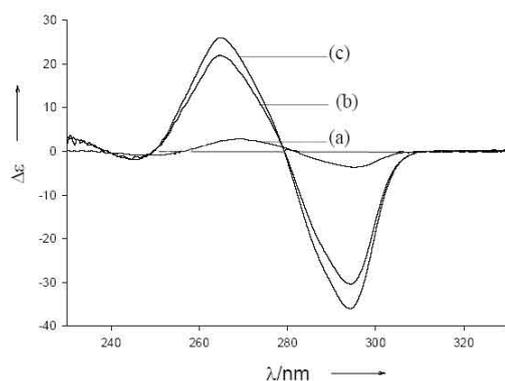


Figura 7.6. Spettri CD di **G11** 0.5mM in CHCl_3 (a), dopo estrazione di potassio picrato (b) dopo lavaggio con acqua (c).

Nello spettro NMR anche in questo caso si registra la differenziazione dei due protoni amminici N2-H a seguito dell'estrazione del potassio, il segnale centrati a 6.3 ppm nella soluzione madre è sostituito da due segnali molto allargati che cadono uno a 9.2 ppm (N2-H_A) e l'altro a 6.1 ppm (N2-H_B). L'allargamento dei segnali è tale per cui a temperatura ambiente quasi non riescono ad essere apprezzati, ma diventano più stretti ed emergono in maniera più chiara dalla linea di base se lo spettro viene registrato a -8°C .

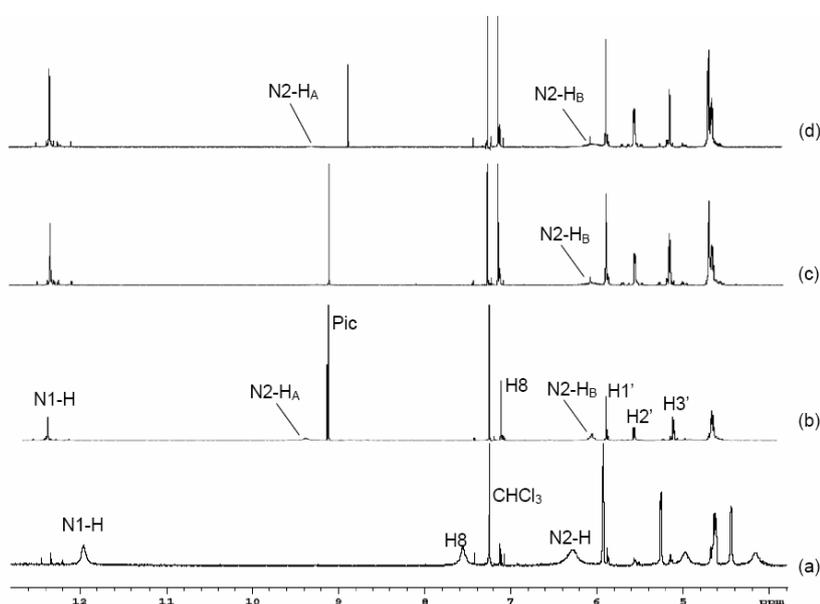


Figura 7.7. Spettri ^1H NMR (600 MHz) di **G11** in CDCl_3 (10 mM) (a) dopo estrazione di picrato di potassio a -8°C ; (b) dopo estrazione di picrato di potassio a 25°C (c) b dopo lavaggio con acqua a temperatura ambiente(d).

Anche in questo caso l'integrazione dei segnali indica che l'estrazione solido-liquido produce una specie con un rapporto molare $G11/K^+$ pari a 2:1 e che dopo il lavaggio lo spettro resta sostanzialmente identico ma il rapporto tra le integrazioni dei segnali delle guanosine e dei picrati diviene 8:1.

Nello spettro NOESY si registra un cross-pick intermolecolare tra H8 e N2H_A che è considerato indicativo della formazione di quartetti⁸. Un NOE inter-quartetto si registra tra H8 e H5'/5 che conferma la natura ottamerica del complesso. La maggiore intensità del cross-peak tra l'H8 e H1'rispetto a quello tra H8 e H2'suggerirebbe una conformazione preferenziale *syn* delle basi rispetto al legame glicosidico. Questo dato insieme al fatto che un unico set di segnali è presente negli spettri ¹H-NMR ci permette di affermare che tutte le guanosine devono adottare una conformazione *syn* in soluzione.

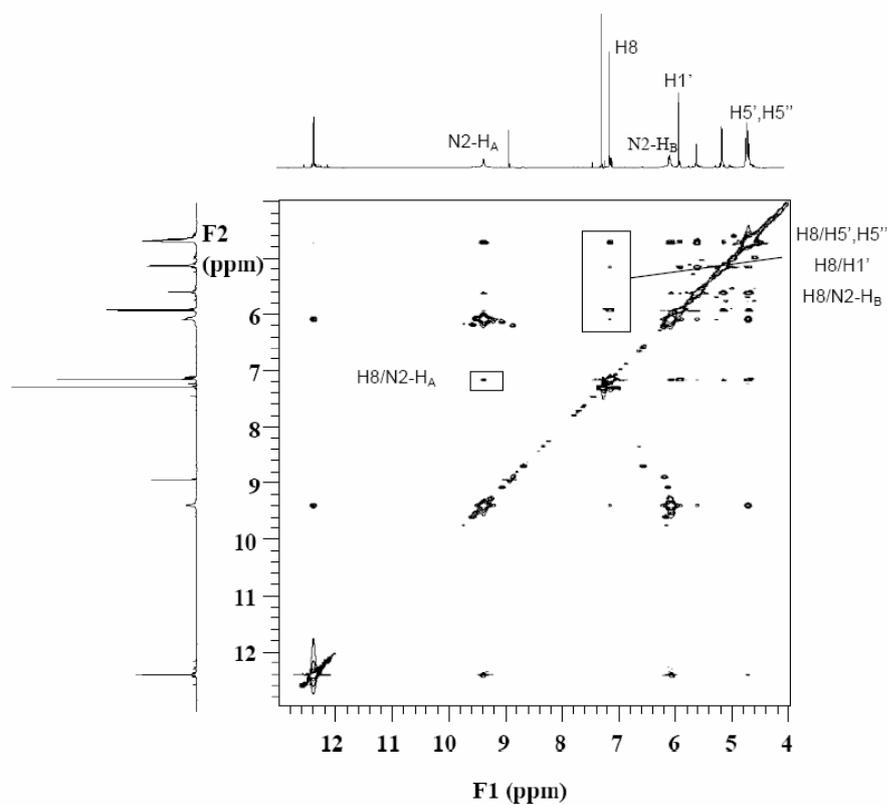


Figura 7.8. Spettro NOESY (600MHz mixing time=200msec) di **G11** in CDCl₃ (10mM) dopo estrazione di picrato di potassio e lavaggio con acqua a 0 °C.

Sulla base dei risultati ottenuti nell'indagine strutturale dei derivati supramolecolari di **G10** e **G11** in soluzione possiamo concludere che in presenza di K^+ entrambi assemblano in conformazione all-*syn*, in G-quartetti impilati di stabilizzati dalla coordinazione centrale un catione a dare un oggetto a simmetria D_4 . Gli ottameri di entrambe le specie hanno la possibilità di legare in maniera più blanda ulteriori tre molecole di potassio picrato. Sul derivato paramagnetico l'indagine EPR ha indicato la presenza di due differenti tipi di unità nitrossidiche che devono originarsi, da variazioni conformazionali delle stesse, lente nella scala dei tempi EPR ma veloci per i tempi NMR.

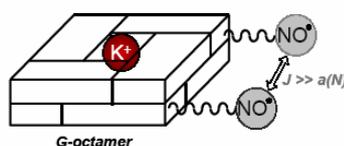


Figura 7.9. Rappresentazione schematica del modello di aggregazione proposto per sulla base dei dati EPR ed NMR.

7.4. Switch, controllato dal catione, dell'interazione di spin intermolecolare nel derivato supramolecolare di una guanosina paramagnetica.

La guanosina **G10** paramagnetica in presenza di ioni potassio assembla in una struttura ottamerica descritta dalla formula empirica $[G10_8K]^+$, abbiamo già discusso di come la formazione di questo aggregato possa essere seguita al CD dalla comparsa di un intenso segnale di assorbimento differenziale e all' EPR dalla comparsa di uno spettro di cinque righe dovuto all' interazione di scambio spin-spin tra due centri radicalici che nell' assemblato vengono trovati sufficientemente vicini nello spazio. Poiché la forza principale che trattiene due G-quartetti impilati deriva dalla coordinazione di un catione nella cavità centrale in cui sporgono i residui carbossilici C6 delle basi guaniniche, l'interazione spin-spin potrà essere reversibilmente indotta o soppressa aggiungendo o sottraendo cationi, la rimozione del catione si tradurrà nella disaggregazione della struttura ottamerica¹².

Il criptando [2.2.2] lega con un'ottima affinità il potassio e compete efficacemente in soluzione con le guanosine per la coordinazione dello stesso. Se aggiunto alla soluzione di $[G10_8K]^+$ in eccesso (quattro equivalenti) ne determina la disaggregazione come dimostrato dalla scomparsa del couplet negativo nello spettro CD (vedi figura 7.2) e dalla registrazione

dallo spettro EPR di un radicale nitrossido isolato (tre righe). L'estrazione nella stessa soluzione di un equivalente (rispetto al criptando) di picrato di potassio ripristina completamente il comportamento spettroscopico CD ed EPR del sistema aggregato.

In figura 7.10 si riporta un ciclo completo di induzione-soppressione-induzione dell'interazione spin-spin.

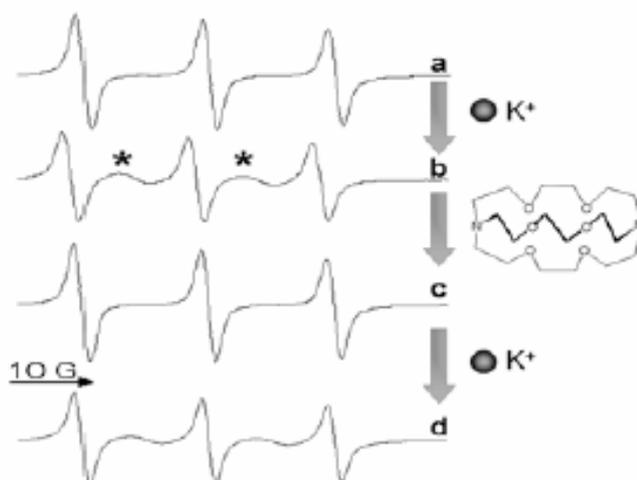


Figura 7.10. Spettri EPR di soluzioni di **G10** (0.5 mM) in CHCl_3 prima (a) e dopo (b) l'estrazione solido-liquido di picrato di potassio (c) soluzione b dopo lavaggio con acqua e addizione [2.2.2] criptando 1 mM.(d) soluzione c dopo l'aggiunta di picrato di potassio (1 mol/mol di [2.2.2] criptando).

La disaggregazione indotta dall'aggiunta di [2.2.2] criptando è confermata anche dagli spettri $^1\text{H-NMR}$, in cui, malgrado la risoluzione limitata dalla presenza di radicali spaiati in soluzione, viene indicata chiaramente dalla coalescenza dei protoni amminici $\text{N}_2\text{-H}_\text{A}$ e $\text{N}_2\text{-H}_\text{B}$. Anche in questo caso, così come precedentemente osservato in DMSO, la disaggregazione produce un miglioramento nella risoluzione.

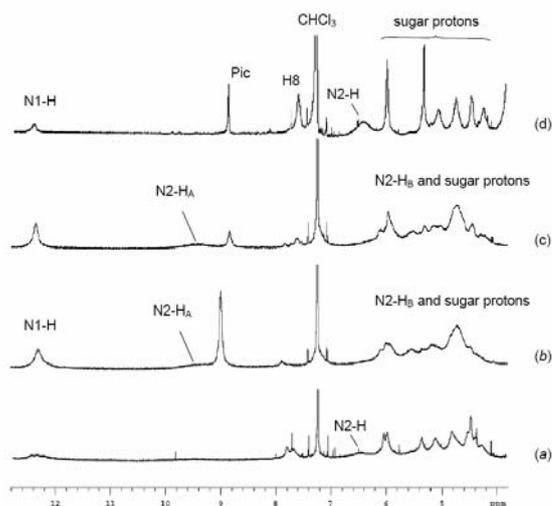


Figura 7.1.1 Spettri ^1H NMR (600 MHz) di soluzioni di **G10** in CDCl_3 (10 mM) (a) prima e (b) dopo estrazione di picrato di potassio; (c) soluzione b dopo lavaggio con acqua; (d) soluzione c dopo aggiunta di [2.2.2] criptando (5 mM.).

È noto che una volta aggiunto il criptando la disponibilità di cationi liberi per la coordinazione e l'impilamento da parte dei G-quartetti può essere controllata variando il pH della soluzione¹². Un pH acido determina la protonazione degli azoti ammonici terziari del criptando riducendo di diversi ordini di grandezza l'affinità per il catione e inducendone il rilascio.

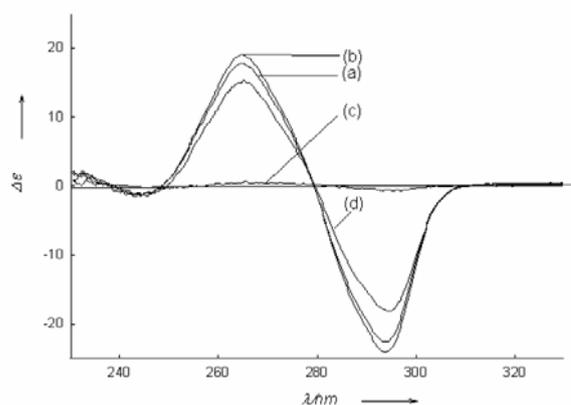


Figura 7.12. Spettri CD di **G10** (0.5 mM in CHCl_3) (a) dopo estrazione solido liquido (rapporto molare $\text{G10}/\text{K}^+$ (2:1); (b) campione a dopo lavaggio con acqua (rapporto molare $\text{G10}/\text{K}^+$ (8:1); (c) campione b per aggiunta di [2.2.2] criptando 0.25 mM; (d) campione c per aggiunta di acido trimetansulfonico 0.9 mM.

Purtroppo causa anche la scomparsa del segnale EPR perché l'aumento di acidità determina la riduzione dei nitrossidi a unità diamagnetiche. Ciò non compromette però la capacità di **G10** di autoassemblare come dimostrato dall'intenso segnale di dicroismo registrato nella soluzione di $[\mathbf{G10}_8\mathbf{K}]^+$ e criptando dopo aggiunta di un'opportuna quantità di acido trimetansulfonico (vedi figura 7.12).

Lo stesso comportamento è stato riscontrato anche per **G11**: in figura 7.13 si riassume lo studio CD dello switch controllato dai cationi.

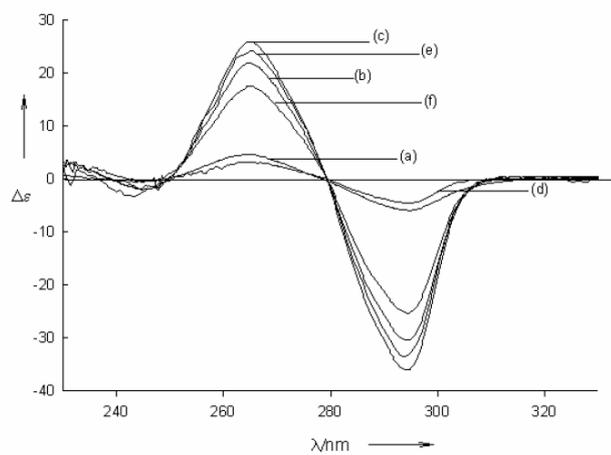


Figura 7.13. Spettri CD di **G11** (0.5 mM in CHCl_3) (a) dopo estrazione di picrato di potassio (rapporto molare $\mathbf{G11}/\mathbf{K}^+$ 2:1) (b); (c) campione b dopo la vaggio con acqua (rapporto molare $\mathbf{G11}/\mathbf{K}^+$ 8:1); (d) campione c dopo addizione di *c* [2.2.2] criptando 15 mM; (e) campione d dopo addizione di KI (1 mol/mol [2.2.2] criptando); (f) campione d dopo addizione di acido trimetan sulfonico.

Per completezza si riportano in figura 7.14 gli spettri NMR prima e dopo l'aggiunta di criptando alla soluzione di $[\mathbf{G11}_8\mathbf{K}]^+$ in cui ancora una volta è chiara l' induzione della disaggregazione prodotta dalla sottrazione del catione.

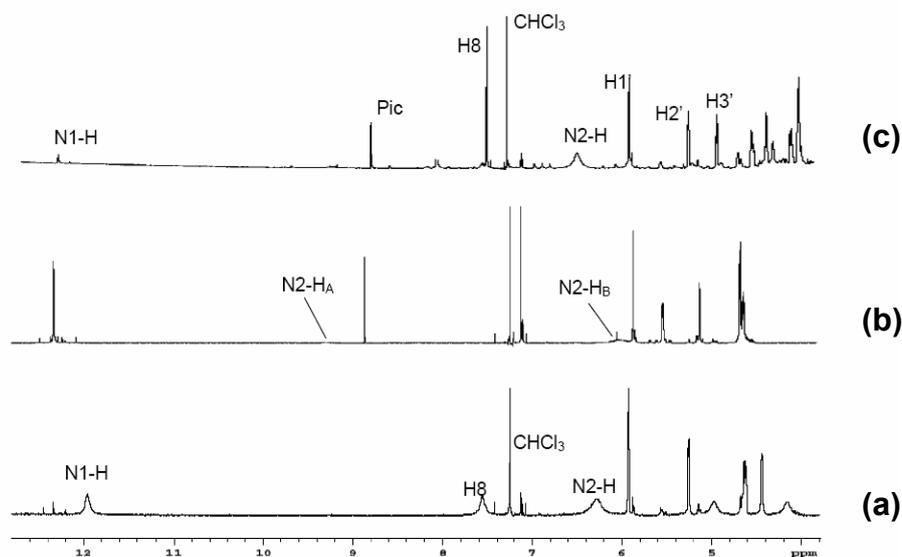


Figura 7.14. Spettri ^1H NMR (600 MHz) di soluzioni di **G11** in CDCl_3 (10 mM) (a) prima e (b) dopo estrazione di potassio pirato e lavaggio e con acqua; (c) campione b per aggiunta di [2.2.2] criptando 300 mM.

Concludendo, la capacità delle guanosine di autoassemblare in presenza di ioni in strutture colonnari stabili in maniera altamente riproducibile, può essere utilizzata per controllare le interazioni di scambio di spin di radicali persistenti nitrossilici. La formazione reversibile del complesso ottamerico $[\text{G10}_8\text{K}]^+$ induce la comparsa dell'interazione spin-spin tra unità paramagnetiche che vengono trovati sufficientemente vicine nello spazio, interazione che può essere soppressa per rimozione del catione. Questo rappresenta il primo esempio di induzione-soppressione di un'interazione spin-spin di scambio in un sistema autoassemblante sotto il controllo del catione e dimostra che le guanosine paramagnetiche possono essere usate per ottenere dispositivi magnetici molecolari.

Bibliografia.

1. J. S. Miller, Magnetism: Molecules to Materials, M. Drillon Eds, Wiley-VCH: Weinheim, **2001-2003**, Vols. I-IV.
2. A. Rajca, *Chem. Rev.*, **1994**, *94*, 871.
3. W. Fujita, K. Awaga, *Science* **1999**, *286*, 261; M. E. Itkis, X. Chi, A. W. Cordes, R. C. Haddon, *Science* **2002**, *296*, 1443.
4. M. E. Itkis, X. Chi, A. W. Cordes, R. C. Haddon, *Science*, **2002**, *296*, 1443.
5. E. Mezzina, M. Fani, F. Ferroni, P. Franchi, M. Menna, M. Lucarini, *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 3773.
6. M. S. Kaucher, Y. F. Lam, S. Pieraccini, G. Gottarelli, J. T. Davis, *Chem. Eur. J.*, **2005**, *11*, 164.
7. V. Setnička, M. Urbanová, K. Volka, S. Nampally, J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 8735; G. Gottarelli, S. Lena, S. Masiero, S. Pieraccini, G. P. Spada, *Chirality*, **2008**, *20*, 471.
8. A. L. Marlow, E. Mezzina, G. P. Spada, S. Masiero, J. T. Davis, G. Gottarelli, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 5116; E. Mezzina, P. Mariani, R. Itri, S. Masiero, S. Pieraccini, G. P. Spada, F. Spinozzi, J. T. Davis, G. Gottarelli, *Chem. Eur. J.*, **2001**, *7*, 388.
9. V. Gubala, D. De Jesús, J. M. Rivera, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 1413.
10. X. Liu, I. C. M. Kwan, S. Wang, G. Wu, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 3685.
11. S. L. Forman, J. C. Fettinger, S. Pieraccini, G. Gottarelli, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 4060.
12. S. Pieraccini, S.; Masiero, Pandoli, O.; Samorì, P.; Spada, G. P., *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 3125.

Capitolo 8. Parte sperimentale.

Note generali. Gli spettri CD sono stati registrati con uno spettropolarimetro JASCO J-710 utilizzando celle di appropriata grandezza. Gli spettri NMR sono stati registrati con strumentazioni Varian Inova (300MHz) o Varian Mercuri (600 MHz e 400MHz) Gli esperimenti di diffrazione dei raggi-X sono stati eseguiti utilizzando un generatore di raggi-X Philips PW1830 equipaggiato con una camera a focalizzazione in vuoto di tipo Guinier. Gli esperimenti STM sono stati eseguiti all'interfaccia solido-liquido a temperatura e pressione ambiente. Le immagini STM delle molecole sono state registrate in corrente con intervalli di scansione di circa 20-50 line s^{-1} . Le misure sono state effettuate utilizzando un picoAmp-Nanoscope IIIa. Gli spettri EPR sono stati registrati su Bruker ELEXSYS-500, gli spettri di massa con l' elettrospray (ES) ionization su uno strumento Micromass ZMD 4000.

8-Br-Adenosina (10). L'adenosina (5g, 18.7 mmol) è stata solubilizzata in 25 mL di soluzione tampone acetato di sodio/acido acetico 1M (pH = 4) a 50°C. La soluzione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente e poi addizionata di bromo (5g in 150 mL di H₂O). Dopo 5 ore il bromo in eccesso è stato neutralizzato con una soluzione di NaSO₃ 5N. Il pH è stato neutralizzato con una soluzione di NaOH 5N. Il precipitato è stato quindi filtrato (3.36 g, resa 52%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 3.64-3.95 (m, 3H, 4'H-5'H-5''H), 4.16-4.62 (m, 2H, 2'H-3'H), 5.20-5.72 (m, 3H, 2'-3'-5'-OH), 6.26 (d, 1H, 1'H), 7.41 (s, 2H, NH₂), 8.07 (s, 1H, 2-H) ppm.

8-Br-Inosina (11). Ad una sospensione di 8-Br-adenosina (1.00 g, 2.89 mmol) in 50 mL di acido acetico è stato aggiunto nitrito di sodio (1.00 g, 14.5 mmol) sciolto in 10 mL di H₂O. La reazione è stata lasciata reagire per 5 ore e poi è stato evaporato il solvente. Il grezzo è stato quindi cristallizzato da EtOH/H₂O. (0.56 g, resa 56.3%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 3.42-3.71 (m, 2H, 5'H-5''H), 3.91 (m, 1H, 4'H), 4.18 (m, 1H, 3'H), 5.04 (t, 1H, 2'H), 5.80 (d, 1H, 1'H), 8.07 (s, 1H, Ar-H) ppm.

2', 3', 5'-O-Triacetil-8-ossoinosina (12) (0.50 g, 1.44 mmol) di 8-Br-inosina sono stati aggiunti ad una soluzione di acetato di sodio (0.55 g, 6.70 mmol) in 13 mL di acido acetico/anidride acetica. La miscela è stata portata a refluxo (160 °C) per 24 h. La reazione è stata spenta con 10 mL di EtOH e portata a secco. Il residuo è stato ripreso in cloroformio e lavato con H₂O prima e con soluzione satura di bicarbonato di sodio dopo. La soluzione organica è stata portata a secco. (478 mg, resa 81%).

¹H-NMR (CDCl₃): 2.10 (m, 9H, CO-CH₃), 4.30-4.50 (m, 3H, 4'H-5'H-5''H), 5.75 (t, 1H, 2'H), 6.14 (d, 1H, 1'H), 6.20 (m, 1H, 3'H), 8.02 (s, 1H, Ar-H), 11.41 (s, 1H, NH), 12.58 (s, 1H, NH) ppm.

8-Oossoinosina (13). 2', 3', 5'-O-triacetil-8-ossoinosina (1.50 g, 3.80 mmol) è stata aggiunta ad una soluzione di Na (0.35 g, 15 mmol) in 15 mL di metanolo-*dry*. La reazione procede per 2 h ed il precipitato viene poi filtrato (0.54 g, resa 50%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 3.40-3.70 (m, 2H, 5'H-5''H), 3.84 (m, 1H, 4'H), 4.10 (m, 1H, 3'H), 4.82 (m, 1H, 2'H), 5.64 (dd, 1H, 1'H), 7.89 (s, 1H, Ar-H) ppm.

2', 3', 5'-O-Tridecanoil-8-ossoinosina (8oxo11) 8-Oossoinosina (0.3 g, 1.0 mmol) è stata sospesa in 8 mL di acetonitrile-*dry*. Alla sospensione sono stati aggiunti Et₃N distillata (0.5 mL, 3.6 mmol), anidride decanoica (1.2 mL, 3.3 mmol) e una quantità catalitica di DMAP. La miscela è stata lasciata reagire per una notte. Dopo evaporazione del solvente, il grezzo è stato caricato in colonna di gel di silice. E' stato prima eluito con CH₂Cl₂/Acetone (95:5) per togliere le tracce di acido decanoico, e poi con CH₂Cl₂/MeOH (96:4). Ottenuti 0.56 g (resa 76%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 0.84 (m, 9H, CH₃), 1.23 (m, 36H, CH₂), 1.49 (m, 6H, OC-CH₂CH₂), 2.30 (m, 6H, OC-CH₂), 4.12 – 4.22 (m, 2H, H5'-H5''), 4.33 (m, 1H, H4'), 5.58 (m, 1H, H3'), 5.81 (dd, 1H, H1'), 6.01 (m, 1H, H2'), 8.00 (s, 1ArH, H2), 11.61 (bs, 1H, NH), 12.60 (bs, 1H, NH) ppm.

4-(dodecilossi)benzoilcloruro. Il cloruro dell'acido 4-(dodecilossi)-benzoico è stato sintetizzato secondo le procedure standard.

2', 3', 5'-O-Tri(p-dodecilossibenzoil)-8-ossosina (8oxoI2). 8-Ossosina (0.2 g, 0.7 mmol) è stata sospesa in 6 mL di acetonitrile-*dry*. Alla sospensione sono stati aggiunti Et₃N distillata (0.35 mL, 2.51 mmol), 4-(dodecilossi)benzoil cloruro (0.75 g, 2.31 mmol) e una quantità catalitica di DMAP. La miscela è stata lasciata reagire per una notte e spenta con MeOH. Dopo evaporazione del solvente il grezzo è stato cristallizzato da EtOH/CHCl₃ per dare 0.54 g di prodotto (resa 68%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 0.84 (m, 9H, CH₃), 1.23 (m, 48H, CH₂), 1.38 (m, 6H, O-CH₂CH₂CH₂), 1.69 (m, 6H, O-CH₂CH₂), 4.01 (m, 6H, O-CH₂), 4.46 – 4.70 (m, 3H, H4'-H5'-H5''), 6.06 (m, 1H, H3'), 6.09 (d, 1H, H1'), 6.32 (dd, 1H, H2'), 6.88 – 7.02 (m, 6ArH), 7.74 – 7.95 (m, 7ArH), 11.61 (s, 1H, NH), 12.70 (s, 1H, NH) ppm.

2',3'-O-isopropilidene-8-Br-guanosina (15). 8-Br-guanosina (363mg, 1mmol)¹ è stata solubilizzata a caldo (50°C) in 5ml di DMF. Sono stati aggiunti dimetossipropano (0.36 ml, 3 mmol) e H₂SO₄ (0.1ml, 1.6 mmol). Dopo 48 h si è basificata la soluzione con 2.2ml di EtN₃ evaporata sotto vuoto fino ad ottenere un olio dal quale per triturazione con EtOH precipita **15** come una polvere bianca (320 mg resa 80%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 1.35 (s, 3H, CH₃), 1.49 (s, 3H, CH₃), 4.15 - 4.25 (m, 3H, H4'-H5'-H5''), 4.92 (m, 1H, H3'), 5.24 (m, 1H, H2'), 5.90 (d, 1H, H1'), 6.58 (s, 2H, NH₂), 10.93 (s, 1H, NH).ppm.

2',3'-O-isopropilidene-8-ossoguanosina (8oxoG3). 2',3'-O-isopropilidene-8-Br-guanosina (100.mg 2.48mm) è stata dissolta in 30ml di soluzione di acetato di sodio (2mg, 24mmol) in acido acetico glaciale. Portata a riflusso per 5h. Dopo evaporazione dell'acido il residuo solido è stato lavato più volte con ETOH. L'acido acetico residuo è stato neutralizzato con ammoniaca concentrata, in agitazione per 1h e quindi filtrato. Il precipitato raccolto è stato caricato su colonna di gel di silice ed eluito con una miscela CH₂Cl₂: MeOH 92:8. (resa 42%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 1.25 (s, 3H, CH₃), 1.37 (s, 3H, CH₃), 4.15-4.25 (m, 3H, H4'-H5'-H5''), 4.94 (m, 1H, H3'), 5.26 (m, 1H, H2'), 5.75 (d, 1H, H1'), 6.57 (s, 2H, NH₂), 10.44 (s, 1H, NH), 12.50 (bs, 1H, NH) ppm.

5'-O-(2,2,6,6-Tetrametil-1-oxilpiperidina-4-carbonil)-2',3'-O-isopropilidene guanosina (G10). Ad una soluzione di 4-Carbossi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-ossile (100 mg, 0.5 mmol) in THF-*dry* è stato aggiunto metansulfonilcloruro (0.04 mL, 0.5 mmol) e Et₃N (0.14mL, 1.0 mmol) a 0°C. La sospensione lasciata in agitazione per 2h e quindi portata a temperatura ambiente. Dopo 20minuti è stata aggiunta 2',3'-O- isopropilidene guanosina (160 mg, 0.5 mmol) (anidrificata su P₂O₅ in vacuum per 2h a 50°C) e una quantità catalitica di DMAP. La miscela ottenuta è stata lasciata reagire sotto argon per una notte. Dopo evaporazione del solvente il grezzo è stato caricato su una colonna di gel di silice ed eluito con una miscela (CH₂Cl₂:MeOH 94:6). Le frazioni raccolte sono state cristallizzate da acetonitrile-metanolo. (resa 48%).²

5'-O-(1-Adamantancarbonil)-2',3'-O-isopropilidene guanosina (G11).

2',3'-O-isopropilidene-guanosina (500mg, 1.55mmol) (anidrificata su P₂O₅ in vacuum per 2h a 50°C) è stata sospesa in acetonitrile-*dry* (13mL). Sono state aggiunte Et₃N distillata (0.26 mL, 1.86 mmol), 1-adamantancarbonil cloruro (370 mg, 1.86 mmol) (1.2 mL, 3.3 mmol) e una quantità catalitica di DMAP. La sospensione è stata lasciata in agitazione a r.t. per una notte. Dopo evaporazione del solvente il grezzo è stato caricato su una colonna di gel di silice ed eluito con una miscela (CH₂Cl₂:MeOH 92:8). Le frazioni raccolte sono state cristallizzate da etanolo e lavate più volte con esano. (resa 48%).²

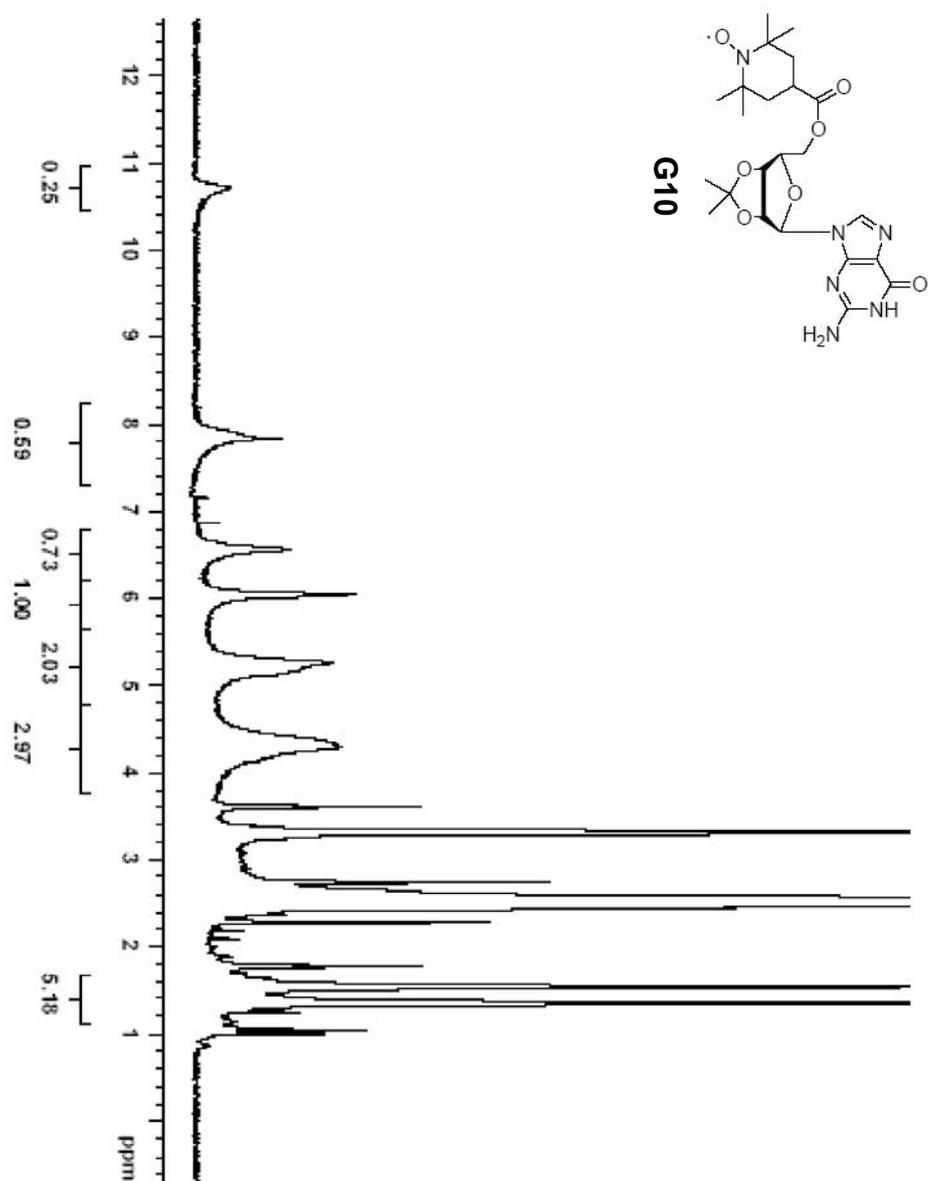


Figura 8.1. ¹H-NMR (300MHz DMSO-d₆) of G10.

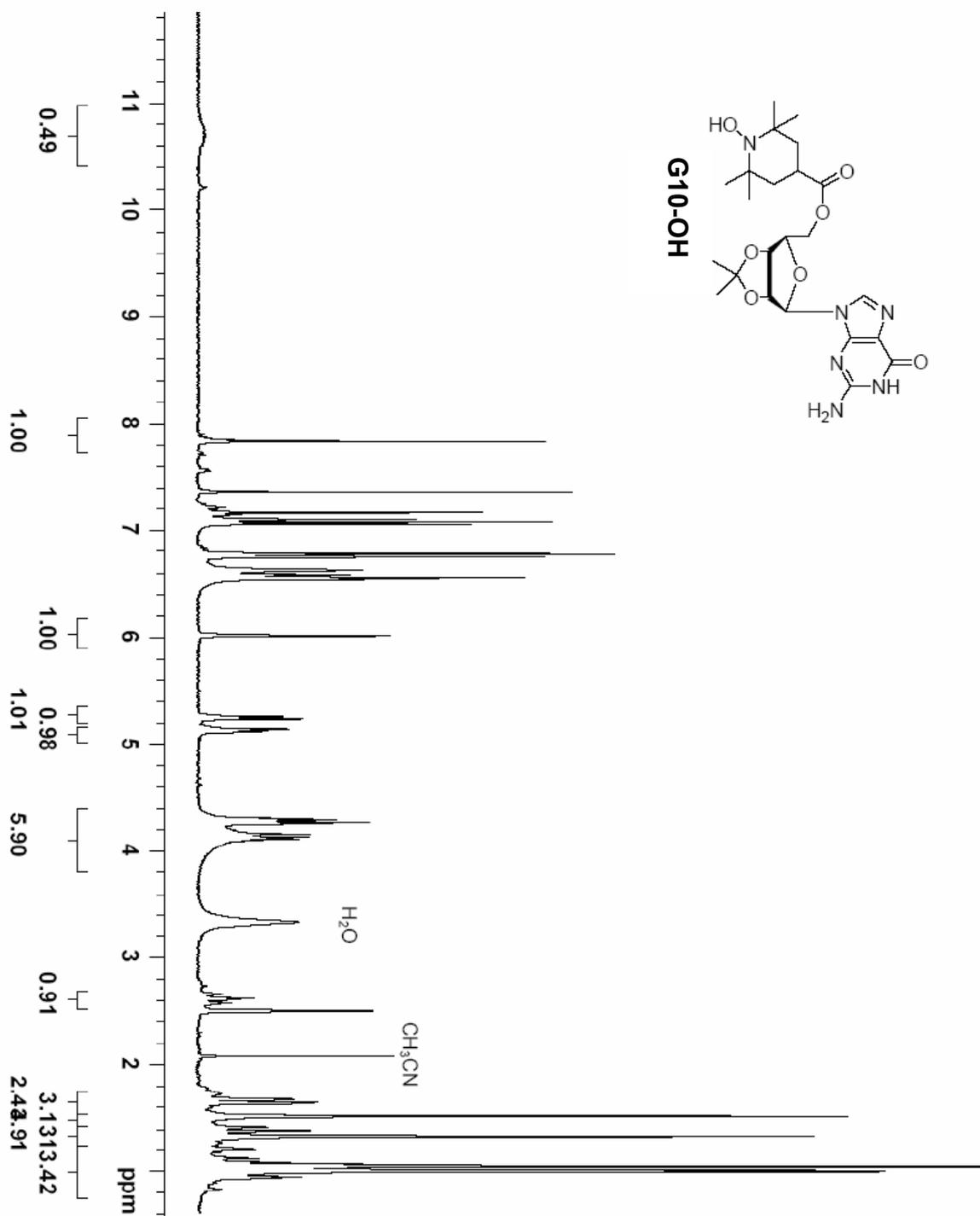


Figura 8.2. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz DMSO- d_6) di **G10-OH** (ottenuto per addizione di 1.3 equivalenti di fenilidrazina nel tubo NMR contenete la soluzione di **G10**).

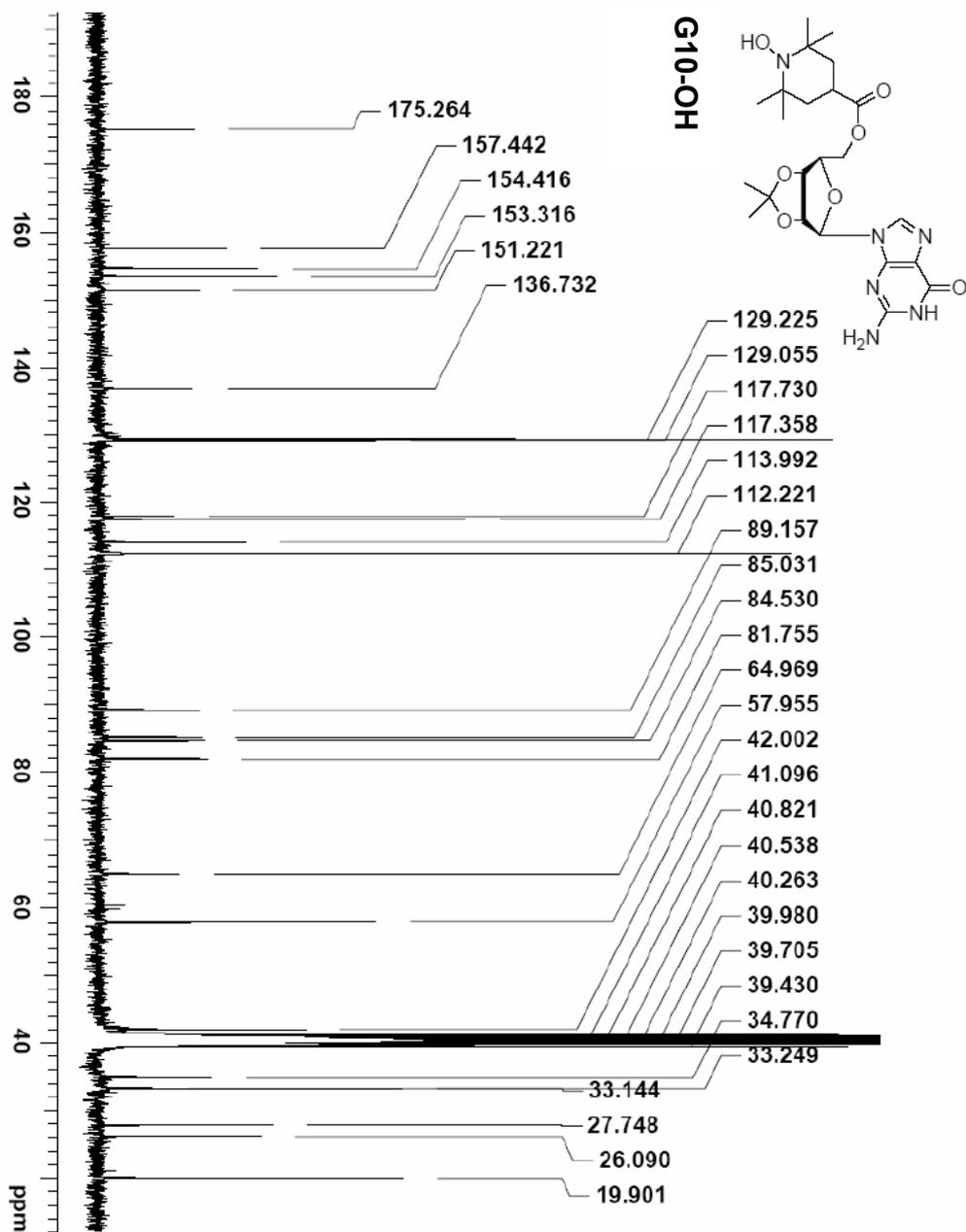


Figura 8.3. ^{13}C -NMR (75MHz DMSO-d₆) di **G10-OH** (ottenuto per addizione di 1.3 equivalenti di fenilidrazina nel tubo NMR contenete la soluzione di **G10**)

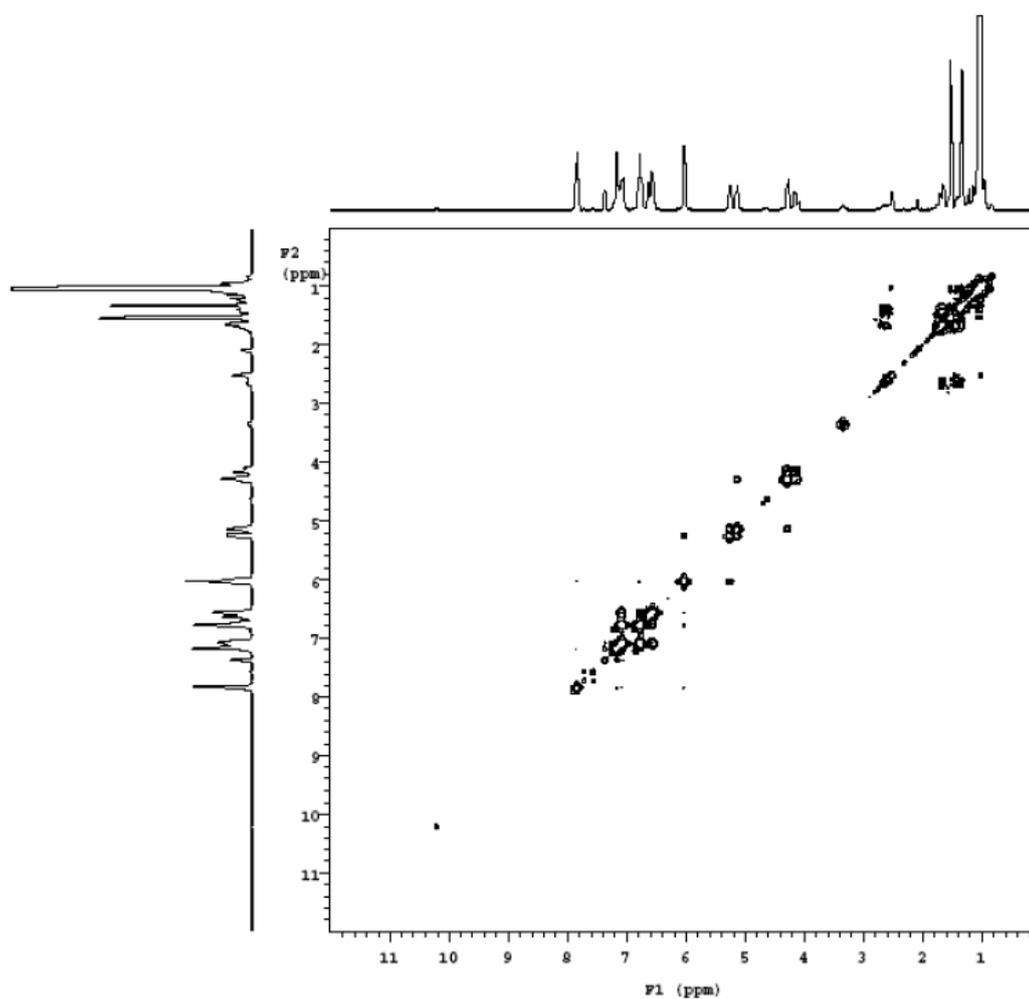


Figura 8.4. gCOSY (300MHz DMSO-d₆) di **G10-OH** (ottenuto per addizione di 1.3 equivalenti di fenilidrazina nel tubo NMR contenete la soluzione di **G10**)

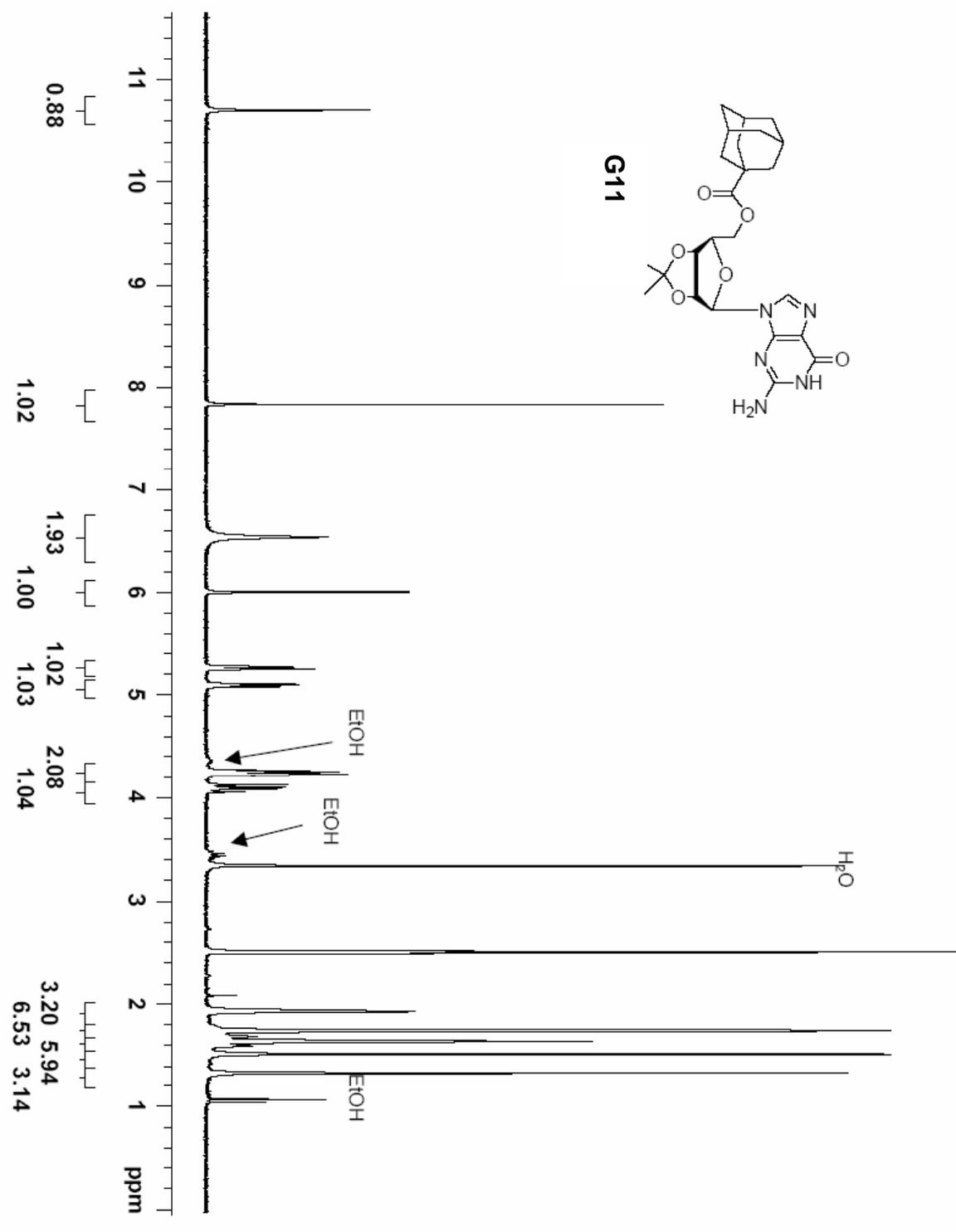


Figura 8.5. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz DMSO- d_6) di G11.

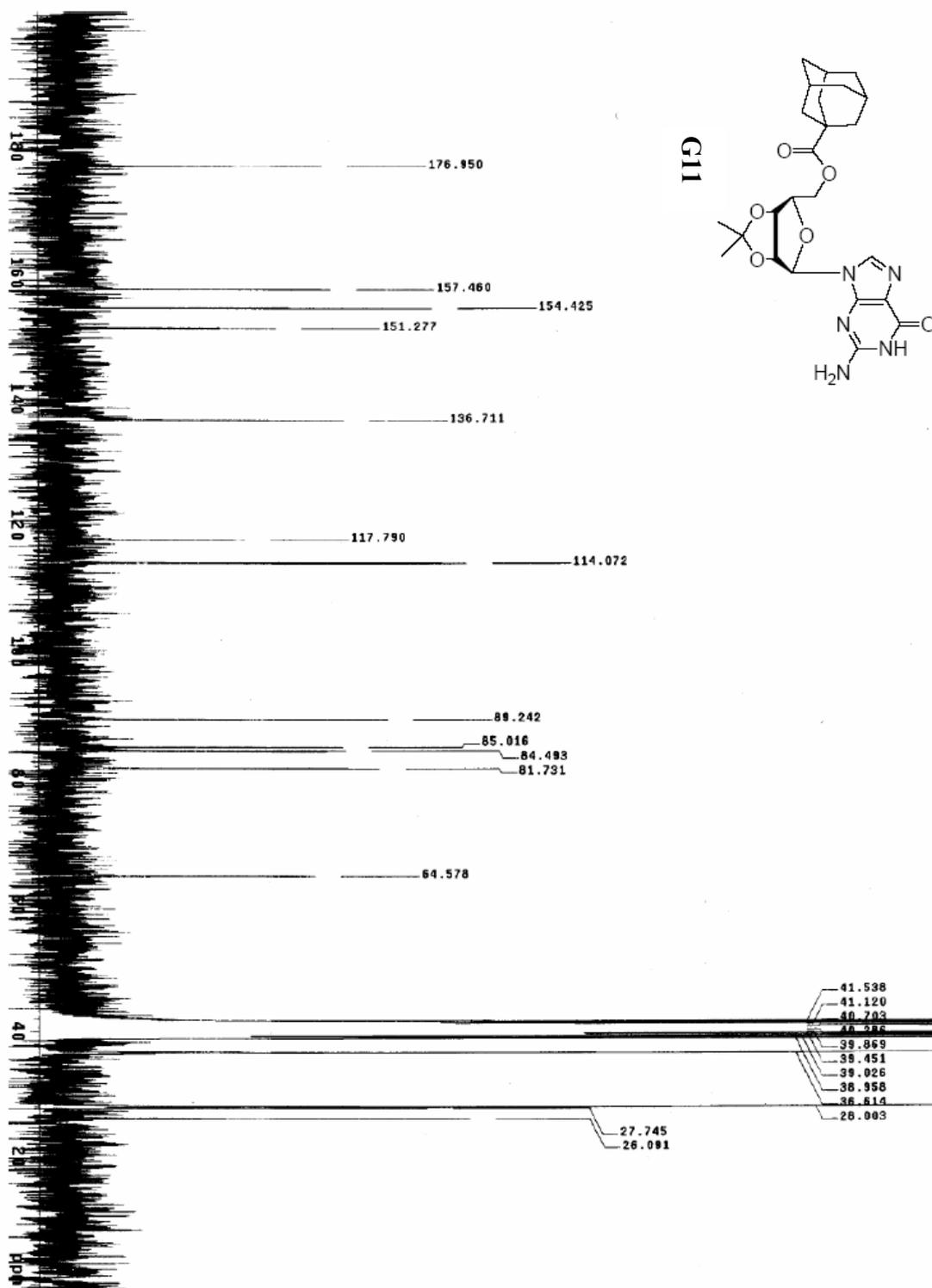


Figura 8.6. $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz DMSO- d_6) di G11.

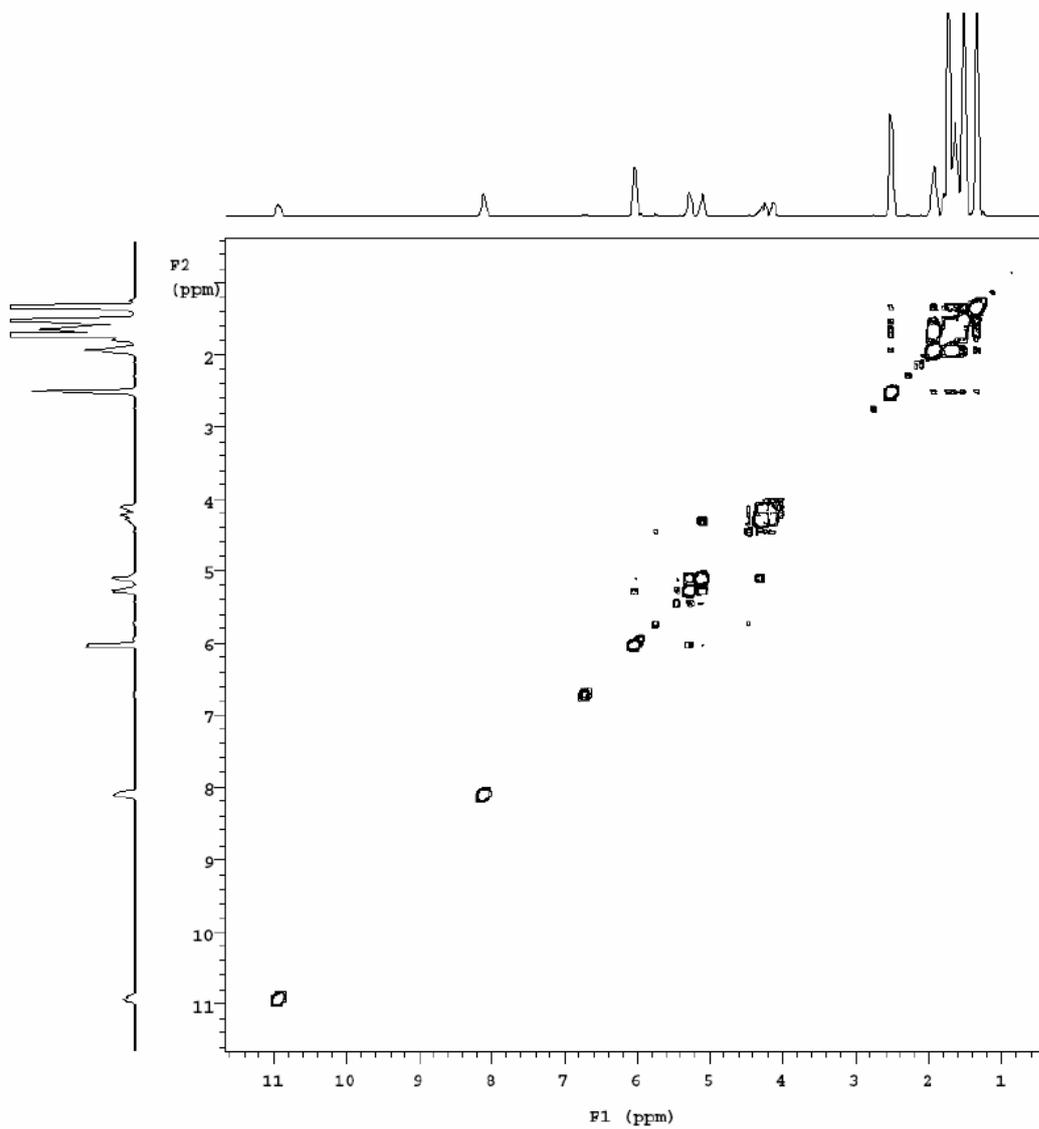


Figura 8.7. gCOSY (300MHz DMSO-d₆) di G11.

Preparazione dei campioni assemblati di G11 e G10 per lo switch con [2.2.2] criptando.

- i) Una soluzione di **G10** o **G11** in CHCl_3 o CDCl_3 (5 mL, 10 mM) è stata lasciata in agitazione per tre giorni in presenza di cristalli di picrato di potassio. La fase organica è stata separata previa centrifugazione.
- ii) La fase organica è stata lavata con acqua (aliquote da 5 mL), fino a che la fase acquosa cessa di assumere la colorazione gialla..
- iii) La quantità necessaria di [2.2.2] criptando solido è stata aggiunta ad 1ml di soluzione organica e lasciata in agitazione per una notte.
- iv) La quantità necessaria di KPic, o KI, solido, è stata aggiunta ad 1ml di soluzione organica e lasciata in agitazione per una notte.
- v) 1 mL di soluzione organica è stato aggiunta all'acido trifluorometansulfonico (portato a secco da una soluzione cloroformica 0.02 M) ed è stata agitata per 1h.

Determinazione del rapporto G10/K₊ in soluzione.

La determinazione diretta della stechiometria dei complessi di **G10** in cloroformio dopo estrazione di picrato di potassio è resa molto difficile dal fatto che i segnali NMR di **G10** sono picchi molto allargati e parzialmente sovrapposti.

In ogni caso una stima può essere fatta sulla base degli spettri NMR misuratisi soluzioni in DMSO-d₆ diluite e può essere confermata da misure spettrofotometriche.

Metodo NMR: 180 μL di soluzione cloroformica (10 mM) di **G10** sono stati trasferiti con una siringa Hamilton da 250 μL in un tubo NMR e il solvente è stato svaporato facendo gorgogliare dell' argon all'interno. Il materiale solido ottenuto è stato solubilizzato in DMSO-d₆. Anche in queste condizioni la presenza del radicale libero causa un forte allargamento delle righe ma si sono potuti stimare i valori approssimativi di stechiometria (2:1 e 8:1) dallo spettro H-NMR. (figura 8.8).

Metodo spettrofotometrico: 50 μL di soluzione cloroformica di **G10** (10 mM) sono stati trasferiti con una microsiringa in un matraccio da 1mL e portati a volume con acetonitrile. È stato registrato lo spettro CD/UV per verificare la completa disaggregazione della specie ottamerica. La concentrazione del picrato è stata determinata dall'assorbanza a 380 nm assumendo $\epsilon = 16900 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.³

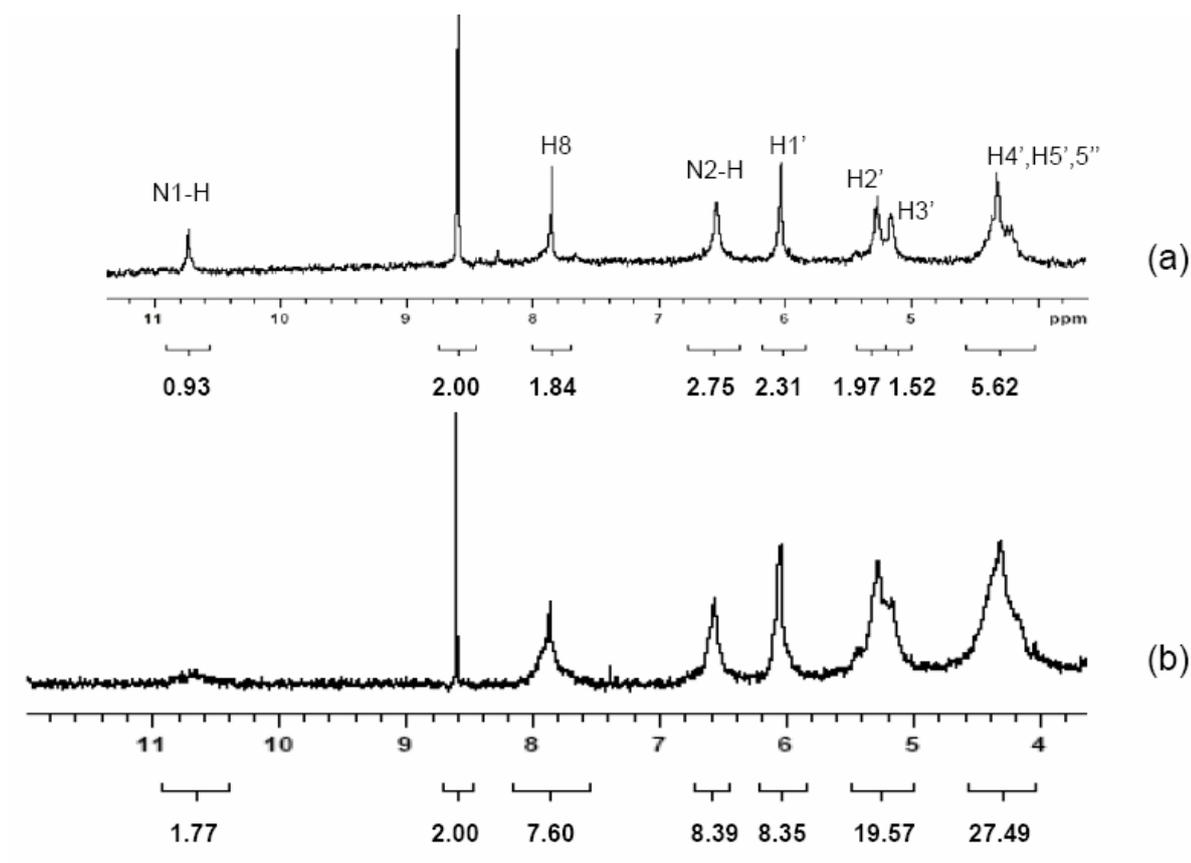


Figura.8.8. ^1H NMR spectra (300 MHz) of $[\text{G10}_n\text{K}]\text{Pic}$ in DMSO-d_6 ($[\text{G10}] = 2.6 \text{ mM}$) prima (a) e dopo (b) lavaggio con acqua

Bibliografia.

1. M. Ikehara, K Muneyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **1966**, *14*, 46; R. Holmes, R. K. Robins, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1772.
2. data la complessità del comportamento NMR di **G10**, al fine di agevolare la caratterizzazione del derivato, i dati NMR di **G10** e del suo analogo non paramagnetico **G11** sono riportati in forma grafica alla fine di questo capitolo. La caratterizzazione NMR del derivato **G10** ha richiesto la riduzione in situ con fenilidrazina. Per maggiori dettagli riguardo all'uso della fenilidrazina come riducente delle unità nitrossido: E. Mezzina, M. Fani, F. Ferroni, P. Franchi, M. Menna, M. Lucarini, *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 3773.
3. Moore et al, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 6398.