

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale "Toso Montanari"

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

**Sintesi di PNA a libertà conformazionale
ridotta**

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Nicolò Rossi

RELATORE

Dott.ssa Alessandra Stefan

CORRELATORI

Dott. Giammario Nieddu

Dott. Roberto Tonelli

Sessione I

Anno Accademico 2013-2014

Abstract

The present work started a research project aimed at the synthesis of conformationally “locked” PNA (Peptide Nucleic Acids) monomers. Compared to classic aeg-PNA, this structural modification would result in an improvement in the pairing properties with natural nucleic acids, due to entropic variations in the process. Specifically, an attempt was made to build a PNA monomer around a β -lactam ring. That ring could be imagined as obtained by linking the methylene groups in α position of both the nucleobase and the carboxyl function. These structural properties would imply pre-organization of the final oligomer, improving the pairing process in biological systems. The first step of this work was the investigation of the Staudinger reaction for the cyclization of the lactam ring, and in particular the activation method of the carboxylic group of the nucleobase derivatives. Use of triazine chloride led to the synthesis of the adenine-based β -lactam-PNA. Attempts to synthesize the same monomer based on cytosine, guanine and thymine were unsuccessful, so alternative methods for carboxylic group activation were investigated. Conversion of carboxylic acids to acyl chlorides led to a partial result: despite the method worked well with analogues of the final reactants, it didn't worked with substrates needed for lactam based PNAs. Search for a valid activation process continued involving carbonyl diimidazole, Mukayama reagent, and LDA (with methylester derivative of nucleobase) without good results. Last, it was investigated a different synthetic approach by first synthesizing a proper backbone with a chlorine in the β -lactam ring. This chlorine ring should undergo substitution by a nucleobase anion to give the desired PNA monomer. Unluckily also this synthetic route didn't lead to the desired monomers.

Abstract

Il presente lavoro di tesi avvia un progetto di ricerca finalizzato alla sintesi di monomeri di acidi peptido nucleici (PNA, Peptide Nucleic Acid) dotati di libertà conformazionale ridotta. Tale modifica strutturale comporterebbe un miglioramento delle proprietà di appaiamento degli oligomeri rispetto agli acidi nucleici naturali, a causa di variazioni entropiche nel processo. Nello specifico, si è tentato di introdurre sulla struttura base dei PNA tradizionali (aeg-PNA) un anello β -lattamico. La formazione dell'anello andrebbe a collegare il braccio della molecola contenente la base azotata con la funzione carbossilica. Durante la formazione dell'oligomero questa proprietà comporterebbe un grado di pre-organizzazione vantaggioso nel processo di appaiamento nei sistemi biologici. Si è deciso di iniziare il presente lavoro di tesi indagando la possibilità di effettuare una reazione di Staudinger, ed in particolare ricercando un metodo per l'attivazione della funzione carbossilica dei derivati delle basi azotate, attraverso l'uso di cloruro di triazina. Lo studio della reazione ha condotto alla sintesi del PNA- β -Lattamico funzionalizzato con adenina. I tentativi di sintetizzare le restanti basi azotate sono risultati fallimentari, per questo si è passato a metodi alternativi di attivazione della funzione carbossilica. In primis sono state esplorate reazioni in cui la funzione carbossilica veniva attivata come cloruro acilico. Anche in questo caso si è giunti ad un risultato parziale: sono stati sintetizzati equivalenti delle molecole richieste ma non le molecole stesse. Si è, dunque, proseguito con la ricerca di un ulteriore meccanismo di attivazione utilizzando carbonil diimidazolo per formare un'ammide della funzione carbossilica dei derivati delle basi azotate. Infine, si è tentato di modificare significativamente l'approccio al problema andando a formare preventivamente l'anello β -lattamico come cloruro, in grado, dunque, di alchilare le basi azotate in ambiente basico. Sfortunatamente anche questo approccio non ha condotto al risultato sperato.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUZIONE..... | 1 |
| 1.1. Acidi nucleici..... | 1 |
| 1.1.1. DNA..... | 2 |
| 1.1.2. Nucleotidi..... | 2 |
| 1.2. L'informazione genetica | 3 |
| 1.2.1. Replicazione..... | 4 |
| 1.2.2. Trascrizione..... | 5 |
| 1.2.3. Traduzione | 5 |
| 1.2.4. Terapia antigene/antisense..... | 6 |
| 1.3. Omologhi acidi nucleici..... | 8 |
| 1.3.1. LNA | 8 |
| 1.3.2. GNA..... | 9 |
| 1.3.3. HNA | 10 |
| 1.3.4. TNA | 11 |
| 1.4. PNA..... | 11 |
| 1.4.1. Struttura..... | 12 |
| 1.4.2. Proprietà..... | 14 |
| 1.4.2.1. PNA/DNA(RNA) duplex | 15 |
| 1.4.2.2. (PNA) ₂ DNA triplex..... | 16 |
| 1.4.2.3. PNA/(DNA) ₂ Triplex | 17 |
| 1.4.2.4. PNA ₂ -DNA ₂ Quadruplex..... | 17 |
| 1.4.3. Applicazioni..... | 18 |
| 1.4.3.1. Farmaci antisense e antigene..... | 18 |
| 1.4.3.2. PCR clamping | 18 |
| 1.4.3.3. Enzimi di restrizione artificiali..... | 19 |
| 1.4.3.4. Microarray e biosensori..... | 19 |
| 1.4.3.5. Purificazione acidi nucleici | 19 |
| 1.5. Monomeri alternativi..... | 19 |
| 1.5.1. Amminopropil PNA (ap-PNA)..... | 21 |
| 1.5.2. Amminoetilpropil PNA (aep-PNA) | 22 |
| 1.5.3. Amminoetilpirrolidone PNA (aepone-PNA)..... | 23 |
| 1.5.4. Pirrolidin-PNA | 23 |
| 1.5.5. Pipecolil e Piperidinil-PNA | 24 |
| 1.5.6. Carbociclic PNA (ch-PNA e cp-PNA) | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 2. SCOPO DELLA TESI..... | 29 |
| 3. RISULTATI E DISCUSSIONE..... | 31 |
| 4. CONCLUSIONI..... | 49 |
| 5. PARTE SPERIMENTALE | 51 |
| 5.1. Materiali e metodi | 51 |
| 5.2. Metodiche..... | 52 |
| 5.2.1. 1 Sintesi del nucleo β -lattamico con TCT e base di Shiff commerciale..... | 52 |
| 5.2.2. Sintesi delnucleo β -lattamico con TCT e base di Shiff sintetizzata in situ | 53 |
| 5.2.3. Prove di protezione etilendiammina con Cbz-Cl in DCM..... | 54 |
| 5.2.4. Protezione etilendiammina con Cbz-Cl in H ₂ O | 55 |
| 5.2.5. Protezione della etilendiammina conCbz-Cl a pH controllato | 56 |
| 5.2.6. Protezione della etilendiammina con Cbz-Cl in MeOH | 57 |
| 5.2.7. Protezione della etilendiammina con Cbz-Cl in DCM - elaborazione rivista. | 58 |
| 5.2.8. Ciclizzazione monomeri lattamici | 59 |
| 5.2.9. Sintesi dell'immina | 60 |
| 5.2.10. Prove di ciclizzazione del nucleo β -lattamico da acidi carbossilici..... | 61 |
| 5.2.11. Prova di sintesi alternativa con 1/3 TCT..... | 62 |
| 5.2.12. Ciclizzazione con cloruro generato in situ tramite TCT-DMF..... | 63 |
| 5.2.13. Ciclizzazione del nucleo β -lattamico da cloruro acilici..... | 64 |
| 5.2.14. Clorurazione tramite TCT-DMF..... | 65 |
| 5.2.15. Prove di clorurazione con SOCl ₂ in ambiente tamponato (Py)..... | 66 |
| 5.2.16. Prova di clorurazione con reagente di Ghosez..... | 67 |
| 5.2.17. Prova attivazione acido mediante carbonil imidazolo | 68 |
| 5.2.18. Prove di ciclizzazione con il reattivo di Mukaiyama..... | 69 |
| 5.2.19. Ciclizzazione del derivato citosinico e base forte..... | 70 |
| 5.2.20. Sintesi cloro lattame..... | 71 |
| 5.2.21. Alchilazione citosina con anello lattamico | 72 |
| 5.2.22. Alchilazione citosina con anello lattamico in DMF ad alta temperatura..... | 73 |
| 5.2.23. Alchilazione citosina con anello lattamico con Ag ₂ O | 74 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 75 |

1. Introduzione

L'impiego di tecniche biotecnologiche in grado di agire sul DNA a doppio filamento in maniera sequenza-specifica, ha comportato lo sviluppo di molecole altamente specializzate per l'interazione con il DNA e l'RNA.¹ Gli oligonucleotidi sintetici si sono rivelati particolarmente adatti a questo scopo, andando a rivestire progressivamente un ruolo sempre più decisivo nei processi di attivazione genetica e nelle strategie di repressione genica. Il potenziale di queste molecole è stato, tuttavia, ridimensionato dalla bassa stabilità *in vivo* e dalla bassa specificità nel riconoscere sequenze complementari. Per questa ragione sono state indagate diverse strategie alternative. Primi in ordine temporale, sono stati sviluppati i POCs (Peptide Oligonucleotide Conjugates), ovvero oligonucleotidi coniugati con peptidi. Tale conformazione facilita l'ingresso della sequenza all'interno della cellula e conferisce una maggior stabilità nei confronti delle DNAasi.² Al fine di migliorare caratteristiche quali la capacità di attraversare le membrane cellulari, e la stabilità, diminuendone la tossicità, si è passati allo sviluppo di molecole in grado di mimare il comportamento del DNA mantenendo una elevata specificità per le sequenze bersaglio.³ Per tali ragioni sono stati sviluppati in principio gli oligonucleotidi-fosforotionati (PS-DNA)⁴ e successivamente gli oligonucleotidi-metilfosfonati,⁵ sostituiti successivamente da molecole analoghe di seconda generazione, ovvero gli oligomeri morfolino-fosforoammidati (PMO),⁶ i Locked Nucleic Acids (LNA),⁷ XNA(GNA, HNA, TNA) ed infine gli acidi peptido nucleici (PNA).

1.1 Acidi nucleici

Gli acidi nucleici sono indicati come macromolecole informazionali⁸ poiché la successione dei monomeri di cui sono costituiti fornisce l'informazione genetica. Gli acidi nucleici, cioè l'acido deossiribonucleico (DNA) e l'acido ribonucleico (RNA), sono macromolecole costituite da subunità dette nucleotidi. DNA ed RNA sono dunque polinucleotidi. Un nucleotide è composto da tre parti: uno zucchero a cinque atomi di carbonio (ribosio nell'RNA e deossiribosio nel DNA), una base azotata ed infine uno o più gruppi fosfato.

1.1.1 DNA

All'interno delle cellule il DNA è presente sotto forma di doppio filamento avvolto a formare una doppia elica. Ogni cromosoma contiene due filamenti di DNA, ognuno formato da centinaia di migliaia sino a svariati milioni di nucleotidi, legati tra loro mediante ponti fosfodiesteri. I due filamenti risultano appaiati tramite ponti idrogeno, che si instaurano tra le basi azotate complementari. Le interazioni più stabili si hanno quando le purine si trovano affiancate alle pirimidine. In particolare, si osserva che le coppie più stabili sono quelle tra guanina (G) e citosina (C), e tra adenina (A) e timina (T) [Figura 1.1].

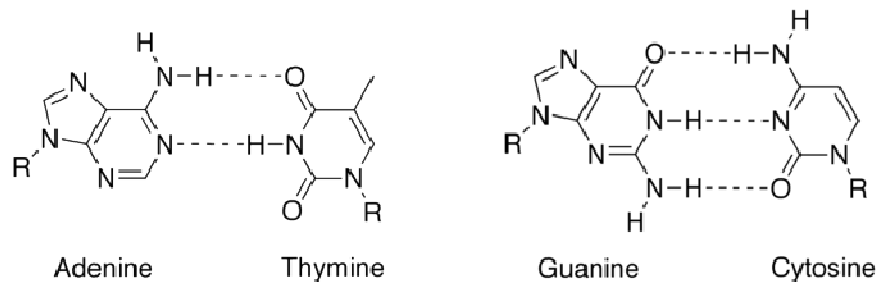


Figura 1. 1 : Schema di appaiamento delle basi azotate

Questo specifico appaiamento garantisce la complementarità tra i filamenti. Per ogni A in un filamento si avrà una T nell'altro, per ogni C si avrà una G, e viceversa. Nella doppia elica le basi azotate sono localizzate nella zona interna mentre il pentoso ed il gruppo fosfato nella parte esterna.

1.1.2 Nucleotidi

Le basi azotate possono essere suddivise in due gruppi chimici. Da una parte le purine, cioè adenina e guanina, e dall'altra le pirimidine, cioè timina, citosina ed uracile. Citosina, adenina e guanina si trovano sia nel DNA che nell'RNA mentre timina ed uracile si trovano rispettivamente ed esclusivamente nel DNA e nell'RNA. Nel nucleotide, la base azotata è legata allo zucchero pentoso mediante un legame glicosidico tra il carbonio in posizione 1 del pentoso e l'azoto in posizione 1 di una base pirimidinica o in quello 9 di una base purinica. [Figura 1.2]

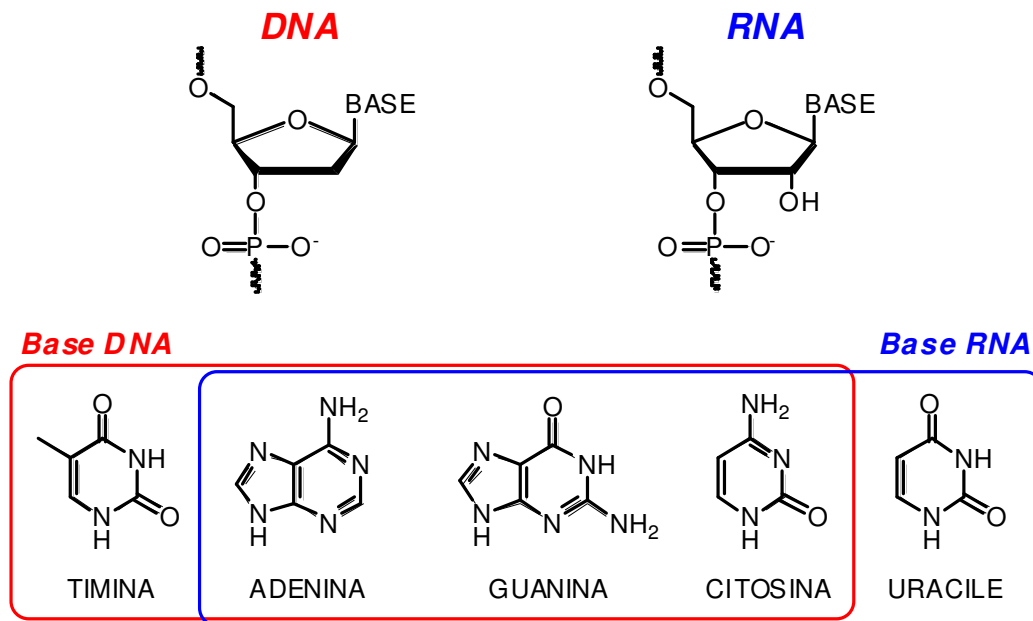


Figura 1. 2 Struttura chimica dei nucleotidi

Il complesso privo del gruppo fosfato viene definito nucleoside. I nucleotidi sono dunque nucleosidi contenenti uno o più gruppi fosfato. Lo zucchero pentoso impiegato nell'RNA è il ribosio mentre nel DNA il deossiribosio. Il ribosio differisce dal deossiribosio esclusivamente per la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 2'.

1.2 L'informazione genetica⁸

Alla base della sintesi proteica vi è l'espressione genica, e l'informazione necessaria al fine di sintetizzare le proteine, è codificata all'interno del DNA. Tale meccanismo può essere riassunto nel cosiddetto "dogma centrale della biologia": *l'informazione fluisce sempre dal DNA all'RNA attraverso la trascrizione e, successivamente, alla proteina mediante traduzione, attuata attraverso il codice genetico. A questi passaggi va aggiunta la replicazione, che permette di duplicare il DNA in copie identiche.*



Figura 1. 3 Schema di flusso dell'informazione genetica

1.2.1 Replicazione

Il flusso dell'informazione genetica ha come punto di partenza la replicazione. Questo processo permette di ottenere, a partire da una doppia elica di DNA, due doppie eliche identiche. Il DNA, infatti, è presente all'interno di ogni cellula proprio come doppia elica, con basi appaiate che possono essere separate, per fungere ognuna da stampo per un nuovo filamento complementare. Per questa ragione la replicazione viene definita semiconservativa, in quanto ogni nuova doppia elica è costituita da un filamento neosintetizzato e da un filamento parentale. Il precursore di ognuno dei nucleotidi della catena è un nucleotide 5'-trifosfato che forma un legame covalente con il deossiribosio del nucleotide precedente, perdendo due gruppi fosfato. L'accrescimento della catena necessita di un gruppo ossidrilico presente sul deossiribosio precedente (in posizione 3'). Per questa ragione, la replicazione procede sempre in direzione 5'-3'. [Figura 1.4]

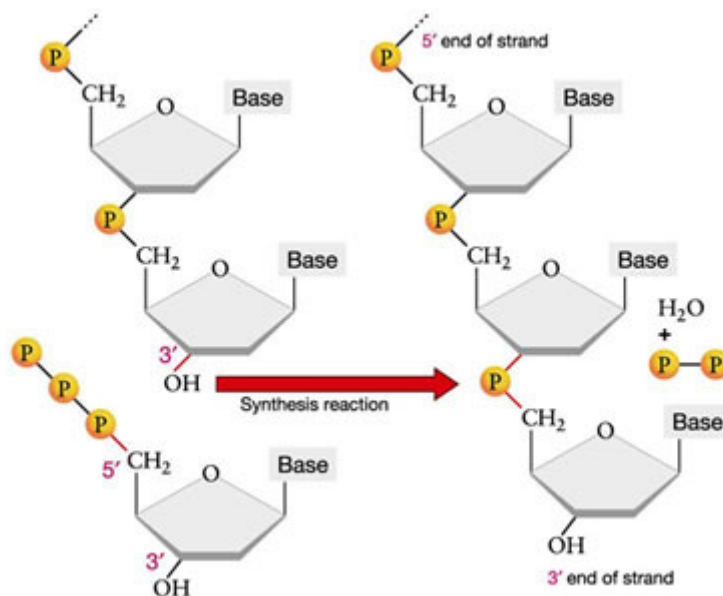


Figura 1. 4 Schema della reazione di addizione dei nucleotidi

La reazione di addizione è catalizzata da una serie di enzimi denominati complessivamente DNA polimerasi, ognuno dei quali è caratterizzato da funzioni specifiche. Tutte le DNA polimerasi conosciute sono in grado solamente di aggiungere nucleotidi a gruppi ossidrilici preesistenti, e per questo motivo, per iniziare una nuova catena, è necessario un innesco (primer), ovvero una sequenza (solitamente di RNA) a cui la polimerasi possa attaccare il primo nucleotide. Nel caso venga appaiata una base errata, la DNA polimerasi svolge anche il

compito di “correttore di bozze” (attività esonucleasica) : può infatti riconoscere un errore di appaiamento, rimuovere il nucleotide errato e sostituirlo con uno appropriato.

1.2.2 Trascrizione

L'acido ribonucleico (RNA) svolge diversi ruoli fondamentali per l'espressione genetica. In particolare esistono tre tipi distinti di RNA: RNA messaggero (mRNA), RNA di trasferimento (tRNA) ed infine RNA ribosomiale (rRNA). Nel primo caso questa macromolecola funge da supporto per l'informazione contenuta nel DNA, negli altri due casi svolge un ruolo strutturale e catalitico (tRNA per il trasporto di amminoacidi ed rRNA per la formazione dei ribosomi). La trascrizione dell'informazione genetica da DNA a mRNA viene effettuata mediante un enzima denominato RNA polimerasi che, analogamente a quanto accade per il DNA, catalizza la formazione di legami fosfodiesterici, in questo caso tra ribonucleotidi anziché deossiribonucleotidi. La chimica della sintesi dell'RNA è simile a quella della sintesi del DNA: i ribonucleotidi vengono aggiunti all'ossidrilico in posizione 3' del ribosio appartenente alla base successiva. Di conseguenza, anche nel caso dell'RNA, la direzione complessiva di sintesi risulta 5'-3'. Diversamente dalla DNA polimerasi, l'RNA polimerasi può iniziare la sintesi senza un innesco. La RNA polimerasi riconosce il punto di inizio della trascrizione grazie alla presenza di “promotori”, cioè sequenze di DNA alle quali si lega in modo specifico e in cui la doppia elica viene aperta per permettere la sintesi dell'mRNA.

1.2.3 Traduzione

L'ultima tappa del trasferimento dell'informazione biologica si avvale di uno “stampo” di mRNA che porta alla sintesi di una proteina. Questo è possibile grazie all'esistenza del “codice genetico”, che correla l'informazione contenuta nell'RNA (che deriva dal DNA) alla sequenza di amminoacidi costituenti le proteine. Il codice genetico mette in correlazione una tripletta di nucleotidi con uno specifico amminoacido; il codice è degenerato, in quanto per ogni amminoacido si può avere più di una tripletta codificante (codoni sinonimi). Alle triplette codificanti vanno aggiunte quelle che determinano l'interruzione della sintesi (codoni di STOP). La sintesi delle proteine avviene a livello dei ribosomi, i quali catalizzano la formazione di un legame peptidico tra gli amminoacidi e selezionano gli amminoacidi corretti in funzione dell'informazione contenuta nell'mRNA. Ciò è possibile mediante il tRNA che contiene una sequenza di tre basi, detto anticodone, e contemporaneamente trasporta l'amminoacido ad esso correlato.

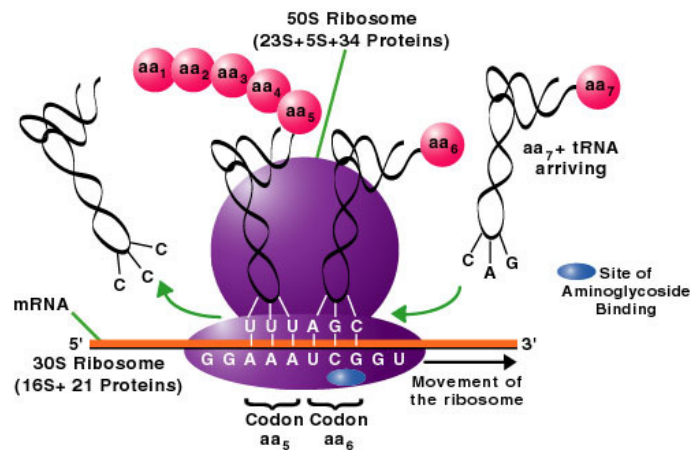


Figura 1. 5: Schema di un ribosoma

A livello del ribosoma, l'appaiamento corretto dell'anticodone del tRNA con i codoni del mRNA permette l'inserimento degli amminoacidi nella giusta sequenza, la formazione del legame peptidico e dunque la sintesi della proteina corretta. [Figura 1.5]

1.2.4 Terapia antigene/antisense

La terapia antigene/antisense permette di bloccare l'attività di una proteina patogena senza conoscerne la struttura come normalmente avviene nella *rational drug design*, poiché il problema viene risolto a monte, prima che la proteina stessa sia sintetizzata.⁹

La terapia antigene/antisense si basa sul blocco del flusso informativo di un messaggio genetico a monte di un processo patogeno. Questo è possibile sfruttando la complementarità delle nucleobasi che permette di bloccare in modo selettivo l'espressione genica a livello trascrizionale o traduzionale senza intaccare le porzioni di DNA correttamente funzionanti. A tal proposito è necessario l'intervento di un oligonucleotide sintetico in grado di creare un complesso stabile con la sequenza da bloccare mediante complementarità.¹⁰ La specificità dell'azione è ottenuta sequenziando la porzione di acido nucleico da inattivare e utilizzando un oligonucleotide sintetizzato in modo da essere perfettamente appaiabile in termini di nucleobasi. La terapia antigene agisce a livello della trascrizione inibendo la sintesi dell'mRNA, mentre la terapia antisense agisce a livello della traduzione, inibendo la sintesi delle proteine a partire dallo stampo di mRNA. [Figura 1.6]

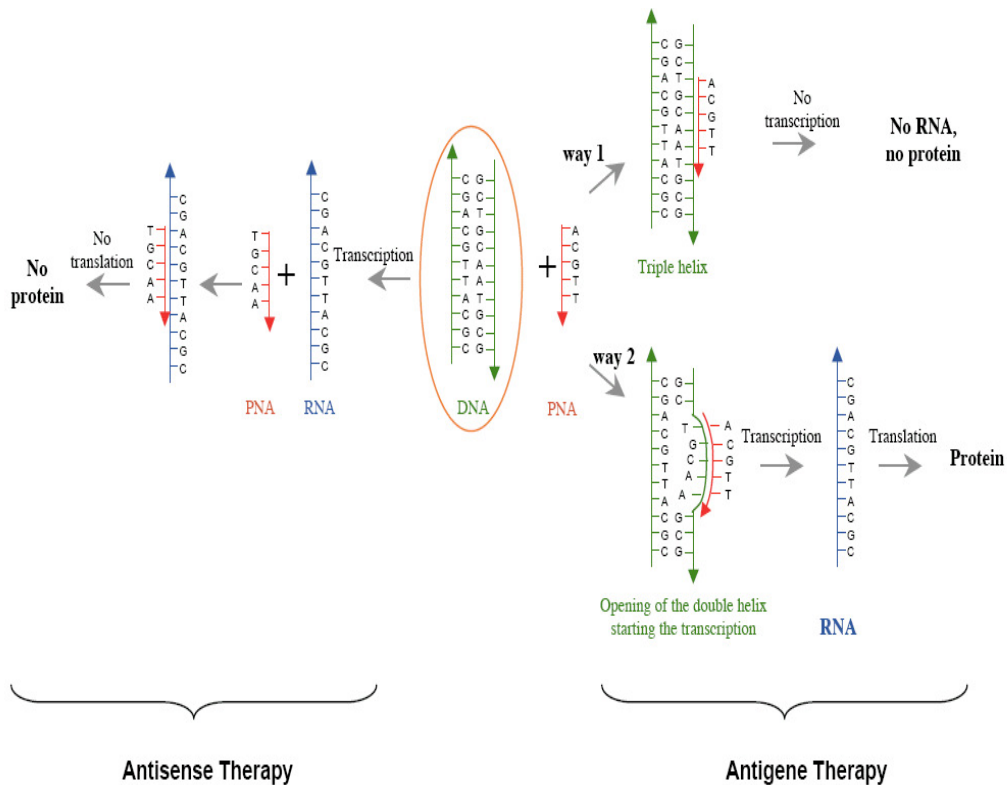


Figura 1. 6: Blocco del flusso dell'informazione genetica nella terapia antisense e antigene

Questa strategia è applicabile dal momento che una sequenza sufficientemente lunga di nucleotidi compare statisticamente solo una volta anche in un genoma complesso come quello umano. Per osservare un riconoscimento specifico tra sequenza bersaglio e oligonucleotide sintetico, la lunghezza minima stimata è di undici nucleotidi nel caso di sequenze ricche in guanina-citosina mentre tale numero arriva a quindici nel caso di adenina-timina. Questa differenza trova origine nella chimica dell'appaiamento: i legami idrogeno che permettono l'appaiamento C-G sono tre mentre per la coppia A-T sono due; nel primo caso, quindi, si ha una stabilità maggiore e dunque una selettività più stringente. Data la natura della terapia, gli oligonucleotidi utilizzabili devono possedere caratteristiche ben definite affinché il processo di inibizione sia possibile:

- Resistenza alle nucleasi intra/extra cellulari.
- Capacità di attraversare le membrane cellulari.
- Capacità di raggiungere l'interno della cellula senza subire alterazioni.
- Capacità di interagire con la sequenza target in maniera specifica e con elevata affinità

Tali condizioni sono definite in funzione di tre caratteristiche chimico-strutturali:

- Affinità tra nucleotidi della sequenza bersaglio e dell'oligomero sintetico in condizioni fisiologiche.¹¹
- Selettività nell'inibire solo la sequenza bersaglio, lasciando inalterate le altre.
- Stabilità del complesso, misurabile mediante la temperatura di melting (T_m), temperatura alla quale avviene dissociazione in catene singole di metà dell'ibrido.¹²

Proprio queste caratteristiche evidenziano la necessità di utilizzare nucleotidi alternativi. Se, infatti, apparentemente, i nucleotidi naturali sembrano i più adatti a ricoprire il ruolo di inibitori, in realtà si osservano due significativi limiti biochimici. In primis, essendo molecole naturalmente sintetizzate dagli organismi, sono facilmente riconoscibili e degradabili dalle nucleasi. Inoltre, sono dotati di carica negativa (gruppi fosfodiesterici del backbone), quindi l'attraversamento delle membrane cellulari risulta problematico. Per queste ragioni da decenni¹³ la chimica si concentra sulla sintesi di molecole in grado di superare i limiti dei nucleotidi naturali.

1.3 Omologhi di acidi nucleici

Data la necessità, di avere a disposizione molecole in grado di interagire in maniera altamente specifica con il DNA e l'RNA senza subire processi di degradazione enzimatica, sono stati sviluppati negli ultimi decenni diverse classi di molecole che, nonostante differiscano a livello chimico, sono in grado di mimare gli acidi nucleici naturali.¹³ Gli omologhi sintetici attualmente più promettenti sono gli LNA, GNA, TNA, HNA e PNA che, grazie ad una base chimica differente dai nucleotidi naturali, tendenzialmente non vengono riconosciuti dagli enzimi cellulari adibiti alla degradazione degli acidi nucleici.¹⁴

1.3.1 LNA

Gli LNA (Locked Nucleic Acid) sono oligomeri formati da unità di 2'-O,4'-C-metilenbiclonucleoside dotato di uno scheletro fosfodiesterico.

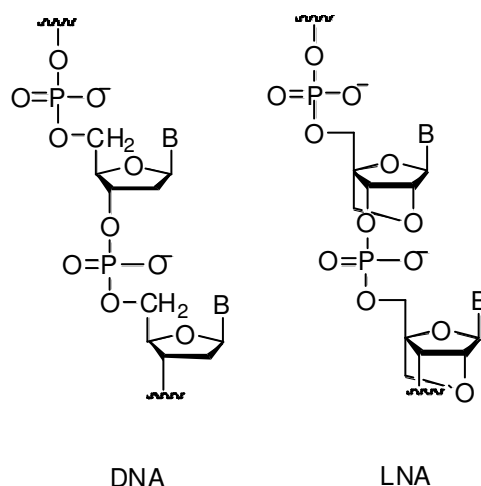


Figura 1. 7: Confronto della struttura DNA-LNA

Presentano una elevatissima affinità per il DNA ed in particolare per l'RNA, alta solubilità e possono essere sintetizzati utilizzando una chimica fosforamidica convenzionale.¹⁵ Essendo dotati di un backbone contenente fosfato e, dunque carico negativamente, gli LNA possono essere trasportati dentro la cellula mediante protocolli che sfruttano agenti di trasferimento cationici.¹⁶

1.3.2 GNA

Un'altra classe di omologhi degli acidi nucleici sono i GNA, ovvero Glycole Nucleic Acid. Sono oligomeri chirali formati da sequenze di 2,3-diidrossipropilnucleosidi.

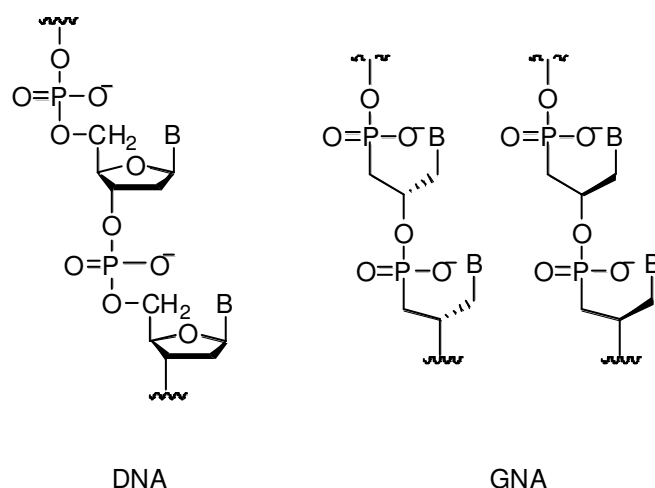


Figura 1. 8: Confronto della struttura DNA-GNA

Sono molecole più semplici rispetto ai corrispettivi acidi nucleici naturali, formate da unità glicosidiche unite mediante ponti fosfordiesterei. Rispetto agli altri acidi nucleici aciclici, presentano una struttura più semplice composta da un numero inferiore di atomi di carbonio e stereo centri.¹⁷ Questa classe di omologhi è in grado di formare duplex con appaiamento di tipo Watson-Crick¹⁸ con un grado di fedeltà di poco inferiore al DNA (ΔT_m per mismatch compreso tra 6 ed 8 gradi rispetto ad un ΔT_m compreso tra 10 e 23 per il DNA).¹⁹ In particolare investigando (S)-GNA/(S)-GNA e (R)-GNA/(R)-GNA, si è osservato che questi duplex presentano stabilità maggiori dei corrispettivi di DNA (ΔT_m tra +18 e +25 °C). Tale stabilità, sorprendentemente, sarebbe correlata a ragioni di tipo entropico. Infatti, il deficit entropico dovuto al backbone aciclico, più flessibile e sfavorito nella formazione di duplex, risulta compensato da meccanismi di pre-organizzazione, uniti ad interazioni favorevoli di tipo *base staking*. In ogni caso sono stati osservati omoduplex Watson-Crick solo per appaiamenti (S)-GNA/(S)-GNA e (R)-GNA/(R)-GNA, sia per orientazioni parallele che antiparallele. Inoltre, non si è osservato appaiamento con il DNA nè per (S)-GNA, nè per (R)-GNA. Tuttavia gli (S)-GNA, ma non i (R)-GNA, possono appaiare l'RNA in maniera antiparallela nei duplex privi di G e C.²⁰

1.3.3 HNA

Un' ulteriore classe di omologhi degli acidi nucleici sono gli HNA (Hexitol Nucleic Acid). Sono molecole composte da unità di 2P,3P-dideossi-1P,5P-deidro-D-arabino-exitolo, nucleosidi con legami internucleosidici 4P-6P fosfodiesteri e basi G, A, C o T posizionate sul 2P.

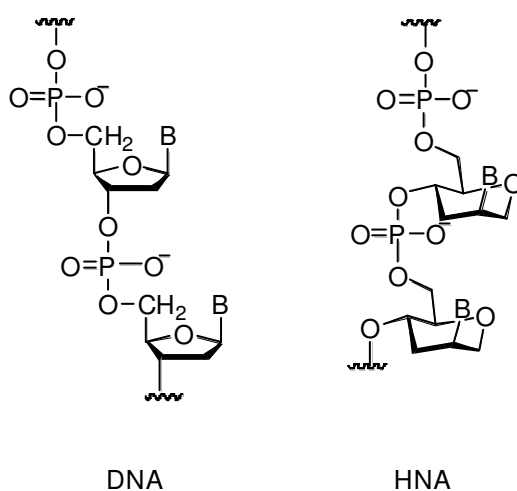


Figura 1. 9: Confronto della struttura DNA-HNA

L'anello a sei termini mimma un anello piranoso congelato nella conformazione 2P-eso 3P-endo. Dunque può essere visto come un furanoso esteso, dove un gruppo metilene è inserito tra le posizioni O4-P e C1-P. Gli HNA mostrano una conformazione preferenziale con la nucleobase in posizione assiale a causa di tensioni steriche indotte dal doppietto non condiviso dell'ossigeno dell'exitolo.²¹ A causa di questa tensione conformazionale le basi si impacchettano efficacemente, conferendo una limitata libertà conformazionale. Gli spettri CD (Circular Dichroism) di filamenti singoli di HNA e ibridi HNA/RNA risultano molto simili a spettri di RNA/RNA. L'introduzione di uno o due mismatch in un duplex RNA/HNA comporta la destabilizzazione del complesso, dunque si ipotizza che il legame e la specificità di sequenza siano conferiti da appaiamento tipo Watson-Crick. Inoltre, duplex di HNA risultano più stabili di duplex naturali (RNA o DNA), con stabilità decrescente HNA/HNA, HNA/RNA, HNA/DNA.²² Data la stabilità dei complessi HNA/RNA è ipotizzabile l'utilizzo di queste molecole in terapie antisense. Tale stabilità può essere una conseguenza del fatto che l'HNA tende a formare una struttura di tipo A. Tale fenomeno è confermato, oltre che dagli spettri CD, anche da simulazioni di *molecular dynamics* che prevedono la forma A sia per duplex HNA/RNA che per ibridi HNA/DNA.²³

1.3.4 TNA

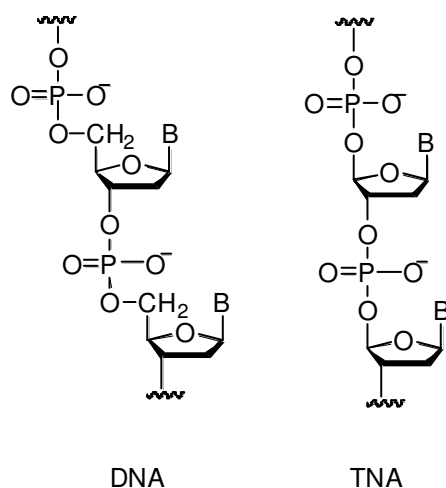


Figura 1. 10: Confronto della struttura DNA-TNA

Il TNA (1- α -threofuranosyl (3' \rightarrow 2') nucleic acid) è il più semplice acido nucleico contenente uno zucchero finora sintetizzato. E' in grado di formare complessi sia con RNA che DNA mediante legami Watson-Crick (l'accoppiamento con RNA è più forte rispetto al DNA).²⁴ Il

backbone del TNA è più corto degli acidi nucleici poiché lo zucchero contiene solo quattro atomi di carbonio ed i gruppi fosfodiesteri sono collegati alle posizioni 2' e 3' dell'anello furanosidico rispetto al 3' e 5' nel DNA ed RNA. Tuttavia, l'RNA e certe sequenze di DNA possono comunque fungere da stampo per frammenti di TNA.²⁵ Si è osservato, inoltre, che analoghi azotati di TNA, in cui, sia O3' che O2', sono sostituiti con un gruppo NH, sono equamente efficienti nell'appaiamento di tipo Watson-Crick.²⁶ Recentemente è stato scoperto che alcune DNA polimerasi possono copiare, a velocità inferiore, alcuni stampi di TNA,²⁷ o sintetizzare TNA partendo da stampi di DNA.²⁸ La struttura cristallina degli oligonucleotidi rivela una conformazione *exo* per il C4' del tetrosio, accoppiata ad una orientazione quasi *trans*-diassiale dei sostituenti 3' e 2'. Inoltre, è possibile incorporare una timina di TNA in un doppio filamento di forma B di DNA senza distorsioni apparenti, benché le distanze P-P internucleotidiche nei TNA siano significativamente più corte rispetto a quelle tra atomi di fosforo 5' e 3' nei 2' del DNA in forma B.²⁹

1.4 PNA

I PNA (Peptide Nucleic Acid) sono acidi nucleici omologhi delle molecole di DNA, inventati nel 1991, in grado di mimarne le proprietà di appaiamento. Dato che la natura chimica di queste molecole risulta significativamente diversa rispetto a quella degli acidi nucleici naturali, i PNA non sono riconosciuti e degradati dalle nucleasi che normalmente agiscono sul DNA o RNA, risultando, per questo, particolarmente stabili nell'ambiente cellulare.

1.4.1 Struttura

La struttura di un PNA è relativamente semplice³⁰ e consiste essenzialmente nella ripetizione di unità *N*-(2-amminoetil)-glicina unite attraverso legami ammidici. Le basi azotate puriniche (A,G) e pirimidiniche (C,T) sono unite al backbone mediante legami metilencarbonilici.

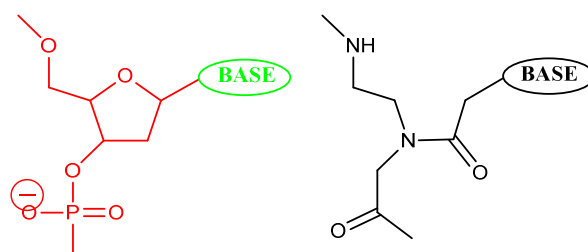


Figura 1. 11: Confronto della struttura di un monomero di DNA e un monomero di PNA

A differenza del DNA, non contengono zuccheri pentosi né gruppi fosfato. Risulta per questo sorprendente il fatto che possano mimare il comportamento del DNA e addirittura essere dotati di proprietà superiori. Data la struttura, sono convenzionalmente considerati peptidi, con l'*N*-terminale all'inizio della sequenza (destra) e il C-terminale alla sinistra. Oltre alle ovvie differenze strutturali, i PNA differiscono dal DNA poiché il backbone è aciclico, achirale e, elemento molto importante, neutro. Anche se chimicamente molto diversa, la disposizione degli atomi nella molecola rispecchia idealmente la posizione degli atomi nel corrispondente nucleotide. Per questa ragione si osserva che la distanza tra le basi nei PNA rispetta fedelmente la distanza tra le basi nel DNA.³⁰ Dal momento che i PNA e il DNA non condividono alcun gruppo funzionale, se non le nucleobasi, la stabilità chimica delle due molecole differisce significativamente.³¹ A differenza del DNA, in cui si ha depurinazione dopo trattamento con acidi forti, i PNA risultano essere stabili in ambiente acido. Alcune instabilità chimiche possono derivare dal gruppo amminico terminale, dove si può osservare un lento trasferimento del gruppo *N*-acil della nucleobase o un taglio dell'unità ammino-terminale attraverso chiusura dell'anello in condizioni basiche.³² [Figura 1.12]

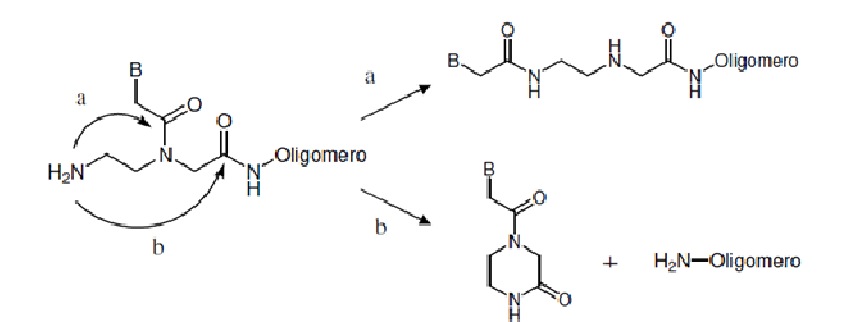


Figura 1. 12: Meccanismi di degradazione di PNA

Essendo chimicamente neutri, i PNA risultano essere meno solubili rispetto al DNA. Le molecole di PNA tendono ad aggregare in ambiente acquoso in funzione della sequenza degli oligomeri. La solubilità è, inoltre, relazionata alla lunghezza dell'oligomero e al rapporto purine/pirimidine.³³ Da un punto di vista analitico, le informazioni disponibili sono limitate, infatti, i coefficienti di estinzione dei monomeri di PNA non sono conosciuti quanto i corrispondenti monomeri di DNA ed RNA. Ci si aspetta, tuttavia, che varino rispetto alle controparti di DNA ed RNA poiché un diverso backbone va a perturbare in maniera differente il sistema π delle nucleobasi. Dal momento che i coefficienti dei vari PNA non sono caratterizzati e non è noto il contributo del backbone al sistema π , si può valutare la

concentrazione di monomero solo misurando l'assorbimento a 260 nm a 80 °C, temperatura alla quale le nucleobasi sono completamente staccate ed il contributo del backbone può essere considerato ininfluenza.³⁴

1.4.2 Proprietà

I PNA furono inizialmente concepiti con la finalità di potersi legare come filamento di Hoogsteen ad un doppio filamento complementare di DNA, in modo da ottenere un triplex (DNA)₂-PNA. È stata però osservata la capacità, inizialmente inaspettata, dei PNA di mimare efficacemente il DNA, tanto da partecipare alla formazione di duplex e triplex. In questo senso i PNA hanno mostrato proprietà superiori agli acidi nucleici tradizionali.³³

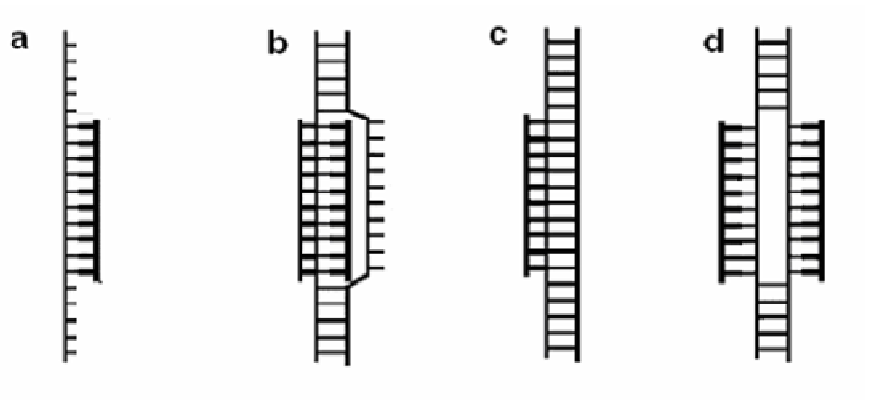


Figura 1. 13: Possibilità di appaiamento PNA-DNA; a) duplex PNA/DNA(RNA), b) triplex PNA₂/DNA, c) triplex PNA/DNA₂, d) quadruplex PNA₂/DNA₂ (PNA in grassetto)

1.4.2.1 PNA/DNA(RNA) duplex

L'affinità di legame di PNA, contenenti sia purine che pirimidine, nei confronti di acidi nucleici complementari è stata ampiamente studiata mediante spettroscopia UV. Per esempio il pentadecamero 5'(TGT ACG TCA CAA CTA) è in grado di formare un doppio filamento antiparallelo maggiormente stabile ($T_m=69.5$ °C) del corrispettivo DNA/DNA ($T_m=53,3$ °C).³⁵ L'appaiamento parallelo risulta invece un ibrido meno stabile ($T_m=56,1$ °C), ma comunque più stabile del DNA/DNA. In generale, si osserva un aumento di stabilità proporzionale al numero di basi, corrispondente ad 1 °C per base nella temperatura di fusione rispetto al DNA/DNA. La stabilità di ibridi PNA/DNA, a differenza dei corrispondenti DNA/DNA, non varia al variare della forza ionica del mezzo. Nel duplex DNA/DNA la stabilità aumenta fino quasi ad eguagliare PNA/DNA a concentrazione 1M di NaCl. I duplex

antiparalleli PNA/RNA risultano ancora più stabili dei corrispettivi PNA/DNA con un incremento di 1,5 °C per base nella T_m . Infine, i complessi PNA/DNA risultano più sensibili alla presenza di un singolo mismatch rispetto ai complessi DNA/DNA. Infatti, in questi casi, si possono osservare abbassamenti delle T_m tra i 9 e i 18 °C.³⁶ Da questa proprietà deriva la straordinaria selettività di queste molecole.

| DNA(RNA) complementare | Duplex | T_m^a |
|---------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 3' d(ACA TGC AGT GTT GAT) | DNA/DNA | 53.3 °C (63 °C) ^b |
| 3' d(ACA TGC AGT GTT GAT) | PNA/DNA (antiparallelo) | 69.5 °C (67 °C) ^b |
| 3' d(TAG TTG TGA CGT ACA) | PNA/DNA (parallelo) | 56.1 °C |
| 3' r(ACA UGC AGU GUU GAU) | DNA/RNA | 50.6 °C |
| 3' r(ACA UGC AGU GUU GAU) | PNA/RNA (antiparallelo) | 72.3 °C |

Tabella 1. 1: Temperature di melting per varie tipologie di duplex e di dodecameri

1.4.2.2 (PNA)₂DNA triplex

Utilizzando tratti omopurinici di PNA su tratti omopiridinici di DNA è possibile osservare addotti stabili di tipo tripla elica PNA/DNA/PNA. L'accoppiamento avviene mediante legami di tipo Watson-Crick e Hoogsten. Nel caso in cui la sequenza target è localizzata in un frammento di DNA a doppia elica, il PNA è in grado di aprire la doppia elica e formare una struttura definita P-loop mediante un processo denominato "strand invasion".

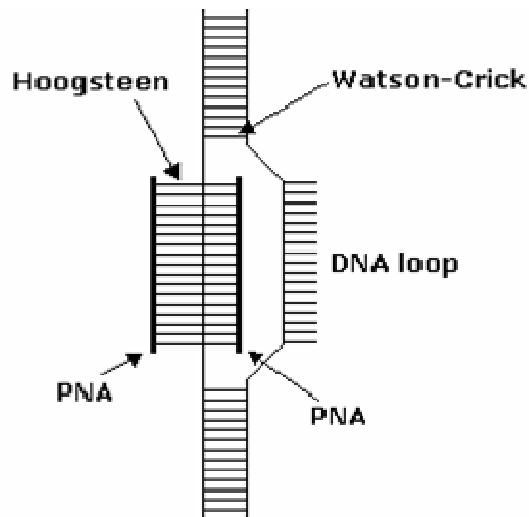


Figura 1. 14: Struttura del triplex PNA2-DNA (PNA in grassetto)

Un filamento di PNA va a legare, mediante appaiamento Watson-Crick, il filamento di DNA omopurinicamente antiparallelo e successivamente il secondo filamento di PNA va a legare il DNA mediante legami di tipo Hoogsteen [Figura 1.15] parallelamente con conseguente formazione di una tripla elica locale. La stabilità risulta molto alta e dipende dalla lunghezza dell'oligomero con un aumento di 10 °C nella T_m per base.³⁶

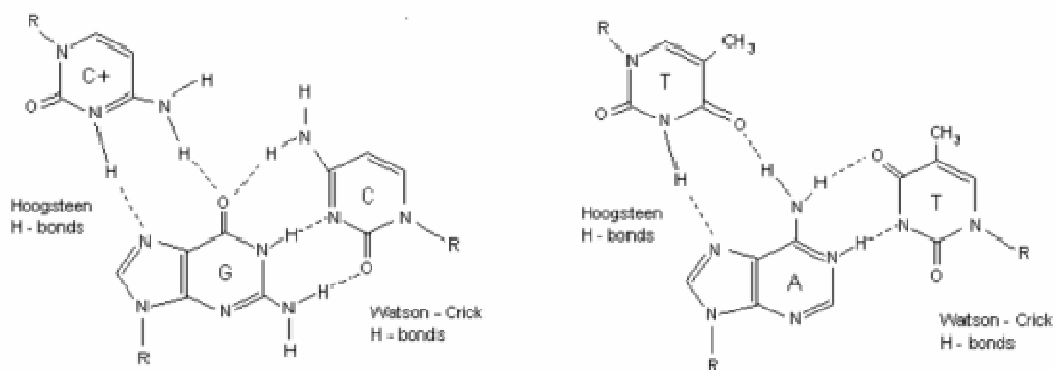


Figura 1. 15: Schema dei legami coinvolti nella formazione di un triplex PNA2-DNA

1.4.2.3 PNA/(DNA)₂ Triplex

Nel caso vengano utilizzati PNA omopirimidinici ad alto contenuto di citosine si osserva la formazione di triplex PNA/(DNA)₂, nelle quali un singolo filamento di PNA è legato ad una doppia elica di DNA mediante legami di tipo Hoogsteen.³⁷

1.4.2.4 PNA₂-DNA₂ Quadruplex

Utilizzando oligomeri pseudocomplementari di PNA (pcPNA) è possibile osservare il fenomeno della “duplex invasion”, cioè la formazione di strutture quadruplex. Ciò è possibile poiché gli oligomeri pseudocomplementari sono dotati di basi non naturali di diamminopurina e tiouracile al posto dell’adenina e della timina. Queste basi difficilmente riescono ad appaiarsi per ragioni di ingombro sterico [Figura 1.16], quindi il duplex PNA risulta molto instabile e non si forma; se il contenuto di basi AT è pari almeno al 50% del totale, si va a formare il quadruplex, in cui due filamenti di PNA si legano a due filamenti di DNA disponendosi in maniera diametralmente opposta.

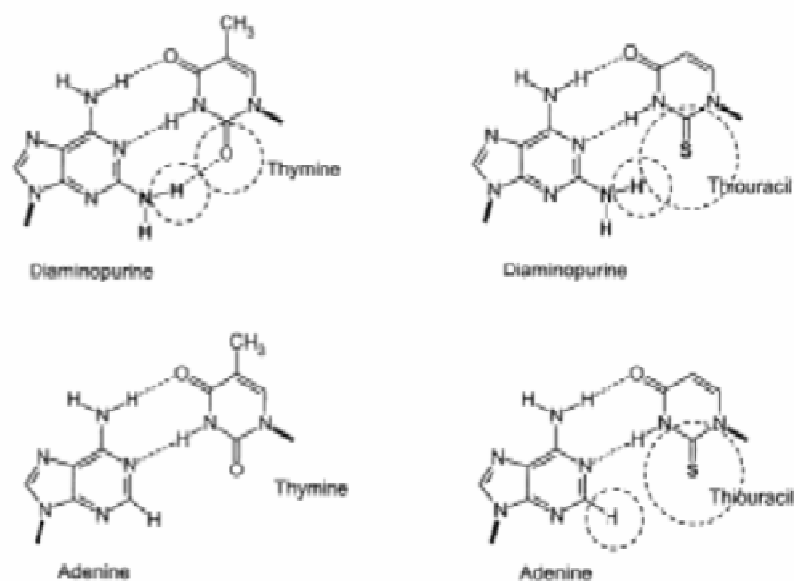


Figura 1. 16: appaiamento di basi complementari e pseudocomplementari

1.4.3 Applicazioni

Data la straordinaria capacità di appaiarsi con il DNA, le applicazioni per i PNA risultano molteplici:³⁸ sia come potenziali agenti terapeutici, che come potenti strumenti in biologia molecolare e in diagnostica.

1.4.3.1 Farmaci antisenso e antigene

I PNA possono legare sequenze di mRNA modulandone la funzionalità. Inoltre, sono in grado di funzionare anche come molecole antigene, poiché possono intervenire rompendo un duplex di DNA formando triplex PNA/DNA o doppi duplex senza denaturare il duplex di DNA originario.³⁸ I PNA sono solitamente legati con peptidi in grado di penetrare facilmente la

cellula o con molecole lipofile, per migliorare il trasporto attraverso le membrane, dato che i PNA non legati tendono a diffondere molto lentamente attraverso la membrana cellulare.³⁹

1.4.3.2 PCR clamping

La tecnica della “PCR clamping” a PNA è stata sviluppata per rilevare polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) all’interno di una determinata sequenza genica. Questa tecnica permette, ad esempio, di individuare la presenza di cellule tumorali tra cellule sane, durante la biopsia di un tessuto. Durante la PCR, un PNA opportuno, può legare in maniera specifica il DNA non mutato, impedendone l’amplificazione, che invece andrà a interessare la sequenza mutata che non legherà perfettamente il PNA. Una singola base non corrispondente permette di discriminare la sequenza mutata da quella naturale.³⁸

1.4.3.3 Enzimi di restrizione artificiali

I PNA possono essere, inoltre, utilizzati come enzimi di restrizione artificiali, sviluppati per il taglio sito-specifico di una doppia elica di DNA. In questo sistema due filamenti di PNA invadono un duplex di DNA, generando un punto in cui sia possibile il taglio catalitico da parte del complesso Ce(IV)/EDTA.⁴⁰ Questa applicazione risulta vantaggiosa quando non sono presenti siti di restrizione all’interno di sequenze specifiche.

1.4.3.4 Microarray e biosensori

I PNA possono essere utilizzati come microarrays o biosensori. I microarray a PNA combinati con la PCR permettono, per esempio, di rilevare la presenza di organismi geneticamente modificati (OGM) nei cibi.⁴¹

1.4.3.5 Purificazione acidi nucleici

I PNA, legati a sei residui di istidina, possono essere impiegati per la purificazione di un acido nucleico mediante cromatografia di affinità con nichel.⁴²

1.5 Monomeri alternativi

Le attuali limitazioni dei PNA risiedono essenzialmente nella scarsa solubilità, nelle difficoltà di penetrazione attraverso le membrane cellulari e nella ambiguità derivante dalla capacità di legare il DNA/RNA in verso parallelo ed antiparallelo indiscriminatamente. Per ovviare a questi problemi, si è tentato di effettuare specifiche modifiche di analoghi dei PNA.⁴³ In

primis, il problema della solubilità è stato affrontato mediante coniugazione con leganti cationici come poliammide,⁴⁴ residui lisinici nelle zone C/N terminali⁴⁵ o guanidinici nel backbone.⁴⁶ Per quanto concerne la capacità di penetrare la membrane cellulare si è cercato di coniugare il PNA con diverse molecole trasportatrici, in particolare peptidi in grado di penetrare nelle cellule.⁴⁷ Infine, le problematiche relative alla possibilità, da parte dei PNA, di legare in maniera parallela e antiparallela, riducendo la specificità, sono state affrontate introducendo chiralità nei backbone (originariamente achirali) per indurre selettività di orientamento durante l'ibridazione con il DNA o l'RNA complementare.⁴⁸

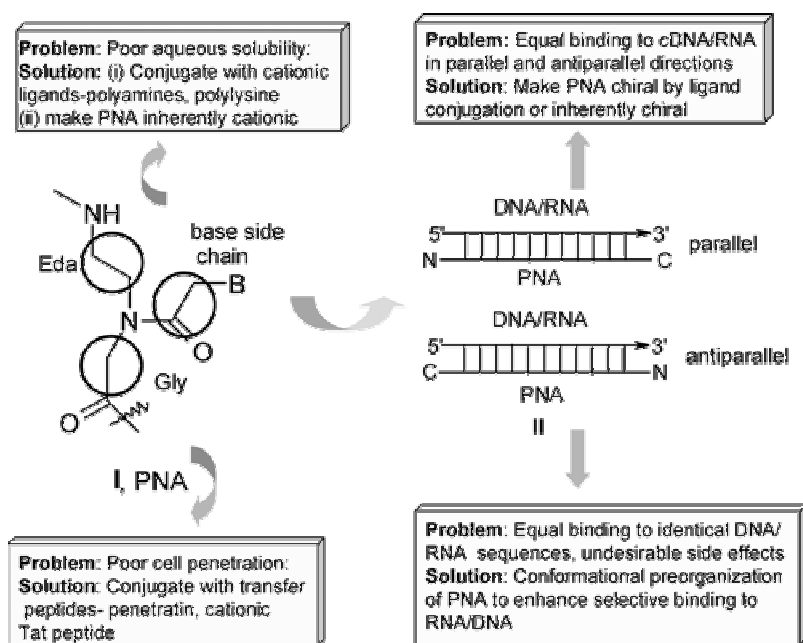


Figura 1. 17: schema problematiche dei PNA e potenziali risoluzioni

I monomeri tradizionali di PNA (aegPNA), essendo aciclici, sono dotati di un buon grado di flessibilità conformazionale. Per questa ragione, la formazione dei complessi PNA-DNA/RNA è correlata a cambiamenti conformazionali degli oligomeri di PNA, compensati dal guadagno entalpico ottenuto dall'instaurazione dei ponti idrogeno e dalle interazioni *base staking*, accompagnati però da una diminuzione di entropia.⁴⁹ Qualsiasi aumento di libertà conformazionale negli aeg-PNA mediante backbone esteso⁴³ o strutture in catena laterale⁵⁰ portano ad una diminuzione di stabilità dei complessi PNA-DNA/RNA. Un elemento strutturale nei PNA, che interferisce con l'ibridazione, è la presenza di rotameri cis e trans attorno all'ammide terziaria tra ogni monomero di PNA.⁵¹ La barriera energetica tra queste due conformazioni comporta differenze significative nelle cinetiche di ibridazione PNA-

DNA/RNA nel caso si abbia appaiamento parallelo o antiparallelo.⁵² Nel corso degli ultimi anni, sono stati sviluppati PNA dotati di selettività nella complementazione di DNA o RNA mediante modifiche tali da comportare una pre-organizzazione del PNA stesso.⁵³ Lo spostamento di equilibrio verso il complesso desiderato si otterrebbe a causa della ridotta perdita di entropia concomitante al contributo entalpico, che invece rimarrebbe costante. Le principali strategie di pre-organizzazione conformazionale si basano sull'introduzione di gruppi metilene/etilene in grado di legare il backbone amminoetilglicinico ed il gruppo laterale metilencarbonilico, in modo da generare analoghi eterociclici azotati a cinque o sei termini. Questa strategia permette di superare il problema dei rotameri, andando a definire l'orientamento delle nucleobasi. Contemporaneamente si possono introdurre centri chirali che possono indirizzare in maniera selettiva il legame PNA-DNA/RNA chirali.

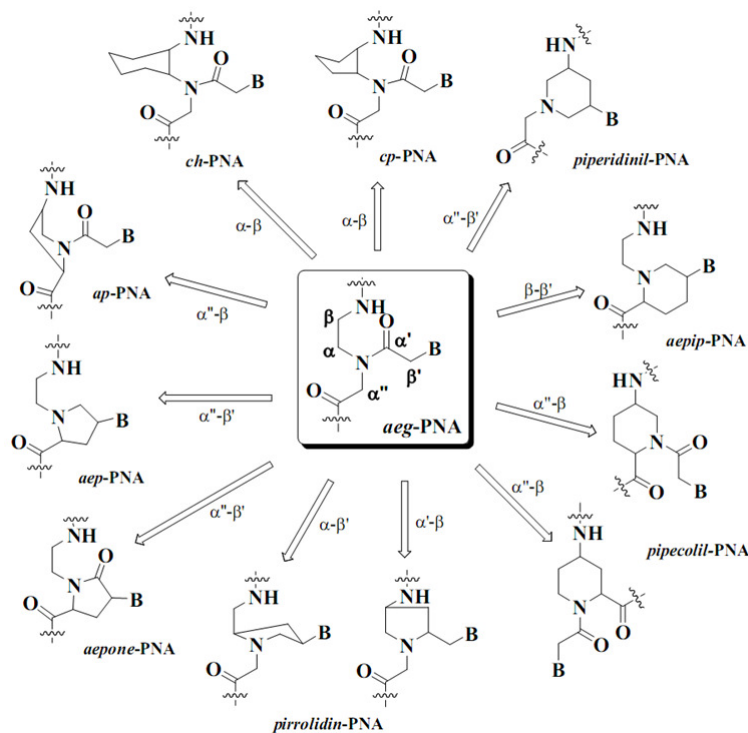
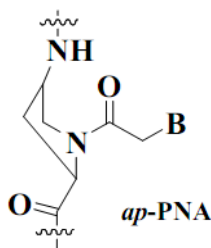


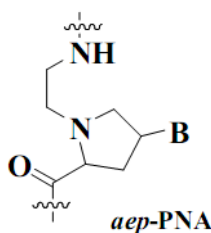
Figura 1. 18: Modifiche indagate a partire da PNA tradizionali

1.5.1 Amminopropil PNA (ap-PNA)



La molecola è ottenuta introducendo un ponte metilico tra il carbonio β del segmento amminoetilico ed il carbonio α' del segmento glicinico in un aeg-PNA. Questo comporta lo sviluppo di due centri chirali.⁵³ L'introduzione di uno di questi monomeri D- o L- trans in un aeg-PNA all'*N*-terminale o all'interno della sequenza, comporta una maggiore affinità di legame Hoogsteen e Watson-Crick tra le basi ed una preferenza per l'appaiamento parallelo o antiparallelo.

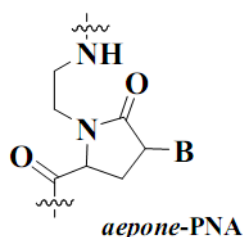
1.5.2 Amminoetilpropil PNA (aep-PNA)



La molecola è ottenuta mediante un ponte metilico tra carbonio α' del segmento glicinico e β' del linker della nucleobase ed inoltre con la sostituzione del carbonile a lato della catena con un metilene.⁵⁴ La glicina e la catena laterale risultano dunque vincolate, mentre il segmento amminoetilico mantiene la flessibilità originaria. La nucleobase risulta legata all'anello pirrolidinico in maniera stereospecifica. L'azoto pirrolidinico, con un pKa di 6,8, può essere protonato a pH fisiologico. La carica positiva non sembra interferire con il processo di appaiamento ("ricognizione molecolare *H-bonding*), tuttavia, può influenzare la torsione dell'anello alterando la conformazione delle basi e dunque la stabilità dei complessi. Gli oligomeri di aeg-PNA-T, contenenti 4(S)-2(S/R)-aep-PNA-T mostrano proprietà di binding forti e specifiche verso il DNA target. La stereochimica del C-2 risulta ininfluenza sulla capacità di appaiamento. L'oligomero con (2R-4R)-aep-PNA-T₈ stabilizza i complessi con poli rA. Il (2S-4S) come oligomero poliadeninico stabilizza il complesso con il DNA target, mentre come politiminico non mostra variazione negli esperimenti *UV-melting*.⁵⁵ Per

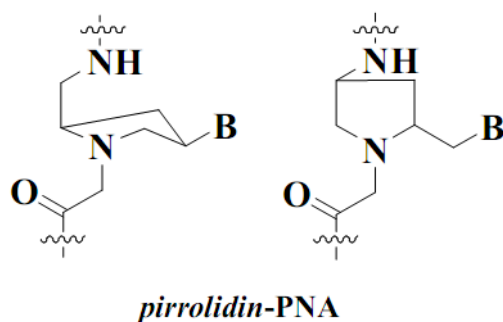
sequenze miste si osserva che l'efficienza di appaiamento è base-dipendente e che si ha selettività di orientamento.⁵⁶ I duplex aep-PNA/DNA antiparalleli risultano maggiormente stabili dei corrispettivi antiparalleli (eccetto G4(2S-4S)) ed inoltre risultano generalmente più stabili dei corrispettivi aeg-PNA/DNA, eccetto duplex paralleli C7(2S e 2R), T6(2S e 2R) e G4(2R). Ciò potrebbe derivare dalla conformazione dell'anello pirrolidinico che sembra dipendere dall'elettronegatività del sostituente in C-4 che varia tra le nucleobasi.⁵⁷

1.5.3 Amminoetilpirrolidone PNA (aepone-PNA)



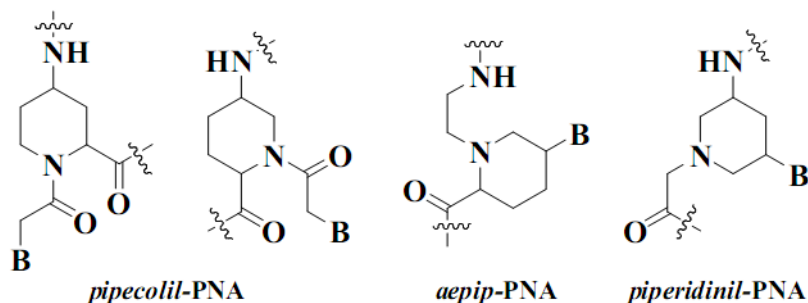
Al fine ridurre gli effetti conformazionali dell'anello pirrolidinico degli aep-PNA, è stato introdotto un gruppo carbonilico endociclico al C-5 dell'aep-PNA ristabilendo il carattere ammidico dell'azoto ciclico, non soggetto a deprotonazione. Gli effetti di torsione dell'anello con il carbonile sono minimi. I monomeri (*aepone*)-timina sono stati sintetizzati⁵⁸ e incorporati in diverse posizioni in un oligomero *aeg*-PNA-T₈. Gli *aepone*-PNA mostrano una maggior stabilizzazione dei triplex PNA₂-DNA rispetto all'*aeg*-PNA.⁵⁹ Gli *aepone*-PNA sono meno stabili nei complessi con RNA (poli rA) rispetto ai corrispettivi con DNA, mostrando una inversione nell'abilità di *binding* dell'*aeg*-PNA (RNA>DNA). Da qui la possibilità di sintetizzare un PNA preorganizzato che discrimini tra DNA e RNA durante l'appaiamento.

1.5.4 Pirrolidin-PNA



La molecola è ottenuta mediante un ponte metilico tra il carbonio α del segmento amminoetilico ed il carbonio β' della catena laterale, dotata di un metile al posto del carbonile.⁶⁰ Un pirrolidone alternativo è ottenuto mediante ponte metilico tra il carbonio α' della catena laterale ed il carbonio β del segmento amminoetilico. La base risulta lontana dall'anello pirrolidinico di un atomo di carbonio e dunque la sua orientazione non è vincolata. Introducendo il monomero (2R-4S) pirrolidin-T in un aeg-PNA-T₈, si osserva un incremento di stabilità nel legame con il DNA target. Il diastereoisomero (2S-4S) al contrario, destabilizza il complesso. Quando poi si incorporano i quattro diastereoisomeri T in una sequenza di basi aeg-PNA si osserva che i (4R) stabilizzano il duplex PNA-DNA in maniera selettiva per orientamento parallelo/antiparallelo (rispetto ad aeg-PNA semplici).⁶¹ I 4S di tutte e quattro le basi, invece, destabilizzano i duplex, senza differenze tra parallelo e antiparallelo (rispetto aeg-PNA semplici). Le coppie enantiomeriche (2S-4S) e (2R-4R) formano complessi più stabili con l'RNA rispetto agli aeg-PNA o gli altri diastereoisomeri. Gli analoghi pirrolidin-PNA (2R, 4S) di tutte e quattro le basi mancano invece degli effetti discriminatori: sia per quanto riguarda parallelo/antiparallelo, sia DNA/RNA.

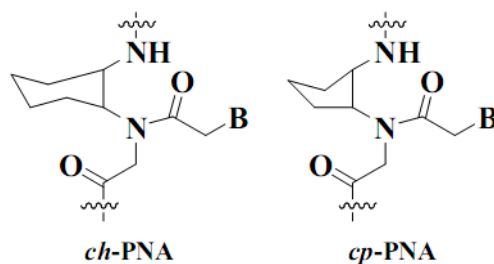
1.5.5 Pipecolil e Piperidinil-PNA



Rispetto agli anelli a cinque termini, gli anelli a sei atomi di carbonio risultano più rigidi a causa delle alte barriere di energia tra la configurazione a sedia ed a barca oltre alla minor energia dei sostituenti se disposti equatorialmente. Per questo motivo, gli anelli a sei termini possono essere congelati in uno o più isomeri stabili. L'amminopropilglicil-PNA è una forma estesa dell'aeg-PNA, che tuttavia lega con minor efficienza il DNA target.⁶² L'oligomero modificato PNA-T₈(pip-PNA) contenente il monomero trans (2S-4S) pregiudica la formazione di triplex con il DNA. E' possibile, inoltre, introdurre un ponte elilenico tra il carbonio β del segmento amminoetilico ed il carbonio α' del segmento glicinico; si ottiene così l'analogo isomerico 5-ammino-pipecolil PNA. Sequenze politimiche aeg-PNA, contenenti questi monomeri, formano complessi stabili con il DNA target. Si osserva una

stabilizzazione se i sostituenti 2 e 5 restano in posizione trans diequatoriale (privilegiata) e le distanze internucleari e i legami ad idrogeno non sono disturbati. Infine, è possibile introdurre un ponte etilenico tra il carbonio α' dell'unità glicinica con il carbonio β' del linker, ottenendo l'aepip-PNA,⁶³ analogo omologo degli aep-PNA.⁶⁴ Si è osservato che questo monomero con stereochimica (2S, 5R) può stabilizzare triplex PNA₂-DNA se inserito in differenti posizioni in omo-oligomeri aeg-PNA-T₈ o oligomeri misti T/C. Un ulteriore esempio di PNA contenente piperidine è stato ottenuto legando il carbonio in β del segmento amminoetilico con il carbonio β' del linker della nucleobase, attraverso un ponte metilico, che dispone i sostituenti dell'anello in posizione 1-3 trans. Si ipotizza che la disposizione diequatoriale (*ee*) dello scheletro disponga la nucleobase in un'orientazione assiale migliorando nell'interazione *H-bonding* come avviene negli HNA.⁶⁵ I PNA incorporanti l'unità trans (3S-5S)-piperidinil-T in un *aeg*-PNA-T₈ mostrano maggior stabilità nei triplex con DNA rispetto ai PNA di riferimento. A questo va aggiunto che l'azoto eterociclico può protonarsi a pH fisiologico, migliorando le prestazioni della molecola in termini di penetrazione cellulare.

1.5.6 Carbocyclic-PNA (*ch*-PNA e *cp*-PNA)



L'introduzione di un anello cicloesilico⁶⁶ sul segmento amminoetilico è stata una delle prime modifiche sulla struttura del PNA al fine di vincolarne la flessibilità, migliorando così gli angoli diedrici e, dunque, introducendo una preorganizzazione in grado di discriminare DNA da RNA. L'oligomero derivato trans-(1S-2S)-cicloesil PNA ibrida il DNA complementare con la stessa efficacia degli *aeg*-PNA non modificati, al contrario degli enantiomeri trans-(1R-2R)-cicloesil PNA. I ciclopentil PNA (*cp*-PNA), come i cicloesil PNA (*ch*-PNA), mostrano una maggior affinità verso l'RNA rispetto al DNA per quanto riguarda la formazione di complessi. La rigidità degli oligomeri *ch* e *cp* è stata confermata dal Job's plot, da analisi in gel elettroforesi e dagli spettri CD.⁶⁷ Dopo aver introdotto i monomeri *ch*-PNA e *cp*-PNA di entrambi gli enantiomeri (1S-2R) e (1R-2S) in sequenze miste di PNA, sono state

misurate le relative T_m degli ibridi con DNA o RNA complementari. Gli oligomeri *cp*-PNA mostrano T_m più alte dei *ch*-PNA, inoltre gli ibridi PNA/RNA risultano più stabili dei corrispettivi PNA/DNA. La stereochimica risulta maggiormente determinante negli oligomeri di *ch*-PNA: l'isomero (1R-2S) forma ibridi più stabili di (1S-2R). I valori di T_m per l'(1R-2S)-*ch*-PNA indicano una notevole differenza di stabilità tra complessi con DNA o RNA ($\Delta T_m = 50\text{ }^\circ\text{C}$); tale diastereoisomero potrebbe dunque essere utilizzato come molecola guida (“*lead molecule*”) per la discriminazione di DNA ed RNA. Per il (SR-RS)-*cp*-PNA, con il sistema ciclopentilico *cis*-sostituito, è permessa, mediante facili riarrangiamenti conformazionali, una riorganizzazione del piegamento (“*puckering*”) dell'anello ed il binding con DNA/RNA ad alta affinità ma senza selettività.

Di seguito, in tabella, sono riportate le caratteristiche dei vari PNA descritti in precedenza.

| PNA modificato | PROPRIETA' |
|--------------------------------|---|
| Amminopropil PNA (ap-PNA) | <ul style="list-style-type: none"> • Nessun appaiamento degli oligomeri omochirali. • La monosostituzione stabilizza i duplex PNA:DNA. • Preferenze di <i>binding</i> parallelo/antiparallelo dipendente dalla stereochimica. |
| Amminoetilpropil PNA (aep-PNA) | <ul style="list-style-type: none"> • Cationico, aumenta la solubilità • (2R, 4R)-T stabilizza il triplex PNA₂:DNA. • Nessun effetto sulla stereochimica C₂. • Accoppiamento con il DNA a formare un duplex: antiparallelo > parallelo. • A/C/G/T <i>binding</i> base dipendente. • Singolo <i>mismatch</i> più destabilizzante paragonato allo standard. |

| | |
|-------------------------------------|--|
| Amminoetil-pirrolidone (aeoponePNA) | <ul style="list-style-type: none"> • Mono-, di-, tetra-, aeopone-PNA. • Completamente modificati stabilizzano i triplex PNA₂:DNA. • Stabilizza i triplex con il poli rA. |
| PirrolidinPNA | <ul style="list-style-type: none"> • I (2R, 4S)-A stabilizzano sia complessi con il DNA che con l'RNA. |
| PirrolidinilPNA | <ul style="list-style-type: none"> • (2R, 4S)-T in un T₈ stabilizza il duplex PNA:DNA. • (2S, 4S)-T in un T₈ destabilizza il duplex PNA:DNA. • (2R, 4S)-T e (2S, 4S)-T:RNA duplex > DNA duplex. • Il duplex antiparallelo ha un <i>binding</i> superiore rispetto a quello parallelo. |
| 4/5-Amminopipecolil PNA | <ul style="list-style-type: none"> • 4-Amminopipecolil PNA stabilizza i triplex PNA₂:DNA. • 5-Amminopipecolil PNA destabilizza i triplex PNA₂:DNA. |
| Amminoetilpipecolil PNA | <ul style="list-style-type: none"> • Stabilizza marginalmente i triplex PNA₂:DNA. |
| Piperidinil PNA | <ul style="list-style-type: none"> • Stabilizza i triplex PNA₂:DNA. |
| Cicloesil PNA (<i>ch</i> -PNA) | <ul style="list-style-type: none"> • Destabilizza i triplex PNA₂:DNA e PNA₂:RNA. • Preferenze stereochimiche: SR>RS per DNA; SR<RS per l' RNA. • Sequenze miste: RNA>>DNA. |
| Ciclopentil PNA (<i>cp</i> -PNA) | <ul style="list-style-type: none"> • Stabilizza i triplex PNA₂/DNA e PNA₂/RNA. • Preferenze stereochimiche SR<RS. • Sequenze miste stabilizzano i duplex PNA:DNA e PNA:RNA. |

2. Scopo della tesi

Data la versatilità degli oligomeri di PNA, il potenziale terapeutico e diagnostico di queste molecole è destinato ad aumentare negli anni. Benché le strategie di sintesi per i PNA tradizionali (amminoetil-glicil-PNA) siano state indagate approfonditamente, risultano ancora aperte molte possibilità di indagine, riguardanti eventuali modifiche della struttura base al fine di migliorare le prestazioni della molecola. In particolare, si è ipotizzato che, introducendo vincoli strutturali sul backbone del monomero di PNA, si possa andare a ridurre la perdita di entropia correlata al processo di appaiamento tra PNA e acidi nucleici naturali. Infatti, la libertà conformazionale degli aeg-PNA comporta un grado di entropia relativamente alto, che si riduce durante l'appaiamento, poiché i legami deboli di tipo Watson-Crick e Hoostgeen bloccano il PNA in una conformazione definita. La perdita di entropia va, ovviamente, a diminuire l'energia libera dovuta all'appaiamento, riducendo la stabilità dei complessi. Introdurre vincoli strutturali sui monomeri permetterebbe di ottenere oligomeri di PNA pre-conformati in grado di appaiare con perdita di entropia minima e dunque in grado di formare complessi più stabili, dotati di proprietà biologiche superiori. Nel presente lavoro di tesi si è deciso di iniziare ad esplorare la possibilità di sintetizzare dei monomeri di PNA costruiti intorno ad un nucleo β -lattamico come vincolo strutturale, ottenendo strutture a libertà conformazionale ridotta, utilizzabili per produrre oligomeri potenzialmente più efficaci.

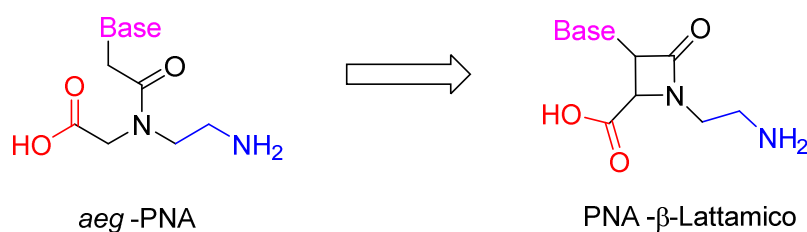
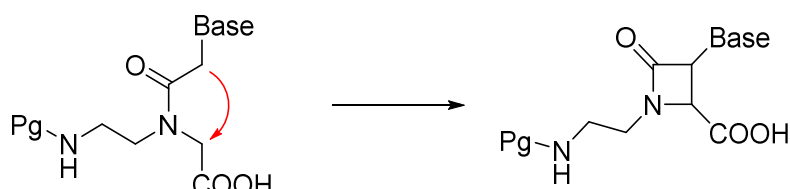


Figura 2. 1: Differenze ed affinità strutturali tra aeg - PNA e PNA dotati di anello β - lattamico

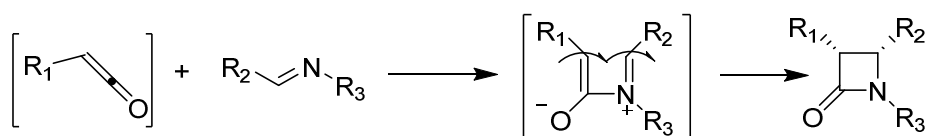
3. Risultati e discussione

Come detto in precedenza, si è optato per la sintesi di PNA contenenti anelli β -lattamici al fine di ottenere strutture a libertà conformazionale ridotta, che possano influenzare i processi di appaiamento degli oligomeri con gli acidi nucleici naturali. Si può immaginare questo tipo di struttura come idealmente ottenuta dal legame tra i metileni in α alla nucleobase e la funzione acida come mostrato in figura [schema 3.1].



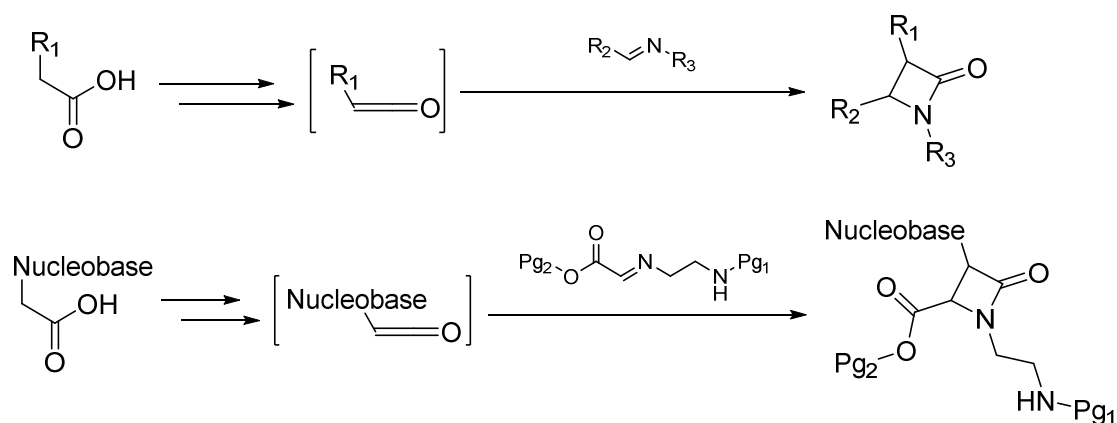
Schema 3. 1: Modifica strutturale di aeg-PNA per ottenere un PNA- β -Lattamico

Tra i vari metodi di sintesi dell'anello β -lattamico, la reazione di Staudinger, una cicloaddizione [2+2] che avviene tra un chetene ed una immina [schema 3.2], è considerata uno dei metodi più efficaci. Questa reazione permette una sintesi stereospecifica che, a seconda delle condizioni di reazione, può fornire *cis*- β -lattami.⁶⁸



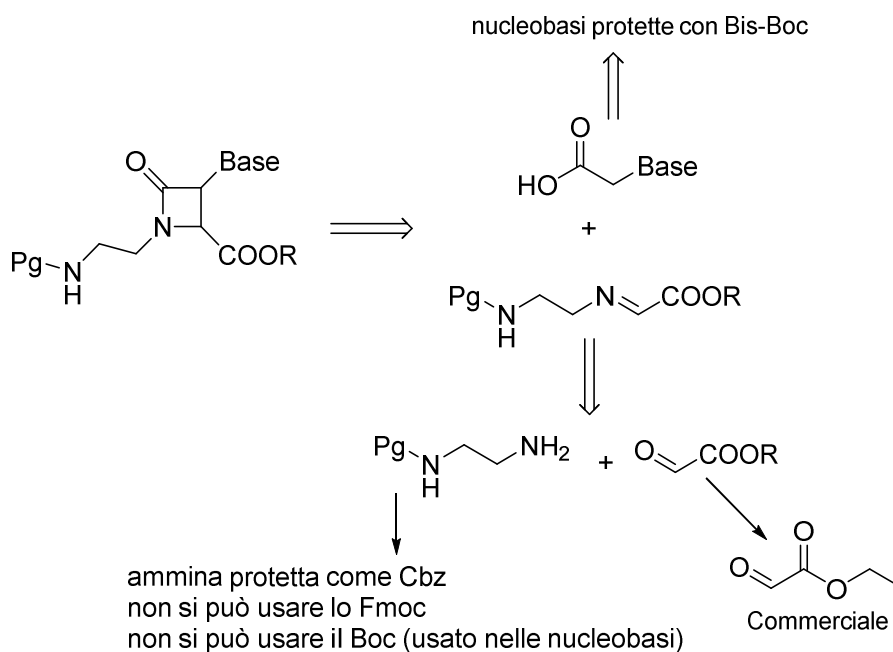
Schema 3. 2: Meccanismo della reazione di Staudinger

Il chetene coinvolto nella reazione viene ottenuto *in situ* per reazione di un derivato attivato di un acido carbossilico (solitamente un cloruro) e trietilammina. Nel caso dei PNA lattamici questa funzione sarebbe svolta dal gruppo carbossilico della nucleobase funzionalizzata [schema 3.3].



Schema 3. 3: Confronto tra la reazione di Staudinger generica e la reazione specifica per ottenere un PNA

Dall'analisi retrosintetica [schema 3.4] si può vedere che in questo caso specifico, il gruppo carbossilico coinvolto è quello del derivato della nucleobase, opportunamente protetta nelle funzioni amminiche esocicliche, ed alchilata rispettivamente in posizione 1 e 9 per pirimidine e purine.



Schema 3. 4: Analisi retrosintetica di PNA-β-Lattamici

La base di Schiff necessaria è ottenibile a partire dai reagenti etilendiammina ed etilgliossalato, entrambi disponibili commercialmente.

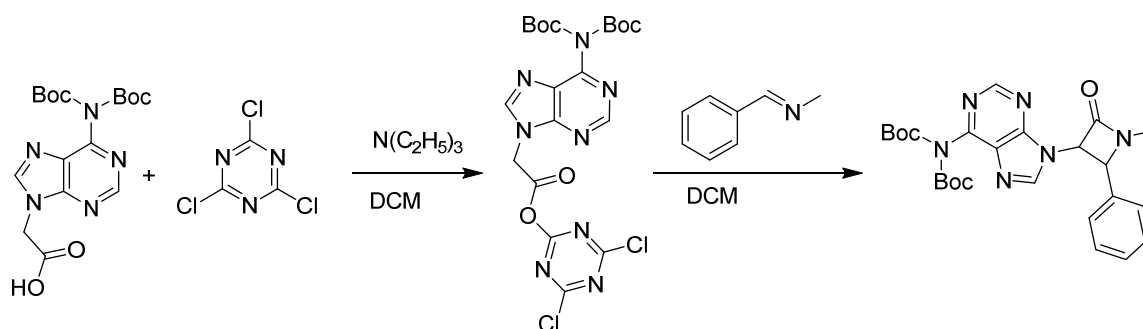
Per quanto riguarda, invece, la scelta dei gruppi protettivi delle funzioni amminiche bisogna tener conto della presenza della funzione amminica sul backbone e delle funzioni amminiche esocicliche nelle nucleobasi. Per quanto riguarda le nucleobasi, la scelta del gruppo protettivo

è ricaduta su un gruppo acido labile quale t-Boc o Bhoc e tale motivazione è legata alla sintesi dell'oligomero di PNA (distacco dal supporto solido e deprotezione delle catene laterali operate in condizioni acide). Per questo motivo la scelta del gruppo protettivo necessario per l'etilendiammina è ricaduto automaticamente sul benzilossicarbonile Cbz in quanto la monoprotezione con Fmoc avrebbe sofferto dell'immediata deprotezione ad opera della funzione amminica rimasta libera.

Per quanto riguarda l'attivazione della funzione carbossilica delle nucleobasi, si è pensato di ricorrere all'uso del cloruro cianurico (TCT) in quanto reagente sicuramente più blando, meno pericoloso ed economico rispetto ai più comuni reagenti cloruranti quali il cloruro di tionile. Inoltre, l'uso di TCT nei processi di sintesi che coinvolgono l'attivazione di una funzione carbossilica è ampiamente documentata in letteratura.⁶⁹ L'attivazione avviene mediante formazione di un estere attivato che, in presenza di trietilammina, porta alla formazione del chetene intermedio, il quale in presenza dell'immina ciclizza a dare l'anello β-lattamico. Il meccanismo di reazione non è ben noto, ma due sono le possibilità proposte: l'estere attivato reagisce con l'immina a formare un intermedio acilimminico in grado di effettuare una reazione di Michael interna e produrre il β-lattame, oppure l'estere genererebbe il chetene in grado di reagire con l'immina a dare cicloaddizione.⁷⁰

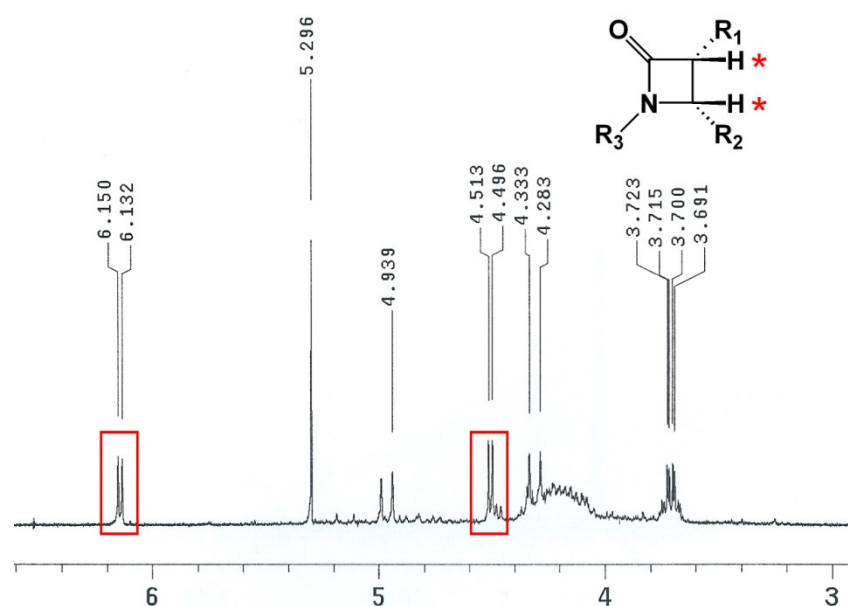
Per quanto riguarda la sintesi del monomero di PNA lattamico, tenuto conto che la reazione coinvolge dei reagenti che vanno sintetizzati *ad hoc* con una determinata richiesta di tempi e costi, si è preferito optare per delle prove preliminari con un sistema "semplificato" di reagenti commerciali che potessero essere sostituiti man mano con i reagenti opportuni. Questo approccio è stato, inoltre, scelto per poter identificare direttamente eventuali problemi di natura pratica/sintetica legati ai reagenti impiegati nella sintesi.

La prima prova è stata effettuata utilizzando l'adenina funzionalizzata e la *N*-benzilidenemetanamina, in quanto l'immina è disponibile commercialmente ed è stabile, quindi conservabile senza problemi di degradazione.



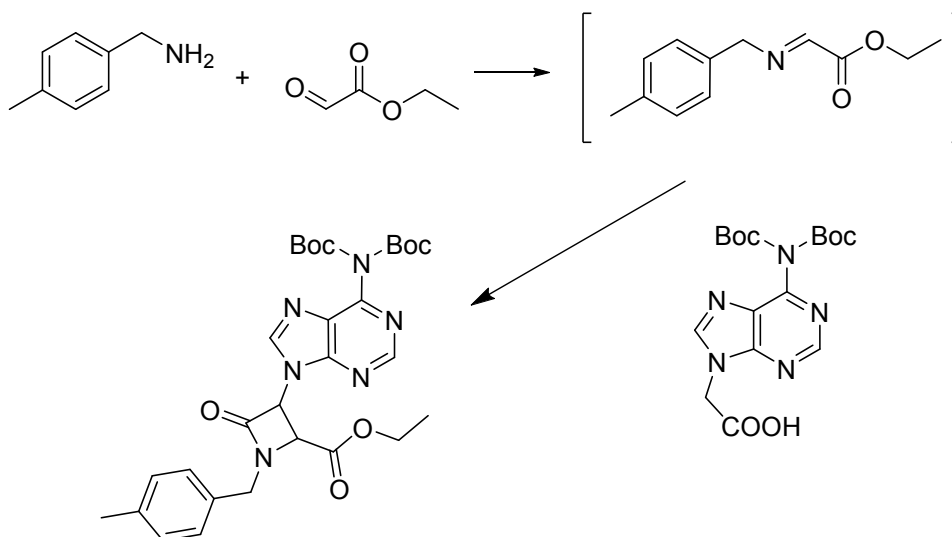
Schema 3. 5: Prova di sintesi con adenina ed immina commerciale

La reazione è stata svolta in due fasi: 1) attivazione dell'acido della nucleobase adenina ; 2) ciclizzazione in presenza dell'immina [schema 3.5]. Essendo una reazione esplorativa, non interessava isolare il prodotto ma era sufficiente identificarlo nel grezzo di reazione. Nel caso di β -lattami, la formazione del ciclo lattamico è facilmente identificabile tramite H-NMR del grezzo di reazione, in quanto si ha la presenza di due doppietti caratteristici e facilmente identificabili. È stato visto che, mediante attivazione dell'adenina con TCT, si ha la formazione del ciclo lattamico.



Schema 3. 6: Particolare dello spettro H^1 -NMR del prodotto: doppietti caratteristici dell'anello β -Lattamico;

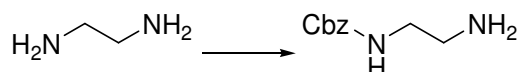
Dato l'esito positivo della prima prova si è tentato di generare l'immina *in situ*, impiegando un'ammina commerciale e l'etilgliossalato, essendo quest'ultimo un sintone necessario per la sintesi del monomero lattamico target.



Schema 3. 7: Prova di sintesi con adenina ed immina generata in situ

In questo caso è stata eseguita una parziale purificazione del grezzo, il quale è stato successivamente controllato mediante NMR evidenziando i segnali di formazione del nucleo lattamico.

Dopo aver verificato la ciclizzazione impiegando TCT, si è reso necessario effettuare la monoprotezione dell'etilendiammina, unico sintone mancante per la sintesi dei monomeri lattamici desiderati.

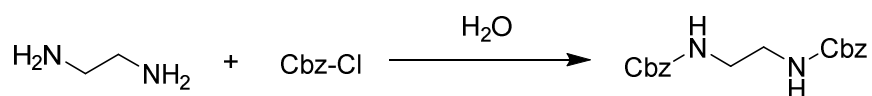


Schema 3. 8: Protezione della etilendiammina

In particolare, sono state effettuate numerose prove, variando diversi parametri coinvolti nel processo, al fine di ottenere esclusivamente il prodotto mono-protetto con una buona resa. I fattori tenuti in considerazione sono stati: solvente, uso di un sistema tamponato e tempi di reazione.

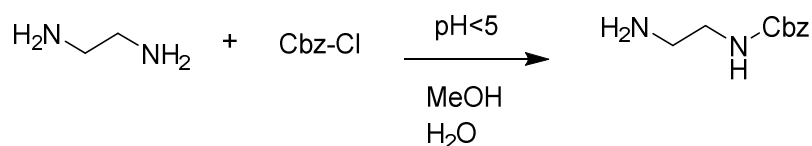
Per quanto riguarda la scelta dei solventi, sono stati tenuti in considerazione DCM, MeOH e H₂O. La scelta di H₂O, come possibile solvente di reazione, ha avuto origine da un esempio riportato in letteratura in cui viene effettuata la protezione di ammine con Fmoc-Cl in ambiente acquoso.⁷¹ La migliore resa della reazione è stata ottenuta impiegando il diclorometano a seguito di un processo di ottimizzazione. Per quanto riguarda gli altri solventi è stato osservato che, nel caso del MeOH, si otteneva un grezzo di reazione che, anche dopo

purificazione, forniva il prodotto analiticamente non puro; mentre dalla reazione in H₂O si otteneva quasi esclusivamente il prodotto di-di-protetto [schema 3.9].



Schema 3. 9: Razione indesiderata di di-protezione della diammina

Facendo riferimento a quanto riportato in letteratura,⁷² sono state effettuate delle prove mantenendo un pH acido compreso tra 4 e 5 mediante l'uso di acido metansolfonico e la base acetato di sodio. Questa prova ha richiesto l'impiego di MeOH come solvente [schema 3.10].

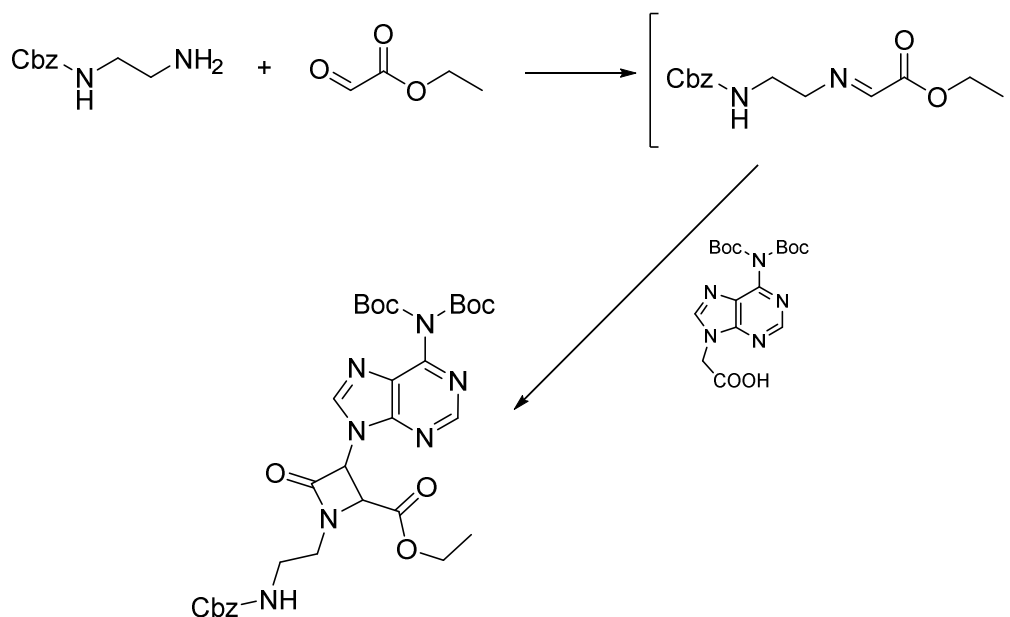


Schema 3. 10: Reazione di protezione della diammina

La reazione funziona ma le rese sono basse, variabili tra il 5 % ed il 22 %. La ragione può risiedere nella difficoltà nel mantenere un pH controllato durante l'arco delle aggiunte dei reagenti.

Dopo un processo di ottimizzazione sia della reazione (effettuata in DCM a 0 °C) che dell'elaborazione, si è giunti al prodotto mono-protetto con buone rese (mediamente pari all'80 %), ottenendo una piccola parte di prodotto di-protetto facilmente separabile.

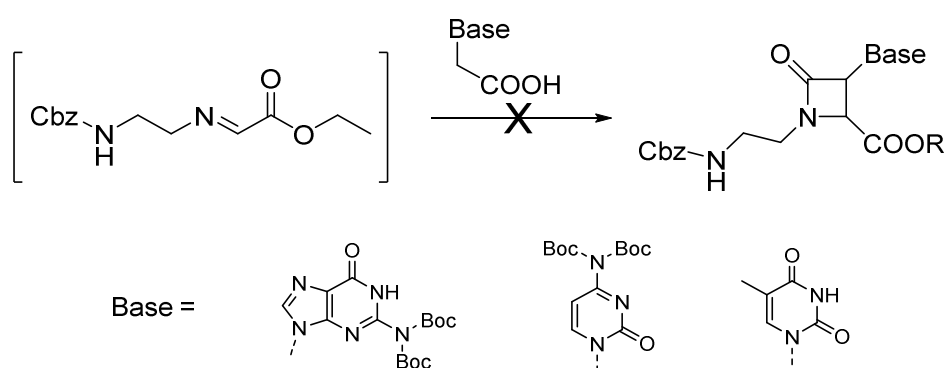
Dopo aver sintetizzato la diammina monoprotetta, si è proceduto al tentativo di sintesi del monomero di PNA su nucleo lattamico basato sull'adenina [schema 3.11].



Schema 3. 11: Reazione di sintesi Adenina PNA- β -Lattamica

La reazione è stata effettuata in DCM impiegando TCT^{73,70} come attivatore dell'acido. Da una prima analisi del grezzo tramite NMR, è stata verificata la ciclizzazione dell'anello lattamico, quindi il prodotto è stato purificato mediante cromatografia ed isolato fornendo una resa del 18 %.

Visto il risultato positivo con l'adenina si è proceduto con le reazioni di sintesi impiegando le rimanenti nucleobasi [schema 3.12].

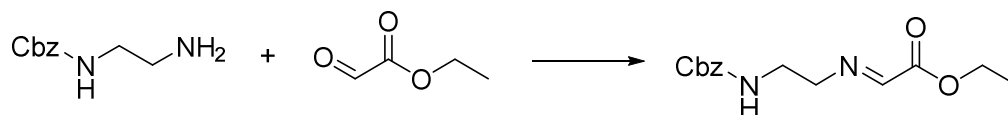


Schema 3. 12: Reazione di sintesi PNA- β -Lattamici

Sfortunatamente, le sintesi dei PNA lattamici non hanno portato ai risultati sperati. La formazione del PNA β -Lattamico desiderato è stata osservata solo con l'adenina.

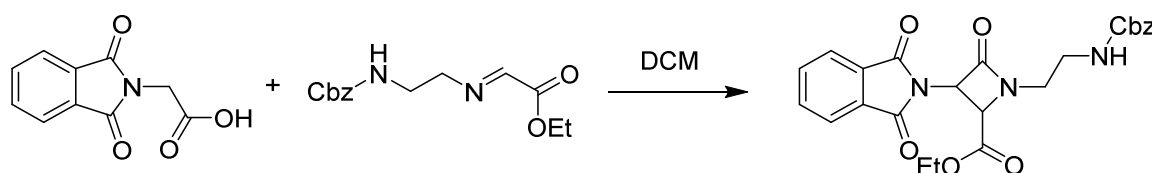
Si è pensato di indagare il processo di formazione dell'immina nell'ipotesi che questa fase della sintesi potesse soffrire di scarsa riproducibilità. L'obiettivo era verificarne la formazione e studiarne la reattività con dei sostituti degli acidi nucleici.

È stato osservato che la sintesi dell'immina è un processo riproducibile, che fornisce il prodotto pressoché puro senza necessità di ulteriore purificazione. Inoltre, il prodotto è isolabile e stabile, e può essere conservato per brevi periodi.



Schema 3. 13: Sintesi dell' immina

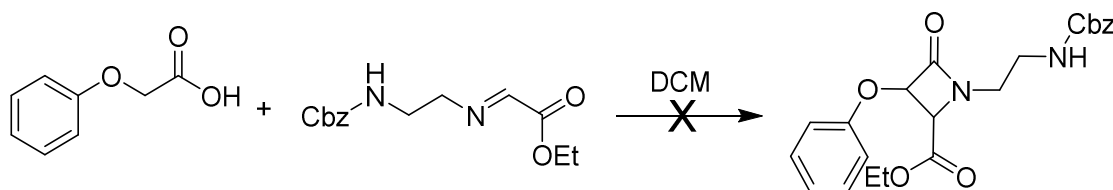
Dopo aver controllato la produzione dell'immina, sono state eseguite le prove di ciclizzazione impiegando degli acidi carbossilici sostitutivi dei derivati delle nucleobasi.



Schema 3. 14: Prova di ciclizzazione con ftaloil glicina (sostituto della nucleobase)

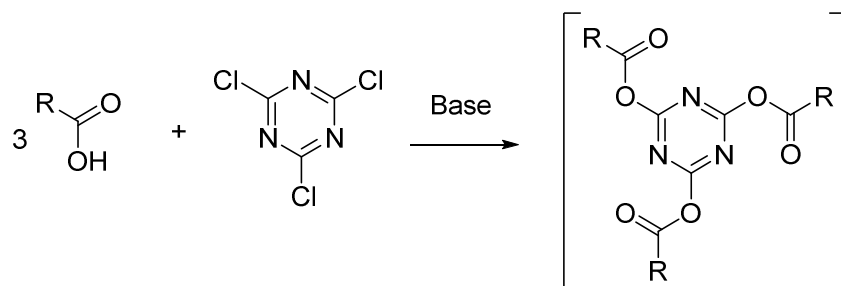
Il primo ad essere impiegato è la ftaloil glicina [schema 3.14], la quale riesce a reagire con l'immina ma con rese molto basse (determinate tramite analisi NMR). Essendo una prova a scopo esplorativo, sono stati identificati i segnali H-NMR caratteristici, ma il prodotto non è stato isolato.

La reazione di ciclizzazione impiegando l'acido fenossiacetico [schema 3.15], al contrario, non ha portato alla formazione del ciclo lattamico desiderato.



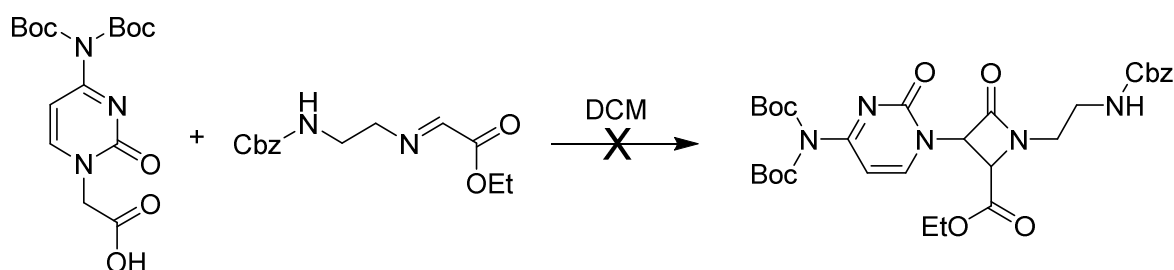
Schema 3. 15: Prova di ciclizzazione con acido fenossiacetico

Si è provato, in seguito, a variare il rapporto stechiometrico tra acido e TCT, impiegando 1 eq. di acido e 1/3 di TCT in modo da formare un “trimero”⁷⁴ [schema 3.16].



Schema 3. 16: Formazione del trimero tricarbossilato cianurico

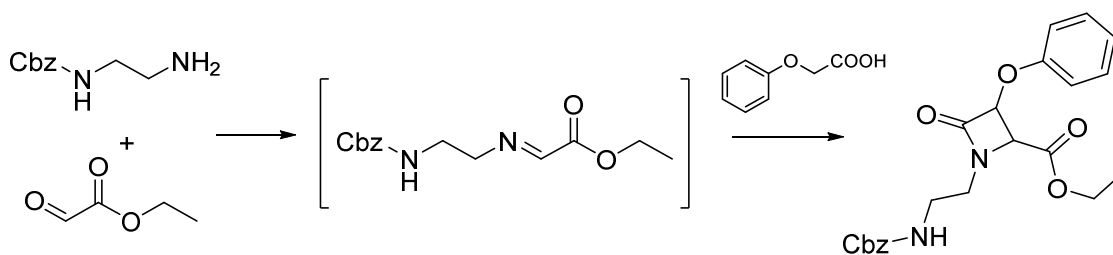
Tuttavia, la sintesi del monomero β -lattamico del derivato citosinico, questa volta impiegando l'immina precedentemente sintetizzata e caratterizzata, ha dato esiti negativi [schema 3.17]. Poichè la soluzione di reazione diventava nera e all’NMR scomparivano i protoni del doppio legame, si può ipotizzare l’insacco di reazioni di polimerizzazione che vadano a coinvolgere tale doppio legame.



Schema 3. 17: Reazione di sintesi Citosina PNA- β -Lattamica

Considerate tali problematiche nella sintesi del monomero, nonostante si fosse certi della produzione dell'immina, si è pensato di indagare vie alternative per l’attivazione del gruppo carbossilico da applicare successivamente alle nucleobasi: a tale scopo è stato deciso di studiare la ciclizzazione a partire da un derivato clorurato.

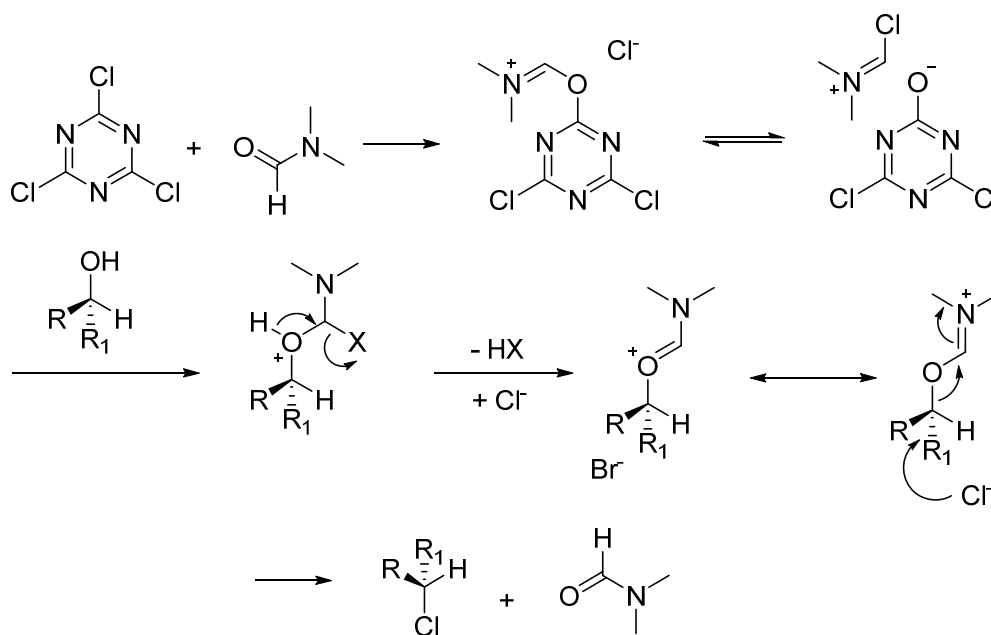
Sono stati impiegati derivati dell’acido fenossiacetico come substrato di riferimento. È stata effettuata una prima reazione esplorativa con il cloruro commerciale sull'immina da noi sintetizzata. L’analisi del grezzo di reazione tramite H-NMR ha mostrato che la reazione procedeva nonostante la stessa operazione condotta impiegando TCT non portasse al risultato sperato.



Schema 3. 18: Prova di ciclizzazione con acido fenossiacetico

Malgrado il risultato positivo, una strada del genere risulta essere poco praticabile, in quanto i metodi di clorurazione solitamente portano all'acidificazione dell'ambiente di reazione, che quindi risulta inadatto a basi nucleiche Boc-protette.

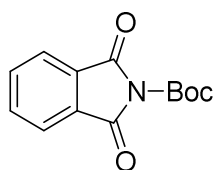
Si è deciso, di conseguenza, di indagare metodi alternativi e più blandi per la sintesi di cloruri acidi. Nel tentativo di effettuare la clorurazione usando reagenti efficienti in condizioni blande, si è pensato di investigare un metodo di clorurazione che utilizzi il complesso formato tra DMF e TCT⁷⁵. Tale metodo è stato impiegato per l'alogenazione di diversi tipi di substrati; il meccanismo comprende la formazione iniziale di un complesso di tipo Vilsmeier-Haack tra il TCT e la DMF, al quale si aggiunge il gruppo ossidrilico dell'alcol per formare una specie cationica. Successivamente, l'attacco nucleofilo dello ione alogenuro produce l'alogenuro alchilico corrispondente. L'attacco nucleofilo è classificabile come S_N2 e nell'eventuale caso di uso di alcol chirali si ha inversione di configurazione [schema 3.19].



Schema 3. 19: Meccanismo di attivazione mediante sistema TCT-DMF

Come acido carbossilico di prova è stato utilizzato l'acido fenossiacetico di cui è disponibile il cloruro in commercio, dunque è possibile controllare la reazione in TLC con uno standard. La reazione di clorurazione funzionava (confermata da TLC) e non sono stati sintetizzati sottoprodotti. L'ambiente diventava comunque acido, quindi si è deciso di limitare il TCT a 1/3 eq rispetto all'acido, in modo sfruttare tutti i clori disponibili sull'anello triazinico. La prova di clorurazione è stata condotta anche in questo caso impiegando l'acido fenossiacetico: si è osservata la formazione del prodotto pulito senza sottoprodotti.

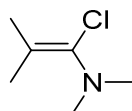
Per testare la resistenza del gruppo Boc alle condizioni di reazione del sistema TCT-DMF, la Boc-Ftalimmide è stata sottoposta a tali condizioni: il gruppo protettore rimaneva intatto e l'ammina protetta. Confortati da questo risultato, si è proceduto ad effettuare la reazione di clorurazione sulla N-Boc-prolina e successivamente sul derivato della citosina. Si è scelto di testare nell'ambiente di reazione la N-Boc-prolina [schema 3.20], una molecola ammino-Boc-protetta che, dunque, potesse rappresentare adeguatamente la reattività delle basi Boc-protette.



Schema 3. 20: Boc-Ftalimmide

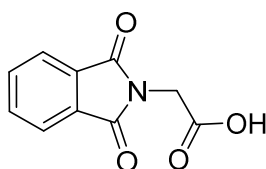
È stato osservato sperimentalmente che la reazione di clorurazione in queste condizioni non porta al prodotto desiderato in entrambi i casi.

Si è deciso, quindi, di cambiare il sistema clorurante, impiegando il reagente di Ghosez [schema 3.21].



Schema 3. 21: Reagente di Ghosez

L'efficacia di questo reagente è stata testata dapprima sulla ftaloilglicina [schema 3.22] e, anche in questo caso, sul derivato della citosina in un secondo momento.

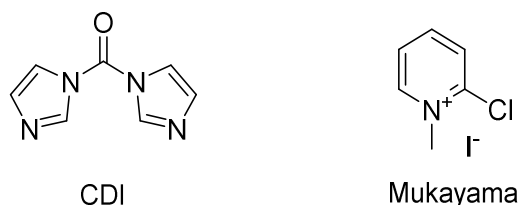


Schema 3. 22: Ftaloilglicina

La clorurazione della ftaloilglicina funzionava anche se l'analisi NMR mostrava ancora la presenza dell'acido di partenza. La clorurazione del derivato citosinico tramite reagente di Ghosez, come per i sistemi cloruranti precedenti, non ha portato alla formazione del prodotto atteso.

Come ultima prova di clorurazione è stato esaminato il classico sistema con SOCl_2 . Per evitare un abbassamento troppo elevato del pH, le prove di clorurazione sono state effettuate in ambiente tamponato. Anche in questo caso, il reattivo clorurante è stato testato dapprima su ftaloilglicina e successivamente sul derivato citosinico. Nel caso della ftaloilglicina la reazione funzionava mentre la clorurazione del derivato citosinico portava alla formazione di diversi sottoprodotti.

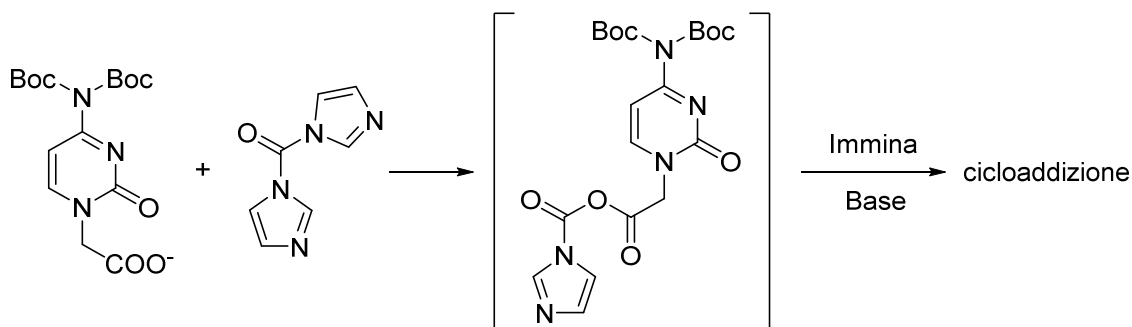
Abbandonata la via dell'attivazione come cloruro, sono stati presi in considerazione altri attivatori, quali il carbonildiimidazolo (CDI) ed il reattivo di Mukaiyama [schema 3.23].



Schema 3. 23: Attivatori alternativi; carbonildiimidazolo (sinistra), reattivo di Mukaiyama (destra)

La scelta di testare diversi attivatori deriva dall'osservazione che la reattività della specie attivata prima, come del chetene poi, risulta difficilmente prevedibile, dipendendo fortemente dalla struttura dell'acido di partenza.

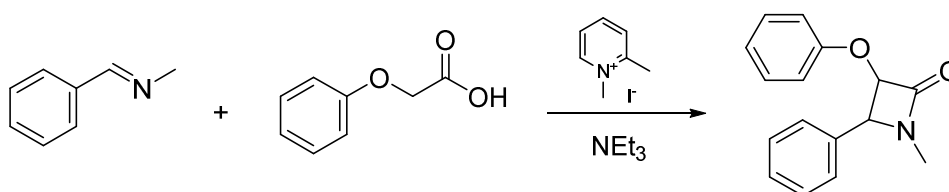
L'attivazione tramite carbonildiimidazolo viene eseguita per reazione tra il carbossilato del derivato citosinico e l'attivatore [schema 3.24].



Schema 3. 24: Sintesi di β -Lattame con CDI come attivatore

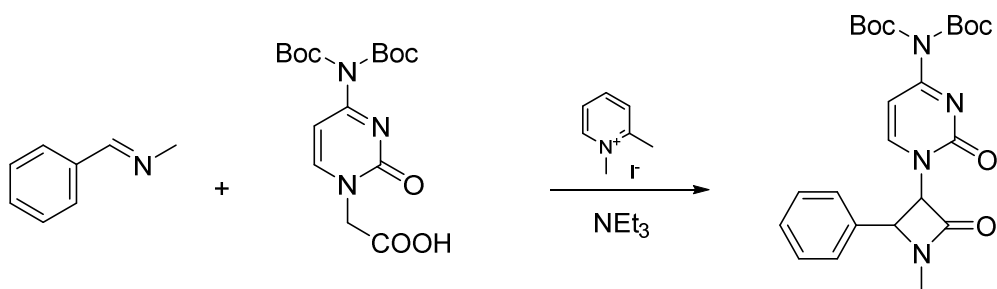
La reazione è stata monitorata tramite TLC e la forma attivata non è stata isolata ma impiegata direttamente per la fase di ciclizzazione. Il monitoraggio del processo ha mostrato che l'attivazione non è un processo istantaneo; tuttavia, si è contemporaneamente osservato che il processo non può essere protratto per più di 5 ore, in quanto si ha la formazione di sottoprodotti (osservati tramite TLC). Dopo 5 ore di attivazione, sono state aggiunte l'immina e la base per effettuare la ciclizzazione del lattame. Anche in questo caso, si è visto che la reazione non ha portato alla formazione del ciclo lattamico.

L'uso del reattivo di Mukaiyama⁷⁶ è stato effettuato inizialmente con substrati commerciali per identificare eventuali problematiche legate alla reazione. Per questo motivo è stata fatta una prima prova esplorativa con l'acido fenossiacetico e *N*-benzilidenemetanamina [schema 3.25].



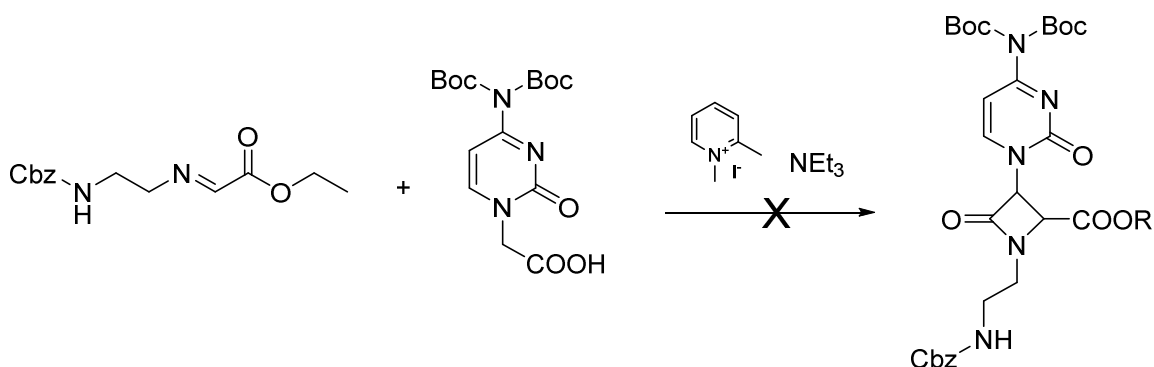
Schema 3. 25: Sintesi di β -Lattame mediante reattivo di Mukayama

Lo scopo della prova era verificare la formazione dell'anello lattamico; l'esito della reazione è stato positivamente valutato tramite controllo NMR del grezzo di reazione. Lo step successivo è stata la sostituzione dell'acido fenossiacetico con il derivato della citosina.



Schema 3. 26: Sintesi di β -Lattame mediante reattivo di Mukaiyama e citosina

In questo caso è stata osservata la formazione del ciclo lattamico (analisi del grezzo di reazione tramite NMR). Incoraggiati da questo risultato, è stata effettuata la sintesi impiegando il derivato citosinico e l'immina preparata per la formazione del monomero lattamico:

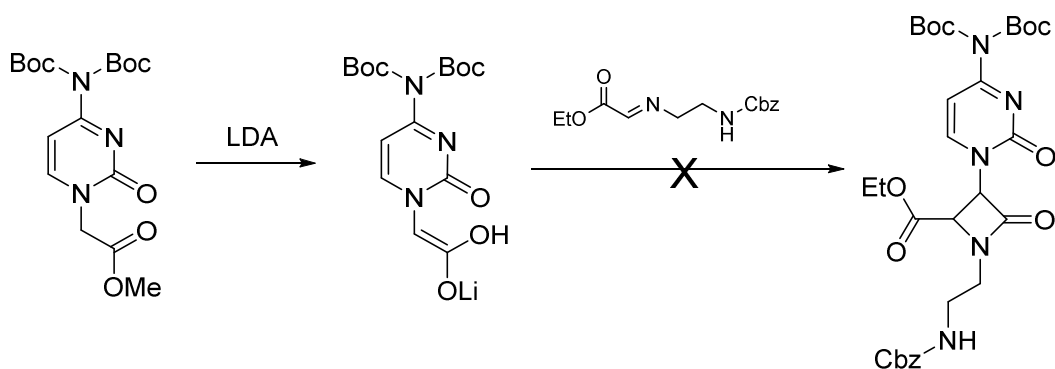


Schema 3. 27 : Sintesi di PNA- β -Lattamico mediante reattivo di Mukaiyama e citosina

Sfortunatamente non è avvenuta alcuna reazione tra i reagenti. Questo è stato osservato inizialmente tramite TLC e ha avuto conferma tramite analisi NMR dei grezzi di reazione. Per questo motivo la reazione è stata ripetuta variando i tempi (da overnight fino a 48 h) e le temperature della reazione (da 0 °C fino a 70 °C mediante irraggiamento tramite microonde in vials chiusi). In nessun caso la reazione ha portato alla formazione del prodotto desiderato.

E' stata brevemente indagata una via sintetica alternativa che impiega la citosina protetta ed alchilata, diversamente dai metodi di attivazione precedenti, come metilestere in presenza di una base forte. La sintesi del derivato citosinico segue la sintesi del derivato alchilato come acido carbossilico, interrotta, però, prima dell'idrolisi del metilestere a dare l'acido libero.⁷⁷

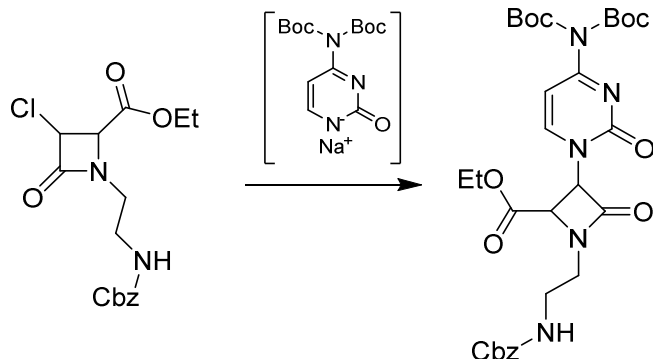
La base impiegata è la litiodiisopropilammide (LDA), sintetizzata *in situ* a partire da BuLi e diisopropilammia. Anche in questo caso non è stata osservata la formazione del prodotto desiderato [schema 3.28].



Schema 3. 28: Sintesi di PNA- β -Lattamico mediante LDA e citosina

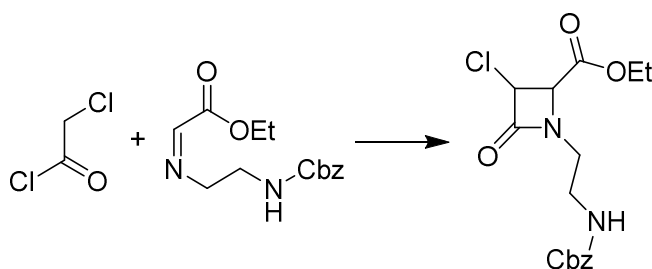
Considerato che l'approccio mediante attivazione del gruppo carbossilico ha funzionato solo nel caso dell'adenina, si è pensato di valutare una via sintetica radicalmente diversa rispetto alla precedente.

In particolare, si è deciso di sintetizzare un ciclo lattamico con un cloro in posizione 3 in modo che questo venga poi sostituito da un opportuno derivato della citosina (protetta solo all'azoto esociclico) [schema 3.29].



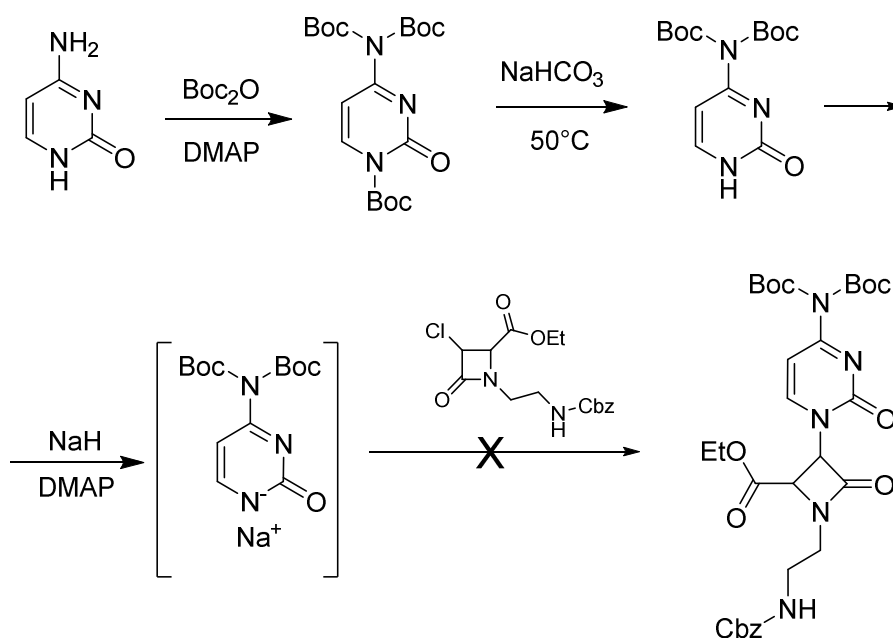
Schema 3. 29: Alchilazione dell'anello Cloro- β -Lattamico con citosina funzionalizzata

La sintesi dell'anello beta lattamico è stata eseguita a partire dall'immina preparata in precedenza e dal cloroacetilcloruro [schema 3.30].



Schema 3. 30: Sintesi dell'anello Cloro- β -Lattamico

Per la sintesi del derivato citosinico è stato seguito il protocollo impiegato per la produzione della citosina protetta ed alchilata⁷⁷ impiegando, però, il lattame clorurato per effettuare l'alchilazione della nucleobase [schema 3.31].

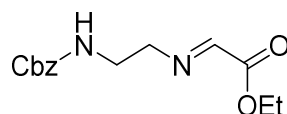


Schema 3. 31: Sintesi della citosina PNA- β -Lattamica

Nelle prime prove non è stata osservata alcuna reazione tra i reattivi, di conseguenza il processo è stato riprovato variando la quantità di base (aumentata fino ad impiegare il doppio degli equivalenti), la temperatura (portata a 80 °C) e la base impiegata (Ag_2O). Sfortunatamente, tutte le prove condotte non hanno portato al prodotto desiderato, portando invece alla degradazione del derivato citosinico.

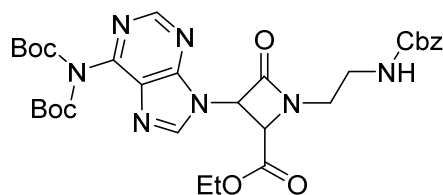
5. Conclusioni

Il tentativo di sintetizzare monomeri di PNA con backbone rigido di tipo β -lattamico si è dimostrato un successo parziale. È stato osservato che la chimica coinvolta nella sintesi di queste strutture non ha un carattere generale, in quanto il metodo che ha portato alla produzione del monomero dell'adenina non ha fornito lo stesso risultato quando applicato ai derivati delle altre nucleobasi. In particolare, la via sintetica intrapresa (ciclo addizione tramite reazione di Staudinger) ha mostrato di soffrire di un'estrema soggettività nell'esito a seconda dei reattivi impiegati, nonostante alcuni fossero chimicamente molto simili tra loro. Da qui la necessità di indagare diverse condizioni di reazione, impiegando differenti specie chimiche, e di investigare gli aspetti legati alla formazione ed alla stabilità degli intermedi di reazione. In particolare, è stata verificata la stabilità dell'immina con risultati soddisfacenti.



Schema 5. 1: Immina

Le principali difficoltà sono state incontrate nella fase di ciclo addizione; per questo motivo, durante lo studio, sono stati adottati diversi approcci per l'attivazione della funzione carbossilica della nucleobase. Il primo approccio seguito è stato l'uso del cloruro cianurico (TCT) per formare un estere attivato precursore del chetene necessario alla ciclizzazione. Considerato che i metodi basati su questo reagente hanno portato alla formazione del monomero solo nel caso dell'adenina, è stata valutata la conversione dell'acido a cloruro.



Schema 5. 2: Adenina-PNA- β -Lattamica

La conversione a cloruro con metodi classici presenta, come inconveniente, l'acidità generata nell'ambiente di reazione, quindi è stato necessario variare le condizioni di reazione e verificare la stabilità dei gruppi Boc delle nucleobasi. Sono stati indagati diversi sistemi cloruranti quali il complesso TCT-DMF, il SOCl_2 ed il reagente di Ghosez. Anche l'utilizzo del cloruro non ha portato ai risultati desiderati: le problematiche ricorrenti sono state riscontrate nella fase di ciclizzazione del nucleo lattamico. Dati gli scarsi risultati ottenuti, si è proseguito nella ricerca di un sistema di attivazione adeguato. A questo scopo sono stati analizzati il reagente di Mukaiyama ed il carbonildiimidazolo senza ottenere, tuttavia, risultati soddisfacenti.

Infine, si è optato per una ridefinizione della via di sintesi. Questa via sintetica considera la ciclizzazione di un opportuno anello β -lattamico con un cloro in posizione 3, suscettibile di sostituzione nucleofila da parte di una base azotata adeguatamente funzionalizzata. Nonostante la formazione del ciclo lattamico precursore, anche in questo caso, non si è giunti alla formazione del prodotto desiderato ma solo di molecole equivalenti ottenute a partire da sintoni più semplici.

Ulteriori studi sono, quindi, necessari per indagare la reattività chimica coinvolta nella sintesi dei monomeri lattamici con le restanti basi azotate.

La sintesi dell'adenina può essere, tuttavia, considerata un successo e potrebbe già essere impiegata nella sintesi di oligomeri misti aeg-PNA/ β -lattame-A-PNA al fine di valutarne le proprietà di appaiamento con gli acidi nucleici naturali.

4. Parte sperimentale

4.1 Materiali e metodi

Gli spettri NMR sono stati registrati a 298 K impiegando lo strumento Varian Mercury Plus VX 400 (^1H , 399.9; ^{13}C , 100.6 MHz). Tutti i valori di chimica shift sono riportati in ppm (scala δ), utilizzando come standard interno tetrametilsilano (TMS) o i segnali residui dei solventi deuterati. Nel riportare gli spettri è stata usata la seguente simbologia:

s = singoletto; **br s** = singoletto allargato; **d** = doppietto; **dd** = doppietto di doppietti; **t** = tripletto; **q** = quadrupletto; **m** = multipletto complesso.

I reagenti sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich e dalla Romil e sono stati impiegati senza ulteriori purificazioni.

Tutti i solventi utilizzati hanno un titolo di purezza chimica maggiore del 98%. Ove necessario sono stati ulteriormente purificati secondo metodi standard.⁷⁸ Le reazioni sono state controllate tramite TLC su lastre di vetro stratificate con silice Merck Kieselgels 60 F₂₅₄, visualizzate tramite lampada UV (254 nm).

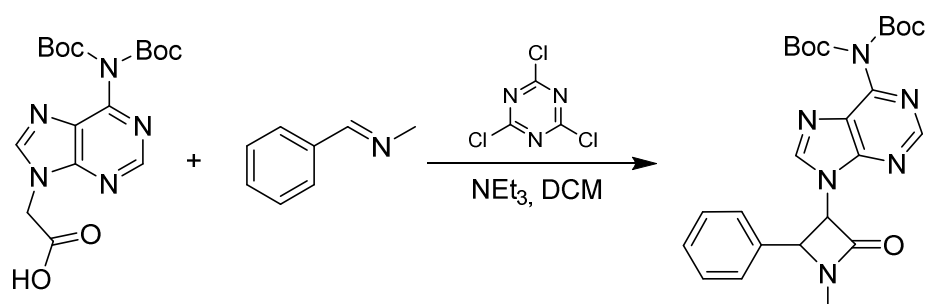
Per la purificazione dei prodotti è stata utilizzata la silice MACHEREY-NAGEL Silica gel 60 M 0,04-0,063 mm.

Per le reazioni al microonde è stato utilizzato un self tuning “*single mode CEM DiscoverTM Focused Syntesizer*”. Lo strumento irradia in maniera focalizzata, con una potenza massima di 300W. Esso possiede inoltre un sistema di rilevamento della temperatura e della pressione (in caso vengano condotte reazioni in *vial* chiuso) ed un sistema di raffreddamento ad aria compressa. La gestione avviene interamente via software. Comprende una gestione della potenza emessa che può avere valore fisso o essere modulata nel tempo dallo strumento in funzione dei valori di temperatura e pressione impostati dall'utente.

La sintesi dei derivati delle nucleobasi (bis-Boc protezione delle funzioni amminiche esocicliche e alchilazione rispettivamente in N1 ed N9 per citosina/timina e adenina/guanina) è stato effettuato secondo quanto riportato in “A Practical and Efficient Approach to PNA Monomers Compatible with Fmoc-Mediated Solid-Phase Synthesis Protocols”.⁷

4.2 Metodiche

4.2.1 Sintesi del nucleo β -lattamico con TCT e base di Shiff commerciale⁷⁰



Procedura

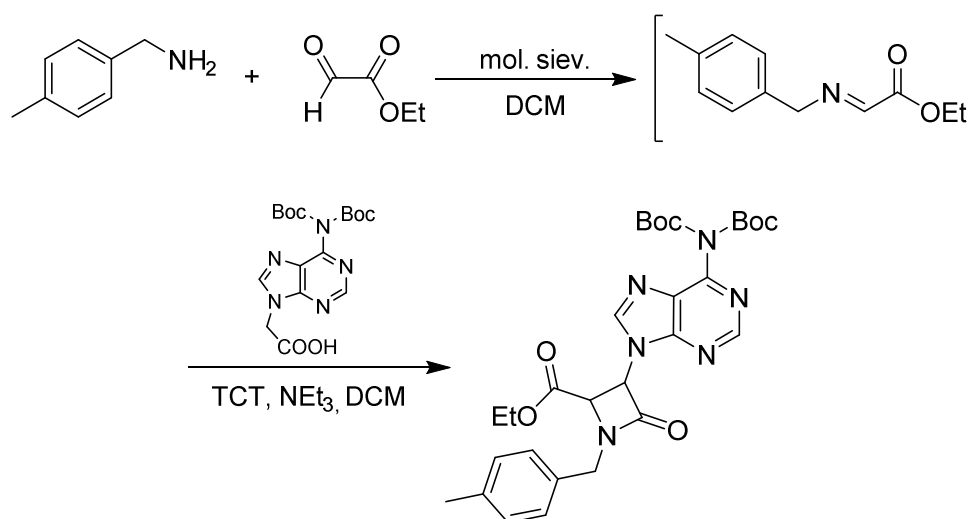
Una sospensione di triclorotriazina (0,184 g, 1 mmol) in DCM anidro (3 ml) è aggiunta goccia a goccia, nell'arco di 30 min, ad una soluzione composta da *N*-benzilenemetanimmina (0,52 ml, 4 mmol), adenina funzionalizzata (0,393 g, 1 mmol) e trietilammina (0,56 ml, 4 mmol) in DCM anidro (20 ml) a 0 °C, il tutto sotto agitazione in atmosfera d'azoto. La miscela è tenuta in agitazione overnight, lavata con acqua (10 mL), $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ al 5% (15 mL), brine (3 x 10 mL) e anidrificata su magnesio solfato. Si evapora il solvente e il grezzo di reazione viene analizzato tramite NMR.

Resa: *il grezzo di reazione viene analizzato tramite NMR ma il prodotto non viene isolato*

Caratterizzazione: *(segnali caratteristici anello β -lattamico)*

¹H-NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 5.91 (d, 1H, $J= 5.2$ Hz), 5.29 (d, 1H, $J= 5.3$ Hz)

4.2.2 Sintesi del nucleo β -lattamico con TCT e base di Schiff generata in situ⁷³



Procedura

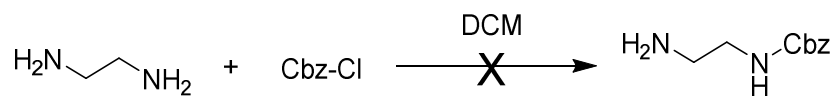
Ad una soluzione, raffreddata a 0 °C, di etilgliossalato idrato (0.87 mL di soluz. in toluene al 50%, 4.4 mmol) in DCM (9 mL) vengono aggiunti 0.5 g di setacci molecolari, e, goccia a goccia, la *p*-tolilmetanammia (0.51 mL, 4 mmol) nell'arco di dieci minuti. La soluzione è lasciata in agitazione a 0 °C per 1 h, filtrata su celite e i solventi evaporati. Il composto ottenuto non è stato caratterizzato ma impiegato direttamente nella fase successiva, quindi disciolto in DCM anidro (20 ml) a 0° C, in atmosfera d'azoto con adenina funzionalizzata (0.393 g, 1 mmol) e trietilammia (0.56 ml, 4 mmol). Alla soluzione è stata aggiunta goccia a goccia una sospensione di triclorotriazina (0.184 g, 1 mmol) in DCM anidro (3 ml) nell'arco di 30 min. La miscela è stata mantenuta sotto agitazione overnight, lavata con acqua (10 mL), NaHCO_{3aq} al 5% (15 mL), brine (3 x 10 mL), anidrificata su magnesio solfato e il solvente evaporato.

Resa: *il grezzo di reazione viene analizzato tramite NMR ma il prodotto non viene isolato*

Caratterizzazione: *(segnali caratteristici anello β -lattamico)*

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 6.10 (d, 1H, *J*= 5.4 Hz), 4.46 (d, 1H, *J*= 5.4Hz)

4.2.3 Prove di protezione etilendiammina con Cbz-Cl in DCM



Procedura:

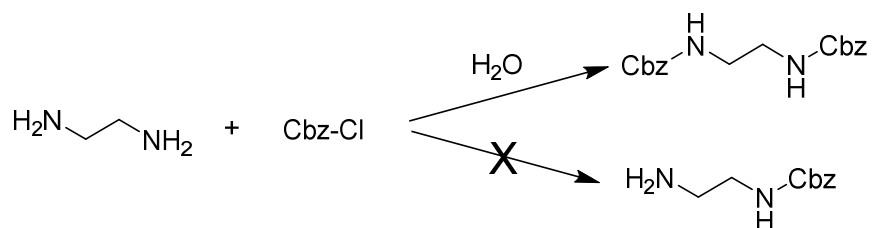
Si fa gocciolare lentamente una soluzione di Cbz-Cl (2.51 ml, 0.018 mol) in DCM (10 mL) in una soluzione di diammina (11.8 mL, 0.176 mol) a 0 °C sotto vigorosa agitazione. Si mantiene il sistema a 0 °C per un'altra ora e successivamente a t. a. overnight. Si evapora il solvente e buona parte di ammina in eccesso. Il residuo viene sciolto in Et₂O e lavato con H₂O (2 x 10 ml). La fase organica viene estratta con HCl 1N (2 x 10 ml). La fase acquosa acida viene basificata a pH 8 con Na₂CO₃ solido ed estratta con Et₂O. Le fasi organiche riunite vengono anidrificate ed il solvente evaporato.

Resa: *non viene ottenuto il prodotto desiderato.*

Caratterizzazione

N. D.

4.2.4 Protezione etilendiammina con Cbz-Cl in H₂O



Procedura:

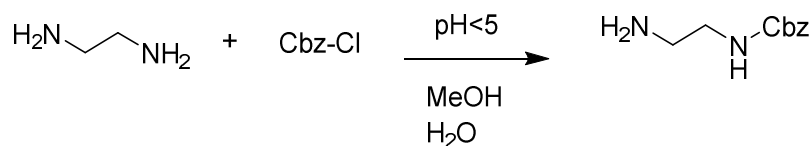
Alla soluzione di ammina (0.22 mL, 3.22 mmol) in H₂O a 0 °C viene aggiunta goccia a goccia, nell'arco di 30 min il Cbz-Cl (0.43 mL, 2.93 mmol) sotto vigorosa agitazione. La reazione viene lasciata a t.a. Si ha la formazione di un precipitato bianco che a fine reazione (determinata tramite scomparsa del Cbz-Cl in TLC) viene separato per filtrazione e caratterizzato per NMR, mostrando la formazione quasi quantitativa del prodotto di-protetto.

Resa: *non viene ottenuto il prodotto desiderato.*

Caratterizzazione

N. D.

4.2.5 Protezione della etilendiammina con Cbz-Cl a pH controllato⁷⁹



Procedura:

L'etilendiammina (0.45 mL, 6.66 mmol) viene disciolta in H₂O (1.3 mL) contenente verde di bromocresolome indicatore. Si aggiunge lentamente una soluzione di acido metansolfonico (0.79 mL, 12.3 mL) in 1,3 mL di H₂O fino a che non si raggiunge un colore giallo chiaro (pH circa 3.8). La soluzione è diluita con 3.6 mL di etanolo, agitata vigorosamente, e trattata a t.a. a gocce alterne, con una soluzione di Cbz-Cl (0.86 mL, 5.9 mmol) in dimetossietano (1.3 mL) e una soluzione di acetato di sodio (1.28 g) in H₂O (2.56 mL), per mantenere il pH più stabile possibile. terminate le aggiunte, si lascia in agitazione a t.a. per un'ora e le componenti volatili vengono in seguito rimosse a pressione ridotta. Il residuo è lavato con acqua (20 mL) e filtrato. Il filtrato è lavato con toluene (3 x 5 mL), basificato con un eccesso di soluzione di idrossido di sodio ed estratto con toluene. La fase organica viene lavata con brine (10 mL), anidrificata su Na₂SO₄ ed il solvente evaporato.

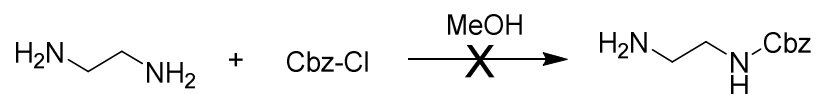
Resa: 22%

Caratterizzazione:

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 7.32 (m, 5H), 5.85 (br s, 1H), 5.02 (s, 2H), 3.17 (m, 2H), 2.73 (m, 2H), 1.69 (s, 2H)

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 156.57, 136.37, 128.21, 128.11, 127.77, 66.26, 43.48, 41.35

4.2.6 Protezione della etilendiammina con Cbz-Cl in MeOH



Procedura:

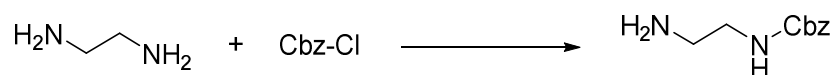
Si prepara una soluzione di diammina (0.29 mL, 5.86 mmol) in MeOH (5 mL) a 0 °C. Si fa gocciolare una soluzione di Cbz-Cl (0.41 mL, 2.93 mmol) in MeOH (50 mL) molto lentamente (2 h e 30 min). Si mantiene il tutto in agitazione per 4 h a 0 °C. Si evapora il solvente al rotavapor. Si estrae il corpo solido con etere (30 mL). Si aggiunge H₂O (20 mL) al solido e si estrae con Et₂O (2 x 20 mL). Gli estratti eteri vengono uniti e lavati con H₂O. La fase organica è anidrificata su Na₂SO₄ e il solvente evaporato.

Resa: *non viene ottenuto il prodotto desiderato.*

Caratterizzazione

N. D.

4.2.7 Protezione della etilendiammina con Cbz-Cl in DCM – elaborazione rivista



Procedura:

Si prepara una soluzione di ammina (1.96 mL, 29.3 mmol) in DCM (2 mL) a 0 °C. Si fa gocciolare una soluzione di Cbz-Cl (0.41 mL, 2.93 mmol) in DCM (50 mL) molto lentamente (2 h e 30 min). La reazione viene fatta tornare lentamente (2 h e 30 min) a t.a. Si evapora il solvente mediante un flussodi azoto mentre si riscalda la reazione a 40 °C. Si estrae il corpo di fondo con Et₂O e si aggiunge acqua che viene estratto con etere (2 x 30 mL). Le frazioni etere sono riunite e lavate (2 x 10 mL) con H₂O. Si estrae il solido dalla fase acquosa con DCM (1 notte in agitazione). Le frazioni organiche riunite sono anidificate e il solvente evaporato.

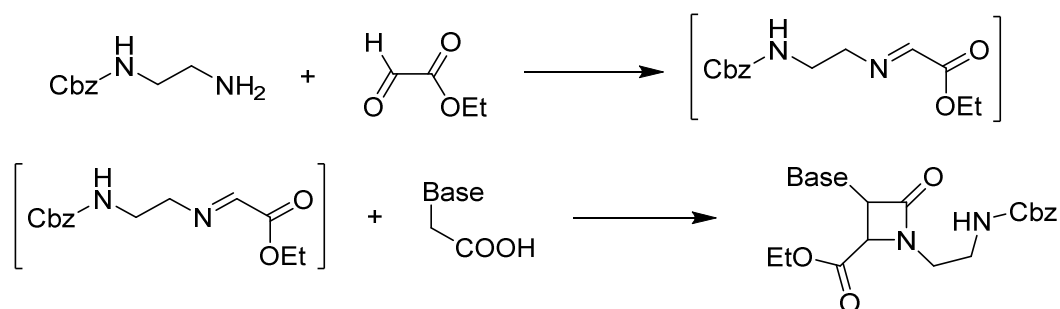
Resa:80%

Caratterizzazione:

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 7.32 (m, 5H), 5.85 (br s, 1H), 5.02 (s, 2H), 3.17 (m, 2H), 2.73 (m, 2H), 1.69 (s, 2H)

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 156.57, 136.37, 128.21, 128.11, 127.77, 66.26, 43.48, 41.35

4.2.8 Ciclizzazione monomeri lattamici^{70,73}

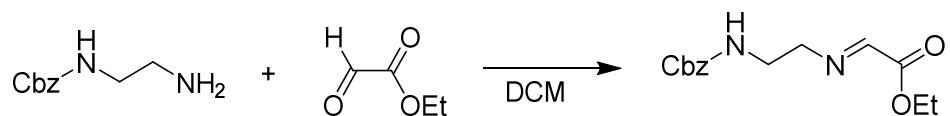


Procedura:

Ad una soluzione di aldeide (0.18 mL, 1 mmol) in DCM (5 mL) a 0 °C vengono aggiunti i setacci molecolari attivati (0.15 g) e una soluzione di ammina (0.194 g, 1 mmol) in DCM (2.5 mL) goccia a goccia. La soluzione viene lasciata sotto agitazione per 3 ore a 0 °C. A fine reazione (TLC), la miscela viene filtrata su celite e il solvente evaporato. Il prodotto ottenuto è disciolto in 20 mL di DCM a 0 °C e si aggiungono la nucleobase protetta (1 mmol) e NEt₃ (0.56 mL, 4 mmol) sotto azoto. Alla soluzione viene aggiunta goccia a goccia una sospensione di TCT (0.184 g, 1 mmol) in DCM (3 mL) e lasciata in agitazione overnight a t.a. Successivamente viene lavata con H₂O, NaHCO₃aq 5%, brine, anidrificata e il solvente viene evaporato. Il prodotto è purificato per cromatografia flash (AcOEt : esano = 2 : 3).

| Nucleobase | Resa | Caratterizzazione |
|------------|--------|--|
| | 18.4 % | ¹ H-NMR (CDCl ₃) δ(ppm): 8.78 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.22 (bs, 5H), 5.82 (d, <i>J</i> = 5.4 Hz, 1H), 4.82 (d, <i>J</i> = 5.2 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 5.03 (s, 2H), 4.12 (q, <i>J</i> = 7.8, 2H), 3.48 (m, 2H), 2.95 (m, 2H), 1.36 (s, 18H), 1.15 (t, <i>J</i> = 8.2, 3H) ¹³ C NMR (CDCl ₃) δ(ppm): 171.82, 167.32, 162.47, 157.03, 155.33, 152.21, 150.03, 143.46, 136.26, 128.36, 127.97, 127.82, 107.41, 83.72, 71.65, 66.56, 62.12, 60.03, 45.24, 40.72, 27.56, 13.93 |
| | 0% | N. D. |
| | 0% | N. D. |
| | 0% | N. D. |

4.2.9 Sintesi dell'immina



Procedura:

Si prepara una soluzione di aldeide (0.10 g, 2 mmol) in DCM (16 mL) a 0 °C in atmosfera di azoto. Si aggiunge MgSO₄ (0.30 g). Si aggiunge goccia a goccia una soluzione di ammina (0.39 g, 2 mmol) in DCM (5 mL). La soluzione viene lasciata sotto agitazione per circa 2 ore, a 0 °C, e controllata per TLC. A fine reazione si filtra tutto su Celite, si evapora il solvente e si controlla all'NMR

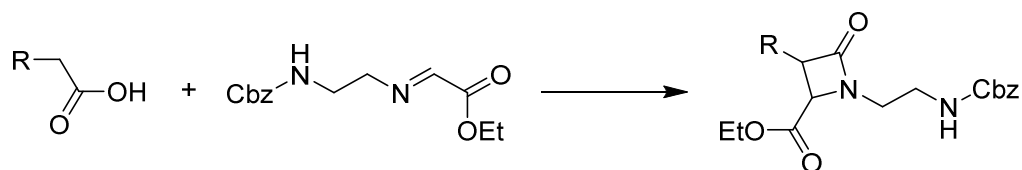
Resa: 60%

Caratterizzazione:

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 7.32 (m, 5H), 5.85 (br s, 1H), 5.02 (s, 2H), 3.17 (m, 2H), 2.73 (m, 2H), 1.69 (s, 2H)

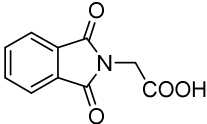
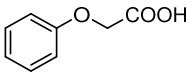
¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 156.57, 136.37, 128.21, 128.11, 127.77, 66.26, 43.48, 41.35

4.2.10 Prove di ciclizzazione del nucleo β -lattamico da acidi carbossilici

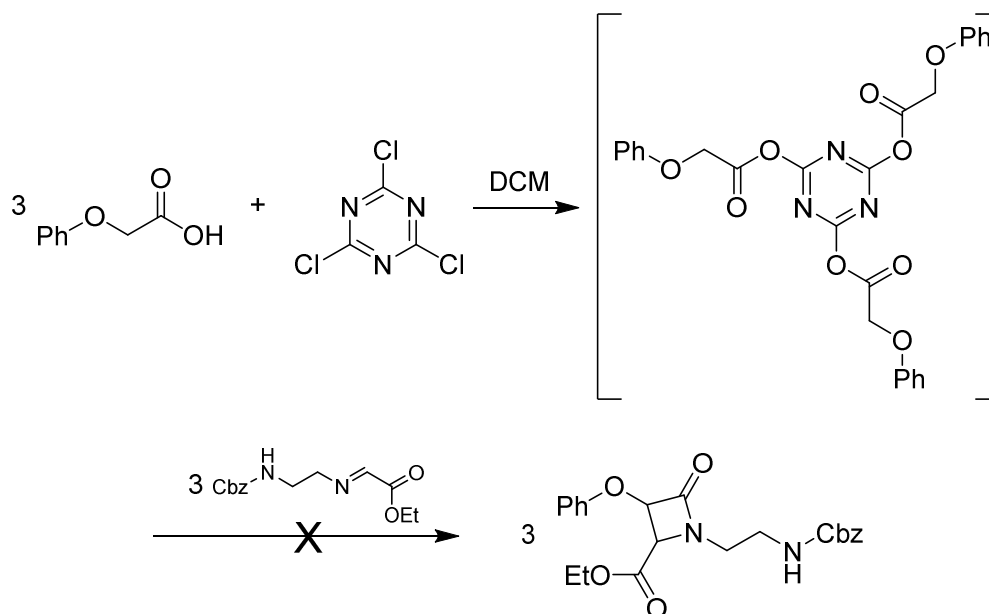


Procedura:

Si prepara una soluzione di immina (1.26 mmol), acido carbossilico (1.26 mmol), NEt_3 (0.7 mL, 5.04 mmol) in DCM (25 mL) a 0 °C sotto atmosfera di azoto. Viene aggiunta goccia a goccia una sospensione di TCT (1.26 mmol) in DCM (4 mL). La soluzione viene lasciata in agitazione overnight a t amb. e successivamente lavata con H_2O (10 mL), NaHCO_3 5% (10 mL), e brine (2 x 10 mL), anidrificata e il solvente viene evaporato. Viene controllato il grezzo per NMR.

| R-COOH | Resa | Caratterizzazione |
|---|--|--|
|  | <5% (stima NMR, il prodotto non viene isolato) | $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ (ppm): 5.53 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz), 4.70 (d, 1H, $J = 5.7$ Hz) |
|  | 0% | N. D. |

4.2.11 Prova di sintesi alternativa con 1/3 TCT



Procedura:

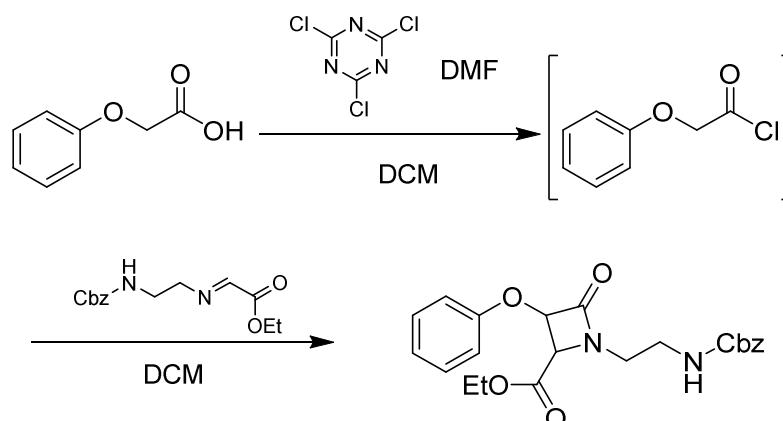
Si prepara una soluzione con acido fenossiacetico (0.152 g, 1 mmol), TCT (0.610 g, 0.333 mmol), NEt₃ (0.14 mL, 1 mmol) in DCM (2mL). La reazione viene irradiata con microonde in vial chiuso (power: 50 W, T 40°C, 10 min). Alla soluzione viene aggiunta l'immina (0.278 g, 1 mmol), DCM (20 mL), NEt₃ (0.42 mL, 3 mmol) e MgSO₄ (0.2 g) a 0 °C e lasciata sotto agitazione overnight. La miscela è stata lavata con acqua (10 mL), NaHCO₃aq al 5% (15 mL), brine (3 x 10 mL) e anidrificata su magnesio solfato. Il solvente è stato evaporato e il grezzo di reazione controllato tramite NMR.

Resa: non viene ottenuto il prodotto desiderato.

Caratterizzazione

N. D.

4.2.12 Ciclizzazione con cloruro generato in situ tramite TCT-DMF



Procedura:

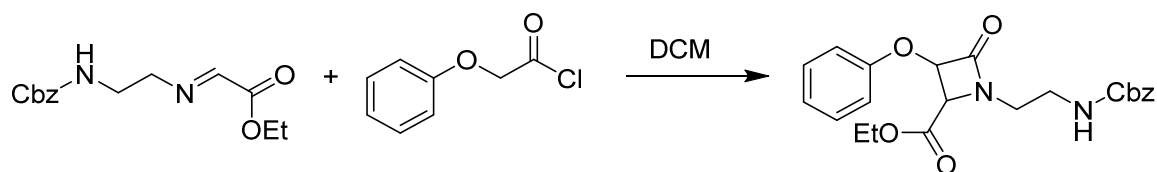
Si prepara la miscela composta da TCT (0.184 g, 1 mmol) e DMF (0.2 mL). Dopo la dissoluzione della TCT e successiva formazione di un solido bianco si aggiunge DCM (20 mL) e si controlla il pH. Si aggiunge NEt₃ (0.420 mL, 3 mmol) e dopo 5 minuti si verifica che il pH sia basico. Si aggiunge l'acido fenossiacetico (0.152 g, 1 mmol). Dopo 15 min si aggiunge l'immina (0.278 g, 1 mmol) e si lascia reagire overnight. La miscela è stata lavata con acqua (10 mL), NaHCO_{3aq} al 5% (15 mL), brine (3 x 10 mL) e anidrificata su magnesio solfato. Il solvente è stato evaporato e il grezzo di reazione controllato tramite NMR.

Resa: non viene ottenuto il prodotto desiderato.

Caratterizzazione

N. D.

4.2.13 Ciclizzazione del nucleo β -lattamico da cloruro acilici.



Procedura:

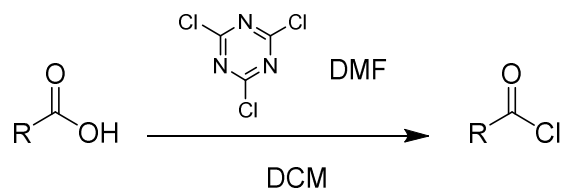
Si prepara una soluzione di immina (0.245 g, 0.880 mmol), PhOCH₂COCl (0.12 mL, 0.87 mmol), NEt₃ (0.5 mL, 4 mmol) in DCM (21 mL) a 0°C sotto atmosfera di azoto. La soluzione viene lasciata in agitazione overnight a t.a. e successivamente lavata con H₂O (10 mL), NaHCO₃ 5% (10 mL), e brine (2 x 10 mL), anidrificata e il solvente viene evaporato. Viene controllato il grezzo per NMR.

Resa: *il grezzo di reazione viene analizzato tramite NMR ma il prodotto non viene isolato*

Caratterizzazione: *(segnali caratteristici anello β -lattamico)*

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 5.14 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.52 (d, J = 4.8 Hz, 1H)

4.2.14 Clorurazione tramite TCT-DMF

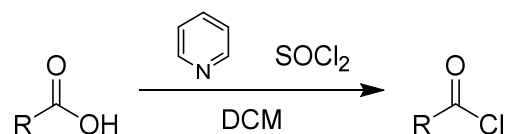


Procedura:

Si prepara una soluzione in DMF (0,2 mL) di TCT (0.184g, 1mmol) a T amb. Dopo la formazione di un solido bianco la reazione viene monitorata in TLC fino a completa scomparsa del TCT. A questo punto si aggiungono 20 mL di DCM, seguiti dall'acido (1 mmol). La soluzione è mantenuta in agitazione a T amb. per 4 h. Si aggiunge acqua 15 mL, la fase organica è lavata con 15 mL di soluzione satura di Na₂CO₃, di HCl 1N e Brine. La fase organica è anidrificata su solfato di sodio e il solvente è evaporato.

| Cloruro | Resa | Caratterizzazione |
|---------|------|---|
| | 82 % | ¹ H-NMR (CDCl ₃) δ (ppm): 7.33 (m, 3H), 7.07 (m, 1H), 6.94 (d, 2H), 4.93 (s, 2H) ¹³ C-NMR (CDCl ₃) δ (ppm): 170.52, 157.034, 129.91, 122.75, 114.90, 72.61 |
| | 0% | N. D. |

4.2.15 Prove di clorurazione con SOCl₂ in ambiente tamponato (Py)

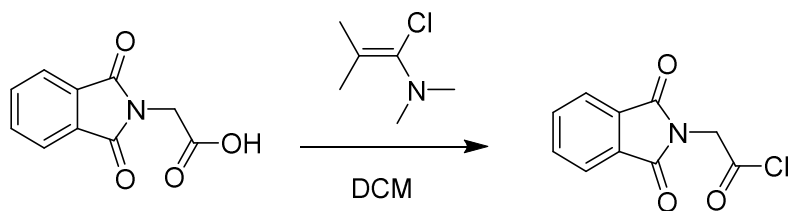


Procedura:

Si prepara una soluzione di acido (1 mmol) e Piridina (0.075g, 1 mmol) in DCM (25 mL) sotto azoto e si porta la T a -30°C. Si aggiunge lentamente SOCl₂ (0.119g, 1 mmol) lasciando in agitazione per 3h a -30°C. Si evapora il solvente. Il composto viene purificato tramite filtrazione su celite.

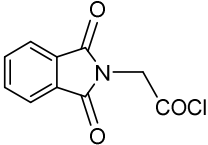
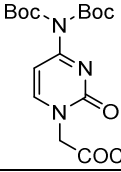
| R-COOH | Resa | Caratterizzazione |
|--------|------|--|
| | 62 % | ¹ H-NMR (CDCl ₃) δ (ppm): 4.33-4.20 (m, 1H), 3.74-3.22 (m, 2H), 2.28-1.82 (m, 4H), 1.36 (s, 9H) ¹³ C-NMR (CDCl ₃) δ (ppm): 168.68, 154.70, 80.59, 71.55, 46.31, 30.25, 28.15, 24.10 |
| | 0% | N. D. |

4.2.16 Prova di clorurazione con reagente di Ghosez⁸⁰

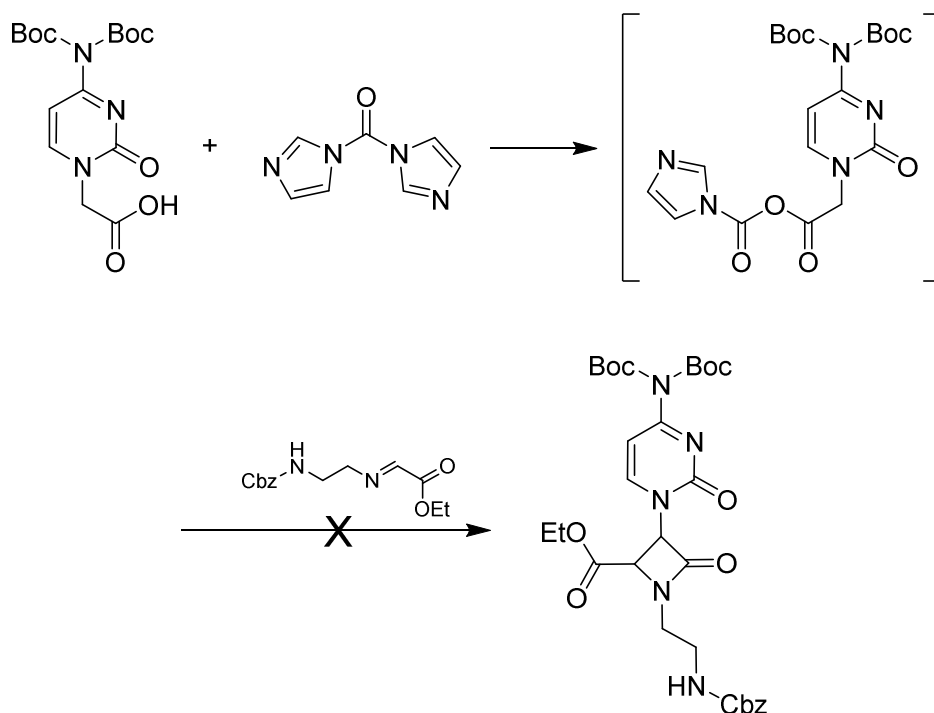


Procedura:

Si prepara una soluzione di ftaloil-glicina (0,881 g, 4.3 mmol) e 1-dimetilammino-1-colo-2-metil-1-propene (0.381 g, 2.86 mmol) in DCM (15 mL) lasciandola in agitazione overnight a t.a. Si elimina il solvente e il prodotto viene isolato tramite filtrazione su celite.

| R-COOH | Resa | Caratterizzazione |
|---|------------|---|
|  | ~50% (NMR) | ¹³ C-NMR (CDCl ₃) δ (ppm): 168.88, 166.12, 134.36, 131.56, 123.45, 47.17 |
|  | 0% | N. D. |

4.2.17 Prova attivazione acido mediante carbonil imidazolo



Procedura:

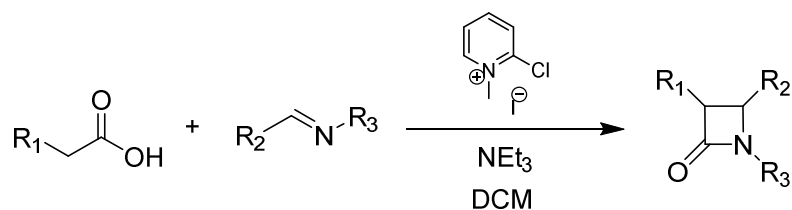
Si prepara una soluzione di derivato citosinico (0.370 g, 1 mmol), carbonildiimidazolo (0.180 g, 1.1 mmol), MgSO₄ in DCM (15 mL), sotto azoto a t.a. La reazione viene lasciata in agitazione per 5 h (controllando per TLC). Viene aggiunta l'immina e la NEt₃ a 0°C per la ciclizzazione ma non si osserva formazione di lattame.

Resa: non viene ottenuto il prodotto desiderato.

Caratterizzazione

N. D.

4.2.18 Prove di ciclizzazione con il reattivo di Mukaiyama⁷⁶

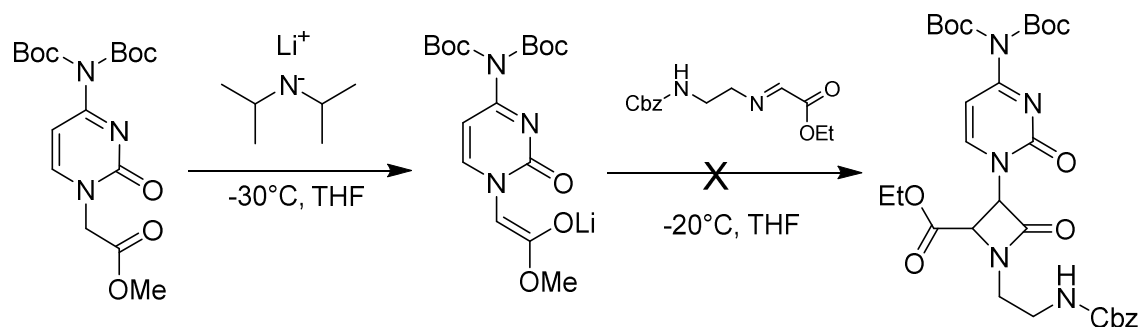


Procedura:

Si prepara una soluzione di acido (1.91 mmol) e reattivo di Mukaiyama (0.515 g, 2.02 mmol) in DCM (5 mL) e MgSO₄ (0.20 g) a 0°C sotto azoto. Si aggiunge NEt₃ (0.64 mL, 4.59 mmol) e l'immina (2.29 mmol). La reazione viene lasciata tornare a temperatura ambiente e fatta reagire alla temperatura indicata in tabella. Successivamente si aggiunge H₂O (5 mL) e si separa la fase organica. Si estrae la fase acquosa con DCM (3 x 30 mL). Gli estratti organici riuniti vengono lavati con 30 mL di brine e anidrificati su Na₂SO₄. L'esito viene valutato tramite analisi NMR.

| Acido | Immina | T | Resa |
|-------|--------|--------------------------|---|
| | | t. a. | <i>Esito valutato per NMR (¹H-NMR (CDCl₃): 5.4 (d, J = 4.2Hz, 1H), 4.9 (d, J = 4.2Hz, 1H)) ma il prodotto non viene isolato</i> |
| | | t. a. | <i>Esito valutato per NMR (¹H-NMR (CDCl₃): 5.86 (d, 1H, J = 4.8Hz), 5.12 (d, 1H, J = 4.8Hz)) ma il prodotto non viene isolato</i> |
| | | t. a. | --- |
| | | riflusso | --- |
| | | 70 °C, 1 h (MW, 11 W) | --- |

4.2.19 Ciclizzazione del derivato citosinico e base forte



Procedura:

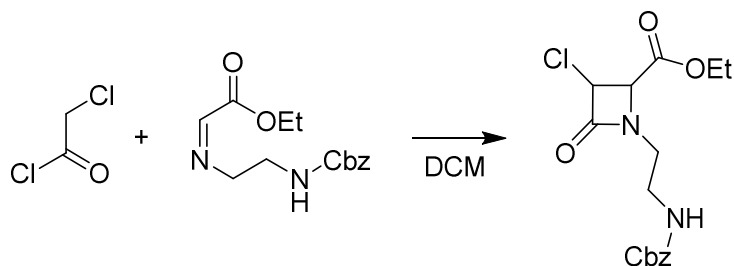
Si prepara una soluzione di diisopropilammina in 3 mL di THF anidro e si porta a -30 °C. Si aggiungono 0,7 mL di soluzione 1,6 M di BuLi (0.711 g, 1.1 mmol) in esano. Dopo Dieci minuti si aggiunge una soluzione di derivato citosinico (0.370 g, 1 mmol) in 3 mL di THF. Dopo dieci minuti si aggiunge l'immina disciolta in THF. Si lascia reagire overnight a -20 °C. A fine reazione si aggiunge Et₂O (20 mL) e si lava con HCl 1N. La fase organica viene anidrificata e tirata a secco.

Resa: non viene ottenuto il prodotto desiderato.

Caratterizzazione

N. D.

4.2.20 Sintesi cloro lattame



Procedura:

Si prepara una soluzione di immina (0.278 g, 1mmol), cloroacetilcloruro (0.114 g, 1mmol), NEt₃ (0.50 mL, 4 mmol) in DCM (20 mL) a 0 °C in atmosfera inerte di azoto. Si lascia in agitazione a T amb. overnight. Si lava con H₂O (10 mL), NaHCO₃aq 5% (10 mL), brine (10 mL). La fase organica viene anidrificata, il solvente svaporato e il composto purificato per cromatografia (AcOEt 4 / Et. di Pet. 6).

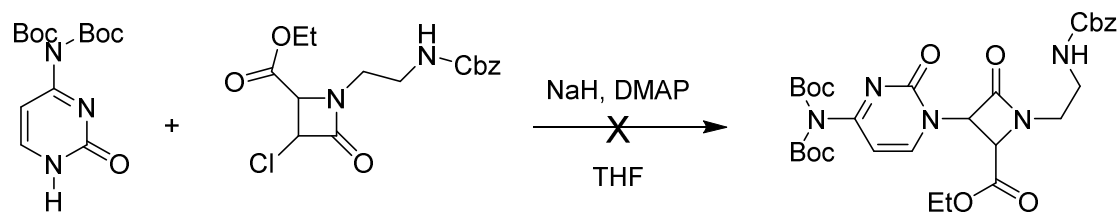
Resa: 15%

Caratterizzazione:

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 7.34 (bs, 5H), 5.63 (bs, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.75 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.57 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.31-4.24 (m, 2H), 3.53-3.20 (m, 4H), 1.32-1.24 (m, 3H)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 167.31, 163.84, 156.67, 136.39, 128.44, 128.05, 127.93, 66.73, 62.11, 58.76, 57.52, 43.03, 38.27, 14.14

4.2.21 Alchilazione citosina con anello lattamico



Procedura:

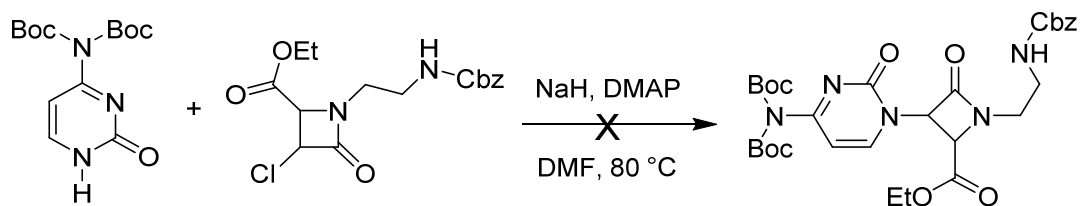
Si aggiunge idruro di sodio (0.008 g, 13.9 mmol) a THF anidro (mL) in un pallone da 50 mL in atmosfera di argon. La miscela di reazione è agitata a 0°C per 20 min. poi si aggiunge una soluzione di bis-Boc citosina (0.096 g, 0.31 mmol) in THF anidro (5 mL). Alla miscela in agitazione è aggiunto goccia a goccia per 15 min il cloro-lattame (100mg, 0,28 mmol) e DMAP (quantità catalitiche). Dopo completa addizione, la miscela di reazione è agitata overnight a T amb.. La reazione viene bloccata aggiungendo H₂O (0.5mL, 27.8 mmol). Il solvente è rimosso e il residuo è dissolto in DCM (500 mL) e lavato in acqua (3x100 mL).

Resa: non viene ottenuto il prodotto desiderato.

Caratterizzazione

N. D.

4.2.2 Alchilazione citosina con anello lattamico in DMF ad alta temperatura



Procedura:

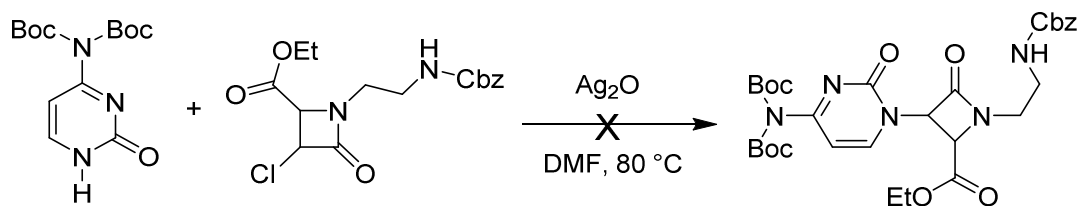
Si miscelano NaH (0.008 g, 13.9 mmol) bis-Boc citosina (0.096 g, 0.31 mmol) in DMF (circa 5 mL). Alla miscela in agitazione è aggiunto goccia a goccia per 15 min il cloro-lattame (100mg, 0,28 mmol) e DMAP (quantità catalitiche). La reazione viene riscaldata a 80°C overnight. Successivamente la soluzione è stata tirata a secco, ripresa in DCM e lavata con NaOH diluito, H₂O, NCl 1N, H₂O. La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ ed evaporata.

Resa: non viene ottenuto il prodotto desiderato.

Caratterizzazione

N. D.

4.2.23 Alchilazione citosina con anello lattamico con Ag₂O



Procedura:

Si aggiunge ossido d'argento (0.232 g, 1.5 mmol) a THF anidro (10 mL) in un pallone da 50 mL in atmosfera di argon. La miscela di reazione è agitata a 0°C per 20 min. poi si aggiunge una soluzione di bis-Boc citosina (0,096 g, 0,31 mmol) in THF anidro (5 mL). Alla miscela in agitazione è aggiunto goccia a goccia per 15 min il cloro lattame (0.100 g, 0.28 mmol) e DMAP (quantità catalitiche). Dopo completa addizione, la miscela di reazione è agitata overnight a 80°C. La reazione viene bloccata aggiungendo H₂O. Il solvente è rimosso, il residuo è disciolto in DCM (50 mL) e lavato in acqua (3 x 10 mL). La soluzione viene anidrificata ed il solvente evaporato.

Resa: non viene ottenuto il prodotto desiderato.

Caratterizzazione

N. D.

6. Bibliografia

1. Nielsen, P. E.; Egholm M.; *Current Issues Molec. Biol.*, **1999**, *1*(2), 89-104
2. Venkatesan, N.; Byeang, H. K.; *Chem. Review*, **2006**, *106*, 3172-3761
3. Leumann, C. J.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 841-854
4. De Clerq, E.; Eckstein, F.; Sternbach, H.; Merigan, T. C.; *Virology*, **1970**, *42*, 421
5. Wengel, J.; *Acc. Chem. Res.*, **1999**, *32*, 301
6. Manoharan, M.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1489*, 117
7. Summerton, J.E.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1489*, 141
8. Madigan, M. T.; Martinko J. M.; *Brock biologia dei microrganismi*, **2011**, Casa editrice ambrosiana
9. Mahato, R. I.; Cheng, K.; Guntaka, R. V.; *Expert Opinion on Drug Delivery*, **2005**, *2*, 3-28
10. a) Vadim, V.; Demidov; Frank-Kamenetski, M. D.; *Methods*, **2001**, *23*, 108; b) Kuhn H.; Demidov, V.V.; Nielsen P. E.; Frank-Kamenetski M. D.; *Journal Molecular Biology*, **1999**, *286*, 1337
11. Kumar, V. A.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 2021-2032.
12. Nielsen, P. E.; *Current Opinion in Biotechnology*, **2001**, *12*, 16.
13. Uhlmann, E.; Peyman, A.; *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 544.
14. Appella D. H.; *Current Opinion in Chemical Biology*, **2009**, *13*, 687-696
15. Petersen M.; Wengel J.; *TRENDS in Biotechnology*, **2003**, *21*, 74-81
16. a) Wahlestedt, C. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, *97*, 5633-5638 b) Arzumanov, A. et al.; *Biochemistry*, **2001**, *40*, 14645-14654.
17. Zhang, L.; Meggers, E.; *Accounts of chemical research*, **2010**, *43*, 1092-1102
18. Zhang, L.; Peritz, A.; Meggers, E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 4174-4175
19. Schlegel, M. K.; Peritz, A. E.; Kittigowittana, K.; Zhang, L.; Meggers, E.; *ChemBioChem* **2007**, *8*, 927-932.

20. Schlegel, M. K.; Xie, X.; Zhang, L.; Meggers, E.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 960–963
21. Lescrinier, E.; Esnouf, R.; Schraml, J.; Busson, R.; Heus, H.A.; Hilbers, C.W.; Herdewijn, P.; *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 719-731
22. Hendrix, C.; Rosemeyer, H.; De Bouvere, B.; Van Aerschot, A.; Seela, F.; Herdewijn, P.; *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 1513-1520
23. De Winter, H.; Lescrinier, E.; Van Aerschot, A.; Herdewijn, P.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 5381-5394.
24. Hendrix, C.; Rosemeyer, H.; Verheggen, I.; Seela, F.; Van Aerschot A.; Herdewijn, P.; *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 110C-120C.
25. Kozlov, I.A.; Politis, P.K.; Pitch, S., Herdewijn, P.; Orgel, L.E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 1108-1109.
26. Kozlov, I.A.; Politis, P.K.; Van Aerschot, A.; Busson, R.; Herdewijn, P.; Orgel, L.E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 2653-2656.
27. Otting, G.; Billeter, M.; Wuëthrich, K.; Roth, H.J.; Leuman, C.; Eschenmoser, A.; *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 2701-2756.
28. Bolli, M.; Micura, R.; Pitsch, S.; Eschenmoser, A.; *Helv. Chim. Acta*, **1997**, *80*, 1901-1951.
29. S. Pallan P. S.; Wilds C. J.; Wawrzak Z.; Krishnamurthy R.; Eschenmoser A.; Egli M.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5893 –5895
30. Nielsen P. E.; Egholm M.; *Current Issues Molec. Biol.*, **1999**, *1*(2), 89-104.
31. Ray A.; Nordèn B.; *The FASEB journal*, **2000**, *14*, 1041-1060.
32. Eriksson, M.; Christensen, L.; Shmidt, J.; Haaïma, G.; Orgel, L.; Nielsen, P. E.; *New J. Chem.*, **1998**, 1055-1059.
33. Hyrup B.; Nielsen P. E.; *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **1996**, *4*, 5-23.
34. a) Tomac, S.; Sarkar, M.; Ralilainen, T.; Wittung, P.; Nielsen, P. E.; Nordèn, B.; Gaslung, A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 544-5552. b) Kuhn, H.; Demidov, V. V.; Frank-Kamenetskii, M. D.; Nielsen, P. E.; *Nucleic acid Res.*, **1998**, *26*, 582-587.
35. Ray, A.; Nordén, B.; *FASEB*, **2000**, *14*, 1041-1060.
36. Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P.E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 1895-1897.
37. Wittung, P.; Nielsen, P.E.; Nordèn, B.; *Nucleosides and Nucleotides*, **1997**, *16*, 599-602
38. Nagai Y.; Miyazawa H.; Huqun; Tanaka T.; Udagawa K.; Kato M.; Fukuyama S.; Yokote A.; Kobayashi K.; Kanazawa M.; Hagiwara K.; *Cancer Research*, **2005**, *65*, 7276-82.

39. Lundin, K.E.; Good, L.; Stomberg, R.; Graslund, A.; Smith C. I. E.; *Advances in Genetics*, **2006**, *56*, 1-51.
40. Komiyama, M.; Aiba, Y.; Yamamoto, Y.; Sumaoka, J.; *Nature Protocols*, **2008**, *3*, 655-662.
41. Germini, A.; Rossi, S.; Zanetti, A.; Corradini, R.; Fogher, C.; Marchelli, R.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, *53*, 3958-62.
42. Orum, H.; Nielsen, P.E.; Jorgensen, M.; *BioTechnique*, **1995**, *19*, 472-480.
43. a) Ganesh, K. N.; Nielsen, P. E.; *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 931-943. b) Kumar, V. A.; *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2021-2032.
44. Gangamani, B. P.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *240*, 778-782.
45. Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Buchardt, O.; *Bioconjugate Chem.*, **1994**, *5*, 3-7.
46. Zhou, P.; Wang, M.; Du, L.; Fischer, G. W.; Waggoner, A.; Ly, D. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6878-6879.
47. a) de Koning, M. C.; van der Marcel, G.; Overhand, M.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 734-740. b) Eriksson, M.; Nielsen, P. E.; Good, L.; *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 7144-7147.
48. Sforza, S.; Corradini, R.; Dossena, A.; Marchelli, R.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 2905-2913.
49. Tomac, S.; Sarkar, M.; Ratilainen, T.; Wittung, P.; Nielsen, P. E.; Norden, B.; Graslund, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5544-5549.
50. Hyrup, B.; Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* ,**1996**, *6*, 1083-1088
51. a) Betts, L.; Josey, J. A.; Veal, M.; Jordan, S. R.; *Science* **1995**, *270*, 1838-1841. b) Ericksson, M.; Nielsen, P. E.; *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 410-413. c) Menchise, V.; De Simone, G.; Tedeschi, T.; Corradini, R.; Sforza, S.; Marchelli, R.; Capasso, D.; Saviano, M.; Pedone, C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 12021-12026.
52. Hollenstein, M.; Leumann, C. J.; *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1987-1990.
53. Rose, D. J.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3545-3549.
54. Larsen, H. J. Nielsen, P. E.; *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 458.
55. Lee, Y.; Jin, T.; Liu, K.; *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, **2001**, *20*, 1705.
56. D'Costa, M.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N.; *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 1281.
57. Holgrem, S. K.; Bretscher, L. E.; Taylor, K. M.; Raines, R.T.; *Chem. Biol.*, **1999**, *6*, 6370

58. Sharma, N.; Ganesh, K.; *tetrahedron*, **2004**, *45*, 1403.
59. Sharma, N.; Ganesh, K.; *Chem. Commun.*, **2003**, 2484.
60. Gangamani, B. P.; D'Costa, M.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N.; *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, **1999**, *18*, 1409.
61. Lonkar, P.; Ganesh, K. N.; Kumar, V. A.; *Org. Biol. Chem.*, **2004**, *2*, 2604.
62. Zhou, P.; Wang, M.; Du, L.; Fischer, G. W.; Waggoner, A.; Ly, D.H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6878.
63. Shirude, P. S.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N.; *tetrahedron*, **2004**, *45*, 3085.
64. Larsen, H. J.; Nielsen, P. E.; *Nucleic Acids Res.*, **1996**, *24*, 458.
65. Lescrinier, E.; Esnouf, R.; Schraml, J.; Busson, R.; Heus, H. A.; Hilbers, C. W.; Herdewijn, P.; *Chem. Biol.*, **2000**, *7*, 719–731.
66. Lagriffoule, P.; Wittung, P.; Eriksson, M.; Jensen, K. K.; Norden, B.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E.; *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 912.
67. a) Govindaraju, T.; .; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N.; *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 1858.
68. Staudiger, H.; *Chem. Ber.*, **1905**, *38*, 1735-1739.
69. Giacomelli, G.; Porcheddu, A.; De Luca, L.; *Current Organic Chemistry*, **2004**, *8*, 1497-1519.
70. Manhas, M. S.; Bose A. K.; Khajavi M. S.; *Synthesis*, **1981**, 209-211
71. Gawande, M. B.; Branco, P. S.; *Green Chem.*, **2011**, *13*, 3355
72. Atwell, G. J.; Denny W. A.; *Synthesis*, **1984**, 1032-1033.
73. Viirre, R. D.; Hudson, H. E.; *J. Org. chem.*, **2003**, 1630-1632.
74. De Luca, L.; Giacomelli, G.; Nieddu, G.; *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3955-3957.
75. De Luca, L.; Giacomelli, G.; Porcheddu, A.; *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 553-555.
76. Matsui, S.; Hashimoto. Y.; Saigo, K.; *Synthesis*, **1998**, 1161-1166.
77. Porcheddu, A.; Giacomelli, G.; Piredda, I.; Carta, M.; Nieddu, G.; *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5786–5797.
78. Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; *Purification of Laboratory Chemicals 3rd edition*, **1998**, Pergamon Press.
79. Neibecker, D.; Touma, M.; Tkatchenos, I.; *Synthesis*, **1984**, 1032-1033
80. Furstner, A.; Konetzki, I.; *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 3072-3080