



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Chimiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE MOLECOLARI

INDIRIZZO: SCIENZE CHIMICHE

CICLO XXI

SISTEMI MULTIVALENTI E COOPERATIVI PER LA CATALISI BIOMIMETICA

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Supervisore : Dott. Leonard J. Prins

Dottorando : Giovanni Zaupa

INDICE

1- INTRODUZIONE	7
1.1 - Sistemi biomimetici multivalenti	7
1.1.1 - Multivalenza e cooperatività	8
1.1.2 - Sistemi multivalenti artificiali	9
1.1.3 - Catalizzatori multivalenti	11
1.2 - Dendrimeri: caratteristiche ed uso in catalisi	14
1.2.1 - Caratteristiche generali	14
1.2.2 - Applicazioni in campo biologico	16
1.2.3 - Dendrimeri in catalisi	19
1.3 - Idrolisi di diesteri fosforici	22
2 - SINTESI E STUDIO DI SISTEMI MULTIVALENTI SU FASE SOLIDA	27
2.1 - Introduzione	27
2.2 - Sintesi su resina Cl-tritile	30
2.3 - Sintesi su resina Rink-ammide	36
2.4 - Dendrimeri supportati su fase solida	40
2.4.1 - Sintesi	40
2.4.2 - Studi cinetici	43
2.5 - Parte sperimentale	48
2.5.1 - Sintesi su resina Cl-tritile	49
2.5.2 - Sintesi su resina Rink-ammide	53
2.5.3 - Dendrimeri supportati su fase solida	56
3 - DENDRIMERI COME CATALIZZATORI: SINTESI E STUDIO	63
3.1 - Sintesi di dendrimeri di varia valenza	63
3.1.1 - Dendrimeri a base di lisina	64
3.1.2 - Dendrimeri a base di DAP - ATANP	66

3.2 - Esperimenti cinetici	68
3.2.1 - Dendrimeri poli-lys-Tacn	68
3.2.2 - Dendrimeri DAP-ATANP	73
3.3 - Parte sperimentale	74
3.3.1 - Procedure per la sintesi su fase solida e l'analisi	74
3.3.2 - Dendrimeri poly-lys-Tacn	77
3.3.3 - Dendrimeri DAP-ATANP	79
3.3.4 - Studi cinetici	84
4 - L'EFFETTO DENDRIMERICO:	
ANALISI DEI DATI E MODELLI TEORICI	86
4.1 - Dendroni e dendrimeri: analisi dei dati sperimentali	86
4.2 - Modelli simulati di catalizzatori multivalenti	90
4.2.1 - Modelli e simulazioni	90
4.2.2 - Parametri di Michaelis-Menten	94
4.2.3 - Confronto con i dati sperimentali	100
4.3 - Conclusioni	102
4.4 - Parte sperimentale	103
5 - DENDRIMERI ETEROFUNZIONALIZZATI	106
5.1 - Dendrimeri misti Tacn - vari amminoacidi	107
5.1.1 - Sintesi	107
5.1.2 - Studi cinetici	109
5.2 - Dendrimeri misti Tacn - Gly a vari rapporti	113
5.2.1 - Sintesi	113
5.2.2 - Studi cinetici	114
5.3 - Parte sperimentale	121
5.3.1 - Sintesi dendrimeri eterofunzionalizzati	121
5.3.2 - Studi cinetici	124

6 - NANOPARTICELLE D'ORO FUNZIONALIZZATE	
CON MISCELE DI TIOLI	127
6.1 - Introduzione	127
6.1.1 - Au-MPC come sistemi biomimetici	127
6.1.2 - Organizzazione dei tioli in Au-MPC misti	128
6.2 - Sintesi nanoparticelle d'oro funzionalizzate con miscele di tioli	132
6.3 - Analisi delle nanoparticelle	138
6.3.1 - Analisi di microscopia TEM	138
6.3.2 - Analisi termogravimetriche	138
6.3.3 - Analisi NMR	140
6.3.4 - Analisi UV-VIS	143
6.4 - Studi catalitici	144
6.4.1 - Cinetiche al variare della concentrazione di Zn(II)	145
6.4.2 - Cinetiche al variare della concentrazione del substrato	146
6.4.3 - Cinetiche variando il rapporto Tacn/Zn a Zn costante	150
6.4.5 - Cinetiche di inibizione con dimetilfosfato	153
6.5 - Conclusioni	154
6.6 - Parte sperimentale	155
6.6.1 - Sintesi TEG-tiolo	155
6.6.2 - Sintesi Tacn-tiolo	159
6.6.3 - Sintesi Au-MPC	163
6.6.4 - Analisi nanoparticelle	165
6.6.5 - Studi cinetici	167
 APPENDICE	
A-1 Pubblicazioni	170
A-2 Bibliografia	171
A-3 Abbreviazioni	175
A-4 Riassunto (IT)	177
A-5 Summary (EN)	184

1. INTRODUZIONE

1.1 SISTEMI BIOMIMETICI MULTIVALENTI

Se si analizzano da un punto di vista chimico le strutture e i processi presenti negli organismi viventi, non si può non rimanere affascinati dalla loro complessità e dalla loro efficacia, specie se comparati alle comuni reazioni che si possono effettuare in un laboratorio. I processi biochimici avvengono in un ambiente molto complesso, per la presenza di un gran numero di specie diverse, tuttavia le interazioni tra cellule, proteine ed altre molecole avvengono in maniera allo stesso tempo efficace e selettiva, con meccanismi molto articolati e regolabili. Gli enzimi poi catalizzano reazioni anche complesse con un grado di efficienza e selettività molto superiore rispetto ai corrispondenti processi “artificiali”. Diventa quindi molto interessante studiare questi meccanismi, sia per comprenderli e se necessario intervenire su di essi, sia per provare a trasferire alcune loro qualità ai processi di sintesi “classici” per migliorarli.

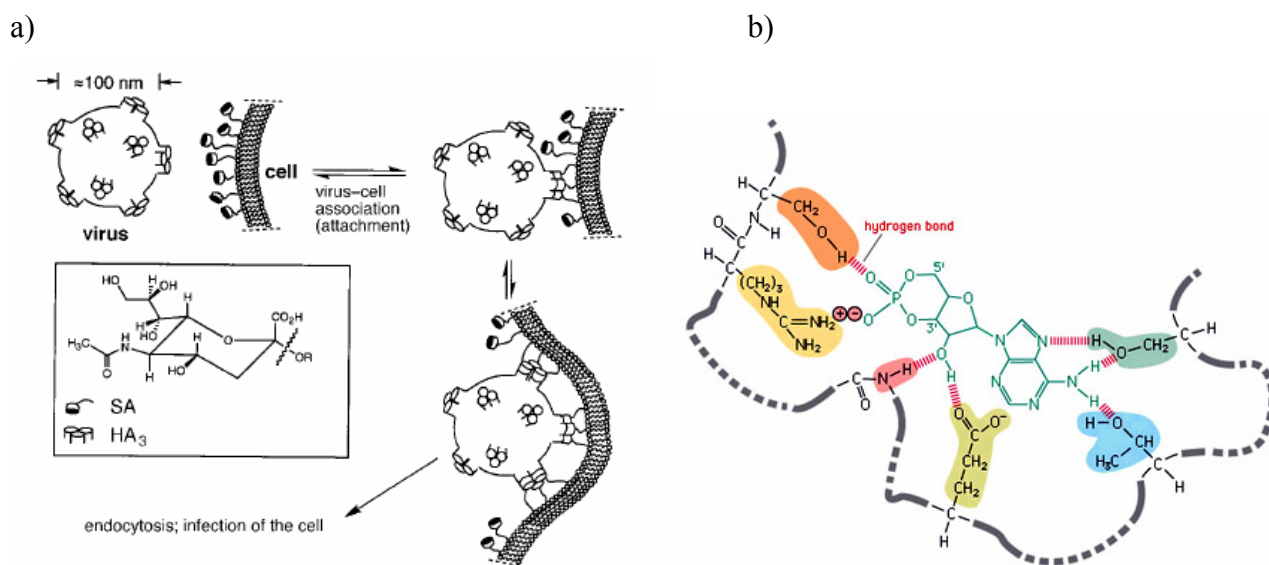


Figura 1.1 a) Interazione del virus dell'influenza con la superficie delle cellule
b) Sito attivo dell'enzima adenil-ciclastasi.

1.1.1 MULTIVALENZA E COOPERATIVITA'

Una caratteristica dei sistemi naturali è la multivalenza, cioè la presenza di un gran numero di gruppi funzionali che agiscono contemporaneamente, al posto di una singola interazione forte vi è una somma di numerose interazioni deboli, che nel complesso, oltre ad avere un effetto maggiore, possono essere molto più selettive e modulabili. Questi gruppi possono essere uguali tra loro, oppure anche di tipo diverso uniti tra loro, per dare interazioni più diversificate e selettive. Un'altra importante qualità che si riscontra spesso in sistemi di questo tipo è la cooperatività, per cui l'effetto complessivo che si ottiene è superiore alla semplice somma dei singoli contributi dei vari elementi, quindi vi è un effetto sinergico tra varie unità. Dal punto di vista energetico una reale cooperatività si può definire quando la diminuzione di energia libera nel processo è superiore alla somma delle energie relative alle singole interazioni [1, 2].

$$\alpha = \frac{\Delta G^{multi}}{\sum \Delta G^{mono}} > 1$$

Esempi di multivalenza e cooperatività sono comuni nei sistemi biologici: ad esempio nel binding tra i virus e le superfici di cellule, grazie all'interazione multipla tra i gruppi presenti sulle due strutture (figura 1.1a).

Importanti interazioni biologiche sono mediate da carboidrati, che con poche unità di base possono creare un'ampia varietà di strutture spaziali; il binding tra carboidrati e particolari proteine è implicato nel sistema immunitario, in infezioni virali, nella crescita cellulare e nei tumori. Queste interazioni multivalenti presentano caratteristiche cooperative: il binding è infatti aumentato rispetto al semplice effetto additivo, per quello che viene definito l'effetto cluster dei poliglicosidi [3].

La maggiore affinità evidenziata nel binding multivalente è da attribuirsi ad un effetto numerico, per cui si ha un'elevata concentrazione locale di legante, e ad un effetto chelante, che diminuisce la probabilità di distacco del legante. Inoltre vi è la possibilità di un clustering indotto sul recettore, e una stabilizzazione sterica in quanto le dimensioni del legante multivalente prevengono l'interazione con altri leganti (figura 1.2) [4].

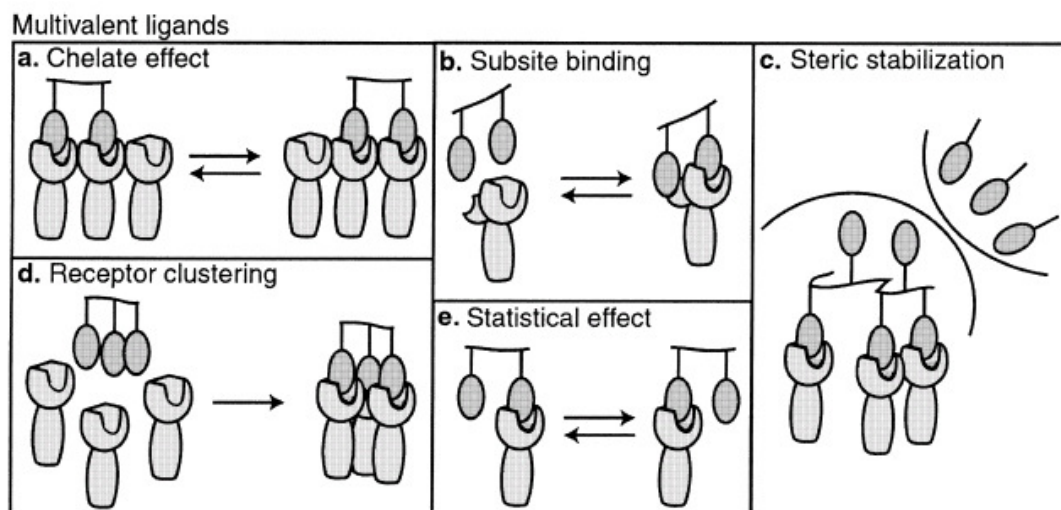


Figura 1.2 Meccanismi di binding multivalente (da [4]).

La multivalenza oltre all'affinità può aumentare anche la selettività di un binding: se viene infatti aumentata sia l'alta affinità per il legante specifico che la bassa affinità per quello non specifico, si ha un rapporto maggiore tra le due costanti e quindi una maggiore specificità [5].

Anche nella catalisi enzimatica queste proprietà sono fondamentali, l'alta reattività e selettività è infatti dovuta dall'interazione di più gruppi funzionali, spesso diversi tra loro, presenti nel sito attivo dell'enzima, ciascuno dei quali fornisce un contributo al binding del substrato e/o alla catalisi (figura 1.1b).

1.1.2 SISTEMI MULTIVALENTI ARTIFICIALI

Molte ricerche sono rivolte a sintetizzare e studiare strutture che sfruttino le caratteristiche dei sistemi naturali, quali la multivalenza e la cooperatività. Queste molecole sono studiate per essere in grado di agire o come leganti che interagiscono con le biomolecole, o come catalizzatori per comprendere e sfruttare le peculiarità degli omologhi naturali (mimesi enzimatica), magari per intervenire negli stessi meccanismi biochimici; ricerche di questo tipo hanno quindi potenziali applicazioni più o meno immediate nel campo terapeutico o diagnostico [6, 7, 8, 9].

Quelle che vengono studiate sono strutture che portano legate un numero variabile di unità funzionali, quali gruppi di varia natura, unità di binding, gruppi attivi cataliticamente, ecc..

La sintesi può avvenire a partire da una struttura multivalente preformata (scaffold) recante opportuni gruppi che permettono di legare per reazione di coupling i gruppi desiderati, oppure a partire direttamente dalle unità funzionali per polimerizzazione o per autoassemblaggio.

Le strutture possono essere di vario tipo, con un'ampia gamma di dimensioni e valenza, la scelta dello scaffold può avere un importante effetto sull'attività del sistema (figura 1.3).

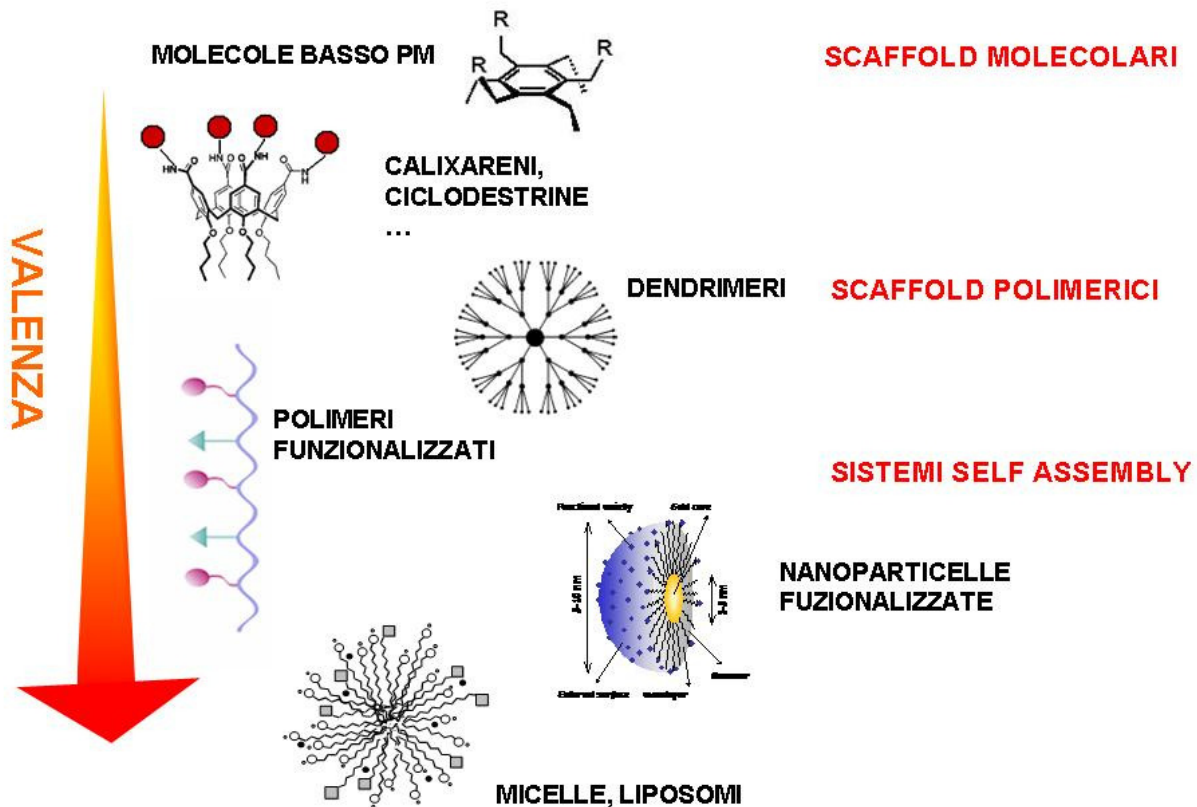


Figura 1.3 Sistemi multivalenti di dimensioni crescenti.

Sistemi a basso peso molecolare:

Queste strutture si ottengono per opportuna funzionalizzazione di molecole a basso PM (< 1000 Da), gli scaffold utilizzati sono spesso di tipo rigido, come molecole aromatiche, steroidi, calixareni, ciclodestrine, per fornire un'orientazione precisa ai gruppi. Variando lo scaffold è possibile variare la forma e la flessibilità del sistema, inoltre si possono effettuare studi di tipo combinatoriale variando i gruppi funzionali legati. La valenza di queste strutture è comunque bassa ($n = 2-7$).

Sistemi polimerici

Possono essere di tipo ramificato o lineare, nel primo caso di grande interesse sono i dendrimeri, dotati di un'architettura e di una valenza ben definita ($n = 10-100$), che saranno trattati in maniera diffusa nel capitolo successivo.

I sistemi lineari permettono di legare insieme un numero molto grande di gruppi, la sintesi può avvenire per derivatizzazione di un polimero preformato, o direttamente per polimerizzazione dei gruppi.

Sistemi autoassemblati

La loro formazione avviene per aggregazione delle unità funzionali in determinate condizioni. L'unione può essere di tipo covalente, come nel caso della formazione di layer su nanoparticelle o superfici, o di tipo non covalente, come nelle micelle e nei liposomi.

1.1.3 CATALIZZATORI MULTIVALENTI

Oltre che per il binding la multivalenza assume importanza anche per la catalisi, per migliorare l'attività di catalizzatori una strategia può essere, infatti, quella di unire insieme più unità catalitiche su di una struttura multivalente. Tuttavia bisogna porre attenzione al fatto che non tutti i catalizzatori multivalenti possono essere anche definiti cooperativi: questo accade solo se l'attività del catalizzatore multivalente è superiore alla somma dell'attività di un ugual numero di componenti separati. L'aumento di reattività deve essere quindi dovuto non solo ad effetti di concentrazione locale, ma all'instaurarsi di un meccanismo cooperativo in cui i gruppi hanno un ruolo diverso da quello che si riscontra in un meccanismo non cooperativo [10]. Per evidenziare la presenza di una reale cooperatività, un metodo può essere quello di studiare sistemi multivalenti funzionalizzati con diversi gruppi, variando la frazione di gruppo attivo presente. Se l'attività catalitica varia in maniera non lineare ciò significa che vi è cooperatività, e non solo un effetto additivo (figura 1.4). Un altro metodo può essere, nel caso di reazioni di idrolisi, la misura dell'attività al variare del pH: se il profilo ottenuto per il catalizzatore multivalente è diverso da quello della singola unità, il meccanismo catalitico nei due casi è diverso (figura 1.5).

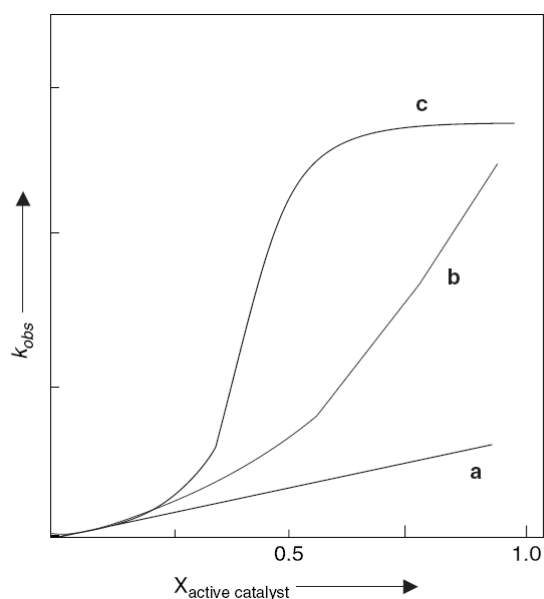


Figura 1.4 Profilo cinetico di un catalizzatore multivalente al variare della frazione molare di componente attivo. a) non cooperativo; b), c) cooperativo. Nel caso c la massima attività viene raggiunta per una frazione molare inferiore ad 1 [10].

1 - INTRODUZIONE

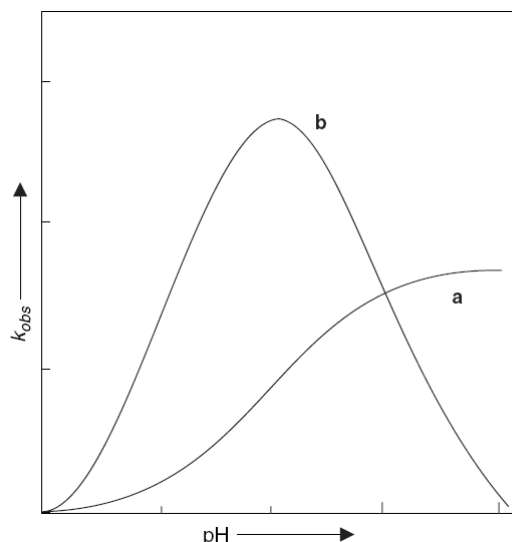


Figura 1.5 Profilo cinetico al variare del pH per un processo che coinvolge un acido e la base coniugata: a) catalizzatore cooperativo, b) non cooperativo [10].

Una catalisi di tipo cooperativo si ha quindi se la reazione può avvenire con un meccanismo che preveda l'interazione di più gruppi, tuttavia anche il tipo di catalizzatore multivalente è importante. La struttura deve infatti porre le unità catalitiche vicine tra loro per consentire loro di interagire in maniera ottimale.

Un esempio di reazione di questo tipo è l'idrolisi di esteri carbossilici catalizzata da gruppi imidazolici, tramite un meccanismo cooperativo in cui l'imidazolo può agire sia da nucleofilo, sia per una catalisi acido-base generale.

In uno studio da noi effettuato, uno scaffold tripodale è stato funzionalizzato con miscele di due diversi gruppi (un'imidazolo e un'ammina terziaria), ottenendo miscele dei quattro composti in figura 1.6 [10]. Aumentando la percentuale di imidazolo presente, e misurando la costante catalitica per l'idrolisi di p-nitrofenilacetato, si vede che l'andamento risulta rettilineo. Questo indica che in questo sistema la cooperatività è assente, probabilmente lo scaffold è troppo flessibile e i gruppi non riescono a trovarsi abbastanza vicini tra loro.

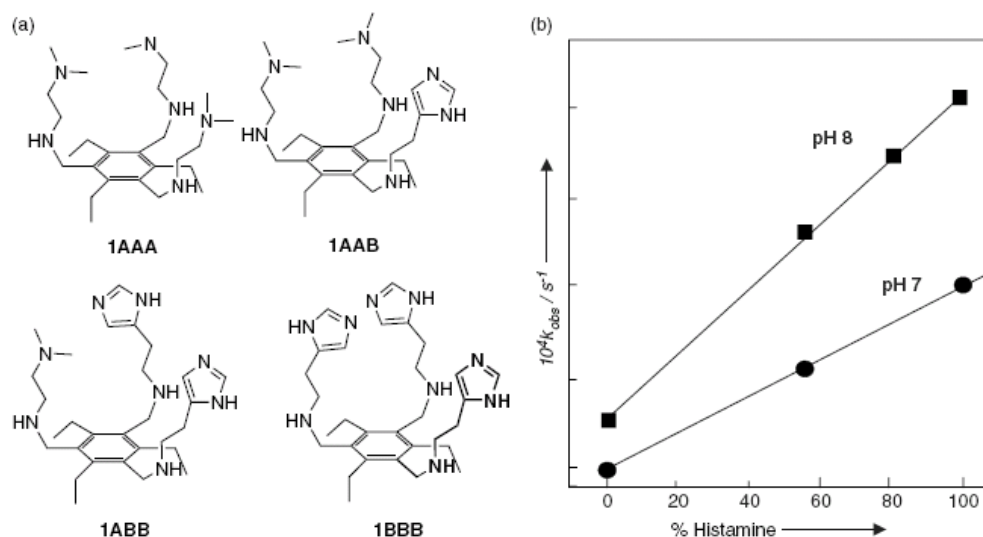


Figura 1.6 Catalizzatori multivalenti contenenti gruppi imidazolici, e k_{obs} per l'idrolisi del p-nitrofenilacetato in funzione della % di imidazolo presente nella miscela.

In un altro studio invece dei tioli organici recanti gruppi imidazolici sono stati inseriti nel monolayer organico di una nanoparticella d'oro (figura 1.7). L'attività catalitica nei confronti dell'idrolisi del 2,4-dinitrofenilacetato è stata misurata a vari pH e confrontata con quella di un gruppo isolato [11].

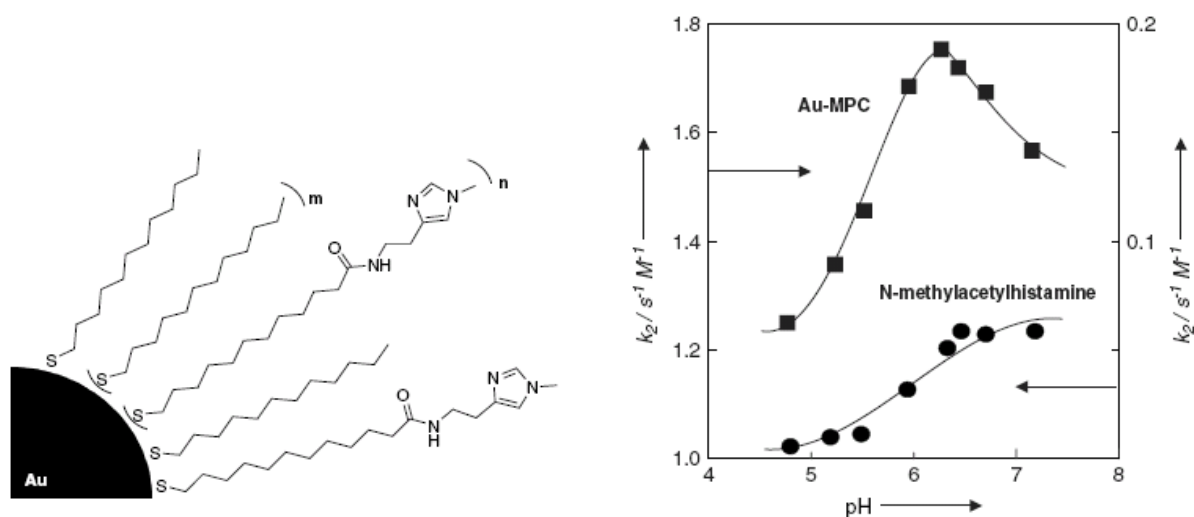


Figura 1.7 Nanoparticelle d'oro ricoperte con tioli funzionalizzati (da [11]).

Si è osservato che le nanoparticelle accelerano la reazione di 30 volte rispetto al monomero, inoltre il profilo rispetto al pH è differente, con un andamento a massimo per il sistema multivalente: in questo caso quindi si ha una reale cooperatività tra i gruppi imidazolici.

1.2 DENDRIMERI: CARATTERISTICHE E USO IN CATALISI

1.2.1 CARATTERISTICHE GENERALI

Tra le varie classi di polimeri di sintesi, i dendrimeri sono stati oggetto di un ampio studio, per le loro caratteristiche peculiari e le loro possibili applicazioni, che vanno dalla scienza dei materiali alla medicina [12, 13]. Il loro nome deriva dal greco dendron (albero, ramo) e si riferisce alla loro struttura ad albero, essi infatti possono essere definiti come dei polimeri altamente ramificati, la loro crescita avviene per l'aggiunta di successivi punti di diramazione, ognuno dei quali aumenta la "generazione" del dendrimer. Un'altra caratteristica che li distingue tra i polimeri è il fatto di essere monodispersi: la loro struttura è ben definita e il numero di unità terminali è determinato, e dipende dalla generazione del dendrimer. La forma è di tipo globulare, con un'alta densità di funzionalità rispetto al volume; il volume idrodinamico risulta infatti molto minore rispetto ai corrispondenti polimeri lineari, anche se maggiore rispetto a quello delle proteine dello stesso PM [14]. E' importante notare che il diametro del dendrimer aumenta linearmente al crescere della generazione, mentre il numero di gruppi funzionali terminali aumenta esponenzialmente. Di conseguenza maggiori sono le dimensioni, maggiore sarà la concentrazione e la vicinanza dei gruppi posti sulla superficie. D'altra parte questo fa sì che mentre i dendrimeri più piccoli sono flessibili e aperti, quelli di generazioni superiori diventano sfere più rigide e meno deformabili [12]. Le strutture chimiche usate per la loro sintesi sono le più svariate, e permettono di variare le caratteristiche fisiche e chimiche, come l'idrofobicità, del dendrimer; tra le più usate e studiate si possono citare le poliammine [15], poliammidi e ammine (come nel PAMAM [16]), o i poliarileteri [17]. Le metodologie di sintesi si possono dividere in due classi (figura 1.8).

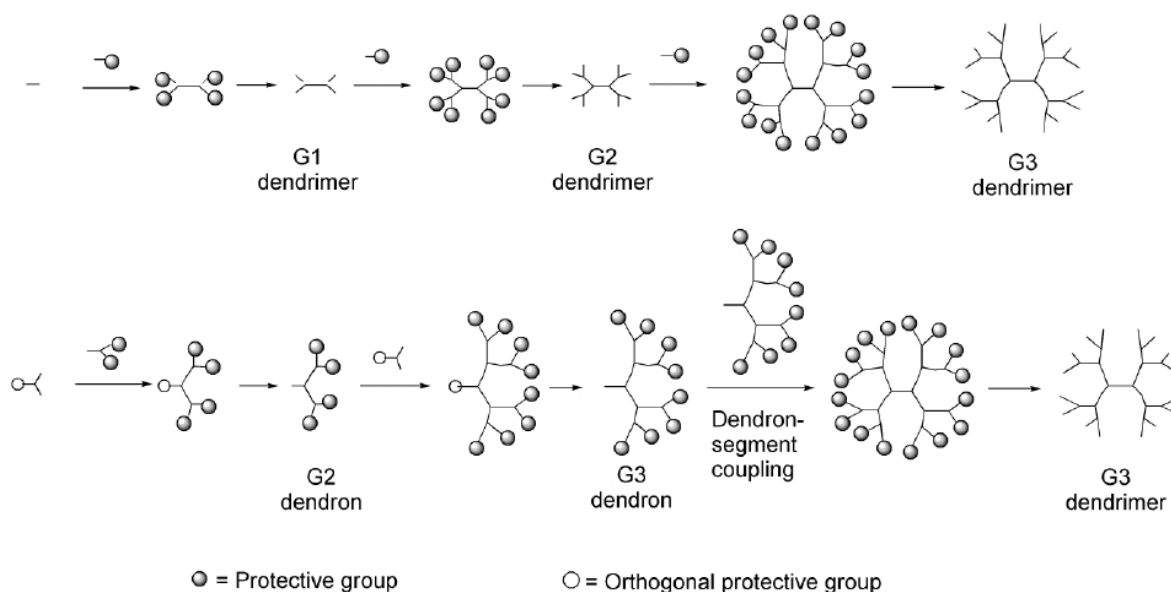


Figura 1.8 Strategie di sintesi divergente (sopra) e convergente (sotto) per dendrimeri.

La sintesi divergente parte dal centro e fa crescere il dendrimero generazione dopo generazione. Questa tecnica permette di ottenere grandi dimensioni, ma, per il numero crescente di reazioni da far avvenire, è necessario che queste siano altamente quantitative per evitare difetti nella struttura. La sintesi di tipo convergente parte invece dalla periferia, sintetizzando porzioni (dendroni) che vengono poi uniti tra loro [18]. Il minor numero di funzionalità da far reagire ad ogni step riduce la quantità di sottoprodotti, inoltre la purificazione usando questo metodo è più semplice.

Questa seconda metodologia permette di creare dendrimeri asimmetrici [19], un esempio è quello di dendroni terminanti con un gruppo tiolico, che possono essere uniti tra loro per ossidazione e formazione di un disolfuro (figura 1.9). Le strutture che si ottengono possono essere simmetriche, oppure derivanti da dendroni di diversa dimensione e/o funzionalità [20].

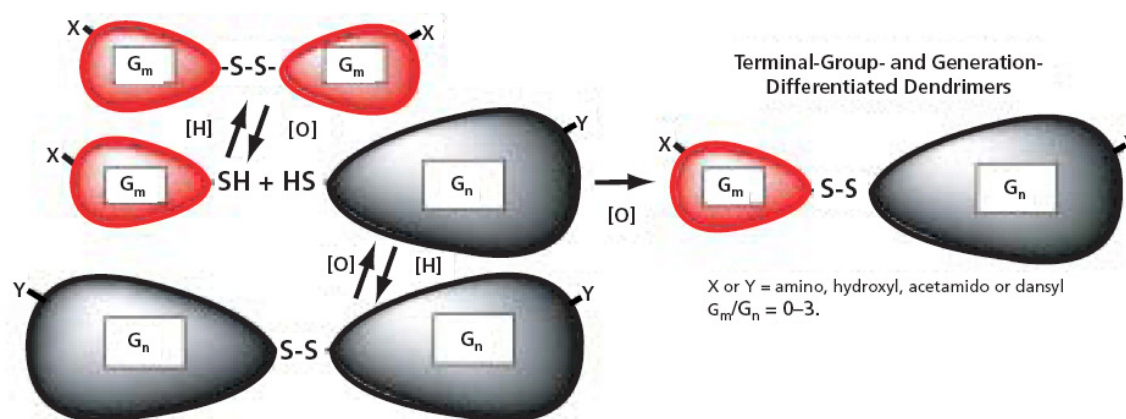


Figura 1.9 Dimerizzazione di dendroni a dare dendrimeri simmetrici o asimmetrici [20].

In tal modo si possono avere dendrimeri eterofunzionalizzati, con diverse caratteristiche chimico-fisiche sulle due parti. Ad esempio è possibile fare in modo che metà del dendrimero porti dei peptidi per il riconoscimento di particolari target biologici, mentre l'altra metà sia derivatizzata con un gruppo che funge da label per l'imaging e quindi permetta di avere un segnale rilevabile (figura 1.10) [21].

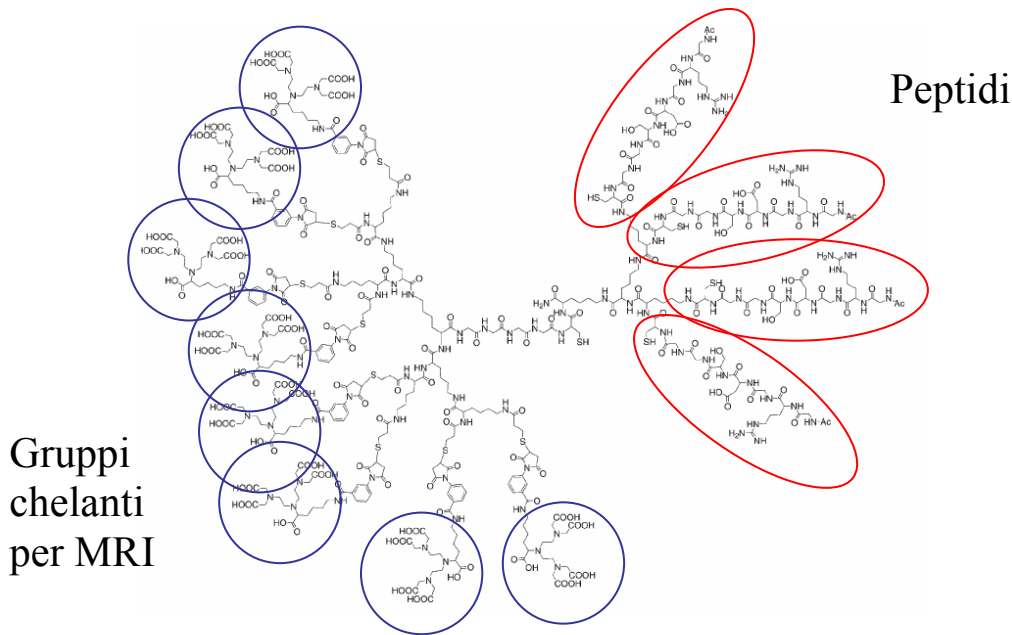


Figura 1.10 Dendrimero bifunzionalizzato per imaging selettivo [21].

Dal punto di vista della struttura un dendrimer si può dividere in tre parti:

- la superficie, la parte terminale del polimero, che presenta un numero elevato di gruppi funzionali, adatti ad essere derivatizzati
- lo strato esterno, o “outer shell”, posto vicino alla superficie, ma con caratteristiche chimiche differenti
- l’interno, o “core”, che direziona la struttura, e forma spesso un ambiente chimico separato.

Se si fa un confronto con proteine di analogo PM, i dendrimeri, avendo l’interno formato da legami covalenti, sono meno flessibili, ma allo stesso tempo meno compatti. La struttura comunque può variare in dipendenza della polarità del solvente, del pH e della forza ionica, per cui il dendrimer può assumere diverse conformazioni [13].

1.2.2 APPLICAZIONI IN CAMPO BIOLOGICO

I dendrimeri attirano un elevato interesse per le loro possibili applicazioni in campo biologico-farmaceutico, sia per le loro caratteristiche intrinseche, sia per la possibilità di essere derivatizzati con i gruppi più svariati. Possono essere infatti coniugati, in modo multivalente, a molecole attive farmacologicamente, a ligandi per target biologici, a probe di fluorescenza o ad agenti di contrasto per l’imaging [22]. Rispetto ai polimeri lineari le loro tossicità è inferiore, per la loro struttura globulare che causa una minore adesione aspecifica alle superfici cellulari [23].

I dendrimeri hanno la capacità di incapsulare mediante interazioni host-guest molecole di vario tipo, l'interazione può avvenire nel core (endorecettore), o nello strato esterno (esorecettore).

L'interno del dendrimero si presenta come un ambiente chimico particolare, con una diffusione limitata delle molecole del solvente. In soluzione acquosa agiscono quindi come delle "micelle molecolari", dissolvendo grazie al loro interno idrofobico molecole apolari; per questo vengono studiate le applicazioni come carriers per il trasporto di molecole bioattive come gli steroidi [24].

Il binding può avvenire anche sulla superficie esterna, ad esempio se derivatizzati con uree legano efficacemente i peptidi [25].

Le strutture di tipo PAMAM trovano applicazione per il delivery di geni o inibitori nel nucleo delle cellule, per terapie genetiche o di antisenso, grazie all'interazione tra le cariche positive del dendrimero, e le cariche negative dei polinucleotidi [13].

La funzionalizzazione dei dendrimeri con mono o oligosaccaridi semplici permette di sfruttare l'effetto cluster per ottenere leganti altamente specifici per l'interazione con proteine e superfici cellulari, in molti casi riuscendo a competere con i leganti naturali. Questi glicodendrimeri trovano quindi interesse come antigeni per diagnostica, vaccini artificiali e studi biochimici [26].

I dendrimeri stanno trovando applicazioni anche come antivirali, inserendo gruppi anionici sulla superficie (come sulfonato o acido sialico) che interagiscono con i carboidrati acidi presenti sulla superficie delle cellule (figura 1.11). Il dendrimero compete quindi nel binding con la superficie cellulare con il virus, diminuendo la probabilità di infezione [15].

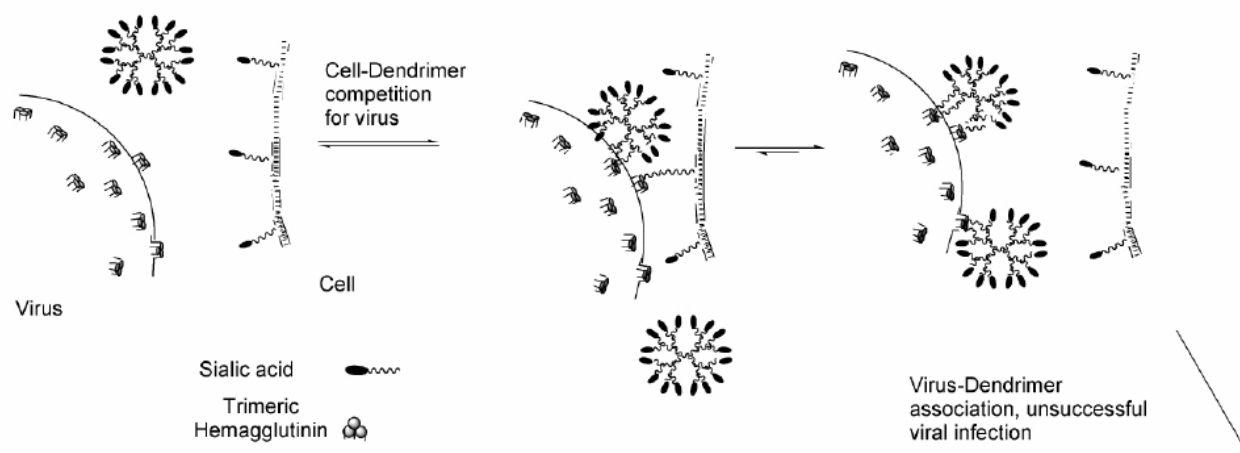


Figura 1.11 Azione competitiva di dendrimeri nell'interazione virus-superficie cellulare [13].

I semplici peptidi solitamente non sono in grado di provocare una risposta immunitaria se iniettati come tali, è quindi necessario aumentare il peso molecolare per polimerizzazione o per coupling con un carrier, solitamente una proteina derivatizzata. In questo campo i dendrimeri si sono rivelati utili, in quanto possono agire da carrier multivalente per sostanze antigeniche, legando i peptidi ai

1 - INTRODUZIONE

gruppi sulla superficie esterna. Un esempio molto usato sono i MAP (multiple antigenic peptide), strutture ramificate formate dal coupling di lisine. Quella che si ottiene è una struttura dendrimerica asimmetrica, in cui i gruppi amminici α e ϵ della lisina possono essere usati per legare antigeni di basso PM, in cluster di 4 o 8, riuscendo ad ottenere una risposta immunitaria (figura 1.12) [27].

Oltre a peptidi possono essere legati anche antigeni di tipo glicosidico per ottenere vaccini artificiali (figura 1.13) [28].

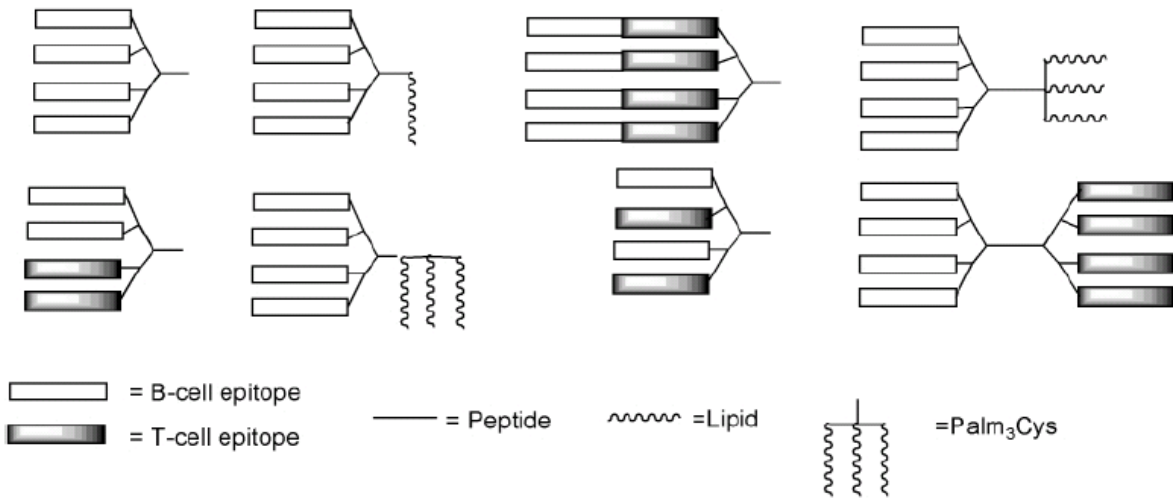


Figura 1.12 Sistemi MAP come antigeni artificiali

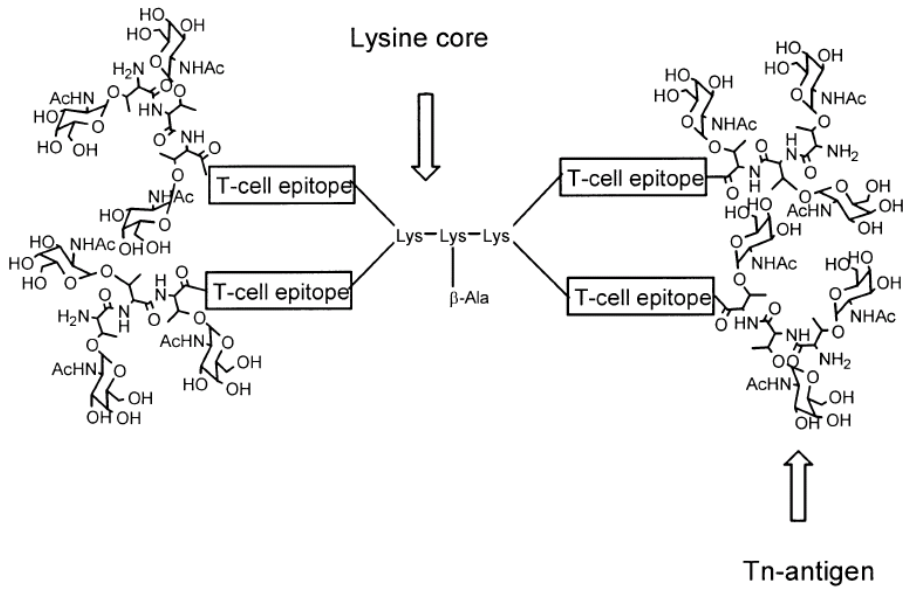


Figura 1.13 Dendrimero MAP-4 funzionalizzato con glicosidi [28].

1.2.3 DENDRIMERI IN CATALISI

La catalisi biomimetica promossa da strutture di piccole dimensioni manca della capacità di creare un ambiente chimico particolare che possiedono le proteine, i dendrimeri invece hanno dimensioni analoghe a quelle di piccoli enzimi, e inoltre si possono variare la struttura, le funzionalità e la disposizione dei gruppi [29, 30].

La periferia dei dendrimeri è generalmente responsabile della solubilità, anche se l'interno ha un'idrofobicità differente, essa scherma e modifica l'ambiente interno che può avere una polarità e un pH diverso. In maniera simile agli enzimi, in cui sono presenti delle tasche idrofobiche che ospitano i substrati provenienti dall'ambiente acquoso, l'interno degli enzimi può fungere da "nanoreattore" con caratteristiche diverse dalla soluzione. Questo può favorire la preconcentrazione del substrato e successivamente stabilizzare gli intermedi o gli stati di transizione e quindi aumentare la velocità della reazione (figura 1.14).

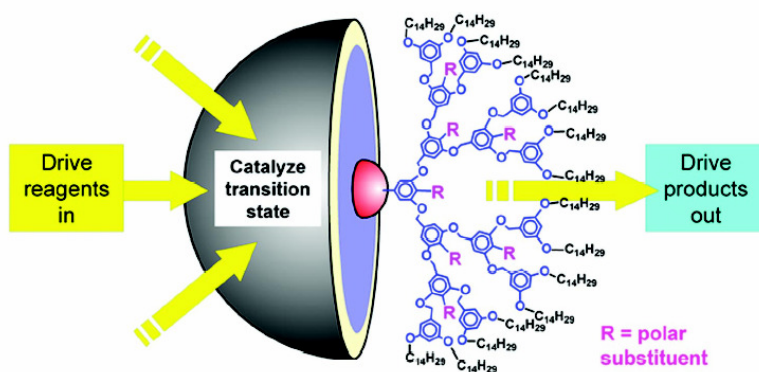


Figura 1.14

La natura multivalente e spazialmente ordinata dei dendrimeri li rende poi ideali per sfruttare la cooperatività tra diverse unità catalitiche: i gruppi funzionali legati alla superficie sono infatti preorganizzati e vicini tra loro.

Ad esempio il gruppo di Jacobsen ha riscontrato un netto miglioramento delle prestazioni catalitiche di un complesso Co-salen legato ad un dendrimero PAMAM di valenza 4 [31]. La reazione in esame è stata la risoluzione cinetica per via idrolitica di epossidi, il cui meccanismo avviene tramite un processo bimetallico, con l'attivazione dell'eossido e del nucleofilo da parte di due complessi distinti (figura 1.15). Il Co-salen legato al PAMAM si è rivelato 24 volte più veloce e anche più efficace del monomero, con la possibilità di usare quantità di catalizzatore molto più basse.

1 - INTRODUZIONE

L'unione di più complessi sul dendrimero aumenta la concentrazione effettiva locale del catalizzatore, inoltre si ha un vantaggio entropico nella vicinanza tra il nucleofilo e l'epossido.

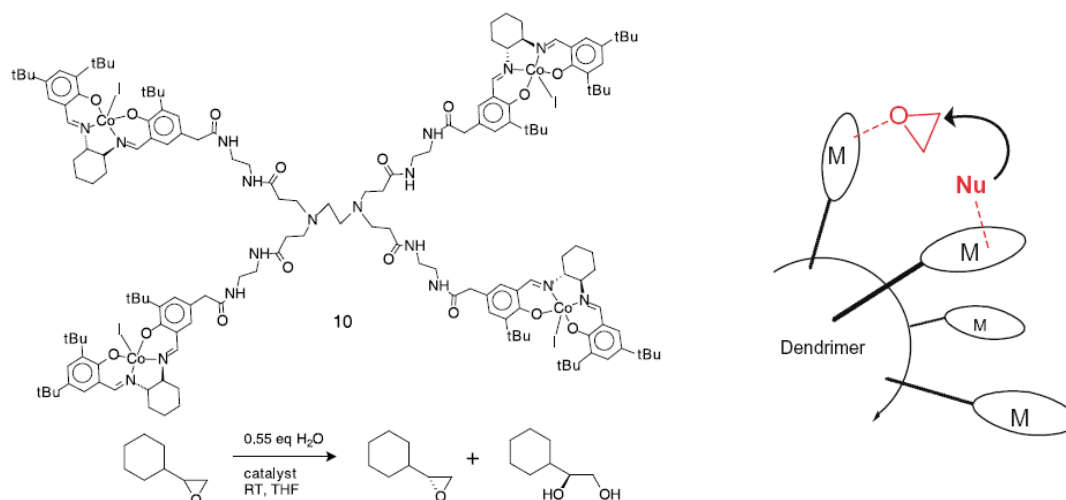


Figura 1.15 PAMAM-4 funzionalizzato con Co-Salen come catalizzatore dell'idrolisi stereoselettiva di epossidi [31].

La ricerca di catalizzatori biomimetici attivi di tipo dendrimerico può avvenire anche per via combinatoriale. Il gruppo di Raymond ha studiato, ad esempio, una libreria di dendrimeri attivi verso l'idrolisi di esteri, mediante diverse combinazioni degli amminoacidi His, Asp, Ser, che compongono la classica triade catalitica (figura 1.16) [32]. La sintesi è stata effettuata su fase solida e lo screening successivo ha selezionato i catalizzatori più attivi che hanno dimostrato anche una selettività tra i vari substrati. L'efficacia e la specificità hanno origine dalla disposizione dei gruppi funzionali in modo ottimale per l'interazione cooperativa [33, 34].

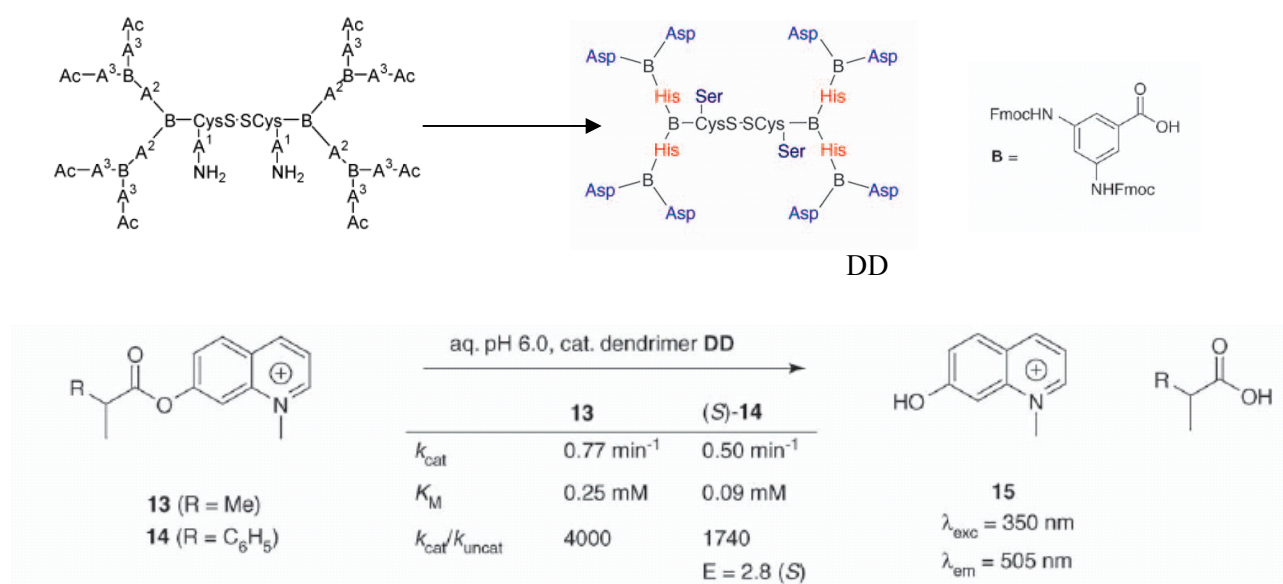


Figura 1.16 Libreria di peptido-dendrimeri per l'idrolisi di esteri carbossilici [34].

In un altro studio dello stesso gruppo sono stati sintetizzati peptido-dendrimeri di diverse generazioni recanti un numero crescente di sequenze His-Ser (figura 1.17) [35]. Testati per la catalisi dell'idrolisi di un estere carbossilico tali composti hanno dimostrato un forte "effetto dendrimerico": dai parametri di Michaelis-Menten per ogni generazione si vede infatti che l'efficacia catalitica k_{cat}/K_M aumenta in modo non lineare. Questo effetto può essere attribuito all'interazione cooperativa tra i residui di istidina e ad un binding più forte per il substrato. Titolazioni calorimetriche hanno mostrato infatti che i dendrimeri di generazione più alta possono legare un maggiore numero di molecole di substrato e con binding più forte, mentre il binding per il prodotto della reazione è notevolmente più debole, il che permette un'elevata velocità di turnover.

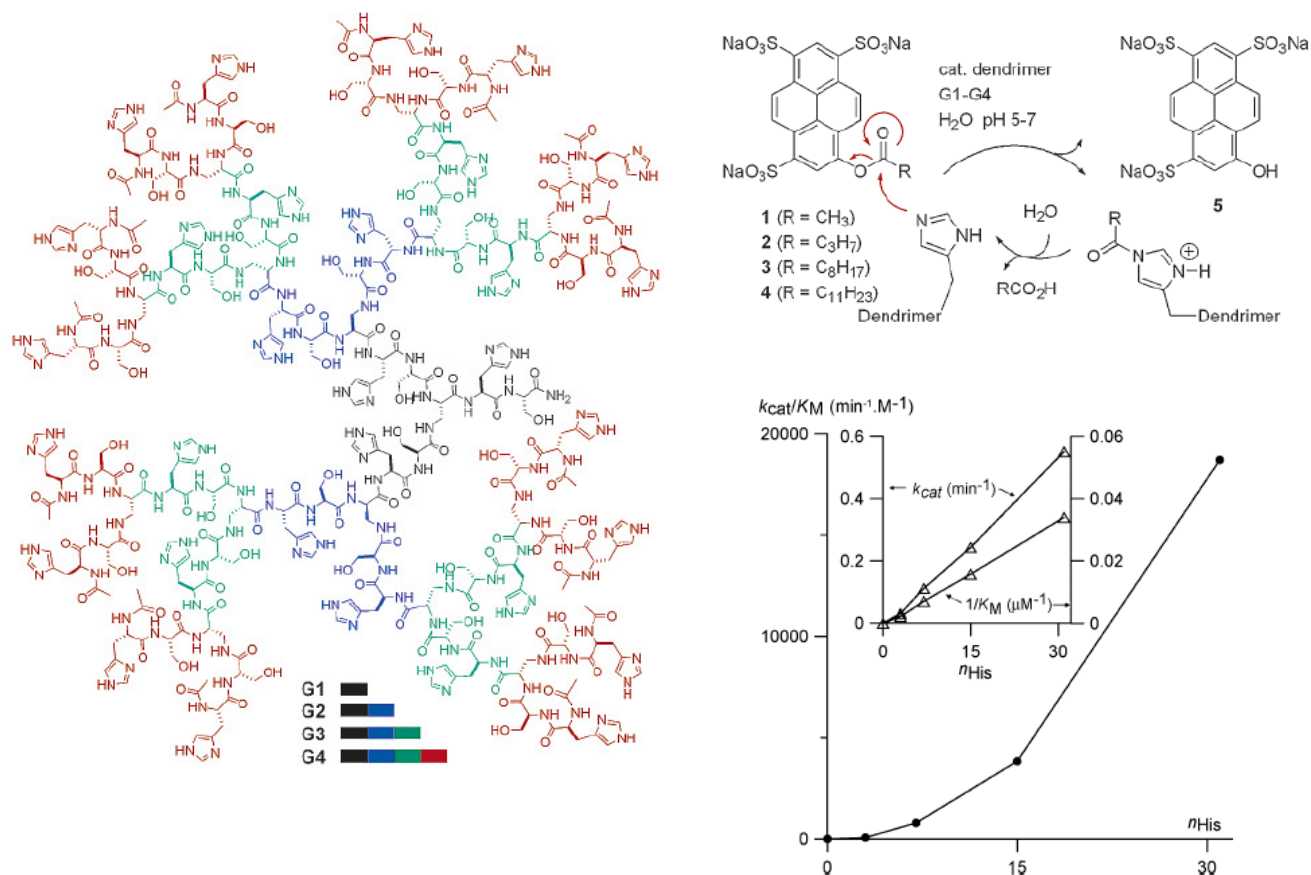


Figura 1.17 Peptido-dendrimeri per l'idrolisi di esteri carbossilici e variazione dell'efficacia catalitica al crescere della generazione [35].

1.3 IDROLISI DI DIESTERI FOSFORICI

Come visto l'uso di dendrimeri ed altri sistemi multivalenti come catalizzatori, permette di ottenere elevati incrementi di reattività, quando le reazioni presentano un meccanismo di tipo cooperativo. Tra queste reazioni il nostro gruppo di ricerca ha rivolto i suoi studi all'idrolisi di diesteri fosforici.

I diesteri dell'acido fosforico sono una classe di composti che investe una grande importanza dal punto di vista biologico, basti pensare ad esempio al DNA, all'RNA, all'ATP, ai fosfolipidi ed altri ancora. Caratteristica di queste molecole è la difficoltà che si riscontra nell'idrolisi, dovuta anche alla presenza di una carica negativa che ha un effetto repulsivo nei confronti di un attacco nucleofilo al carbonile.

Questa stabilità del resto è fondamentale per il DNA, che ha il compito di immagazzinare l'informazione genetica; il suo legame estereo ha un tempo di semivita a pH 7 stimato nell'ordine dei 10^{11} anni. Anche nell'RNA il legame risulta molto stabile, tuttavia la velocità di idrolisi rispetto al DNA risulta superiore di circa 10^9 volte. La differenza è dovuta ad un diverso meccanismo di idrolisi: nell'RNA infatti la presenza dell'idrossile in posizione 2' permette un attacco intramolecolare al fosfato (figura 1.18), la minore stabilità rispecchia il ruolo biologico che è quello di trasmettere l'informazione genetica, terminato il quale la molecola viene scissa e metabolizzata.

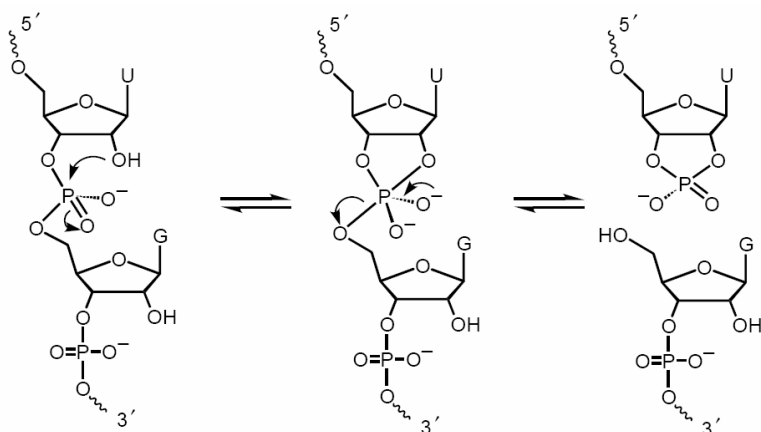


Figura 1.18 Meccanismo di idrolisi intramolecolare dell'RNA.

Nonostante la stabilità di queste molecole, in natura esistono numerosi enzimi in grado di catalizzare l'idrolisi in modo veloce. Questa capacità è dovuta alla presenza nel sito attivo di due o più ioni metallici posti vicini tra loro che agiscono in modo cooperativo nel meccanismo catalitico (figura 1.19).

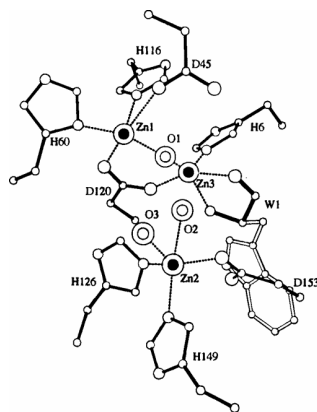


Figura 1.19 Il sito attivo della metallonucleasi P1

Molti studi sono quindi stati dedicati a comprendere la modalità di azione di questi enzimi e a sviluppare sistemi artificiali in grado di replicarne le prestazioni [36].

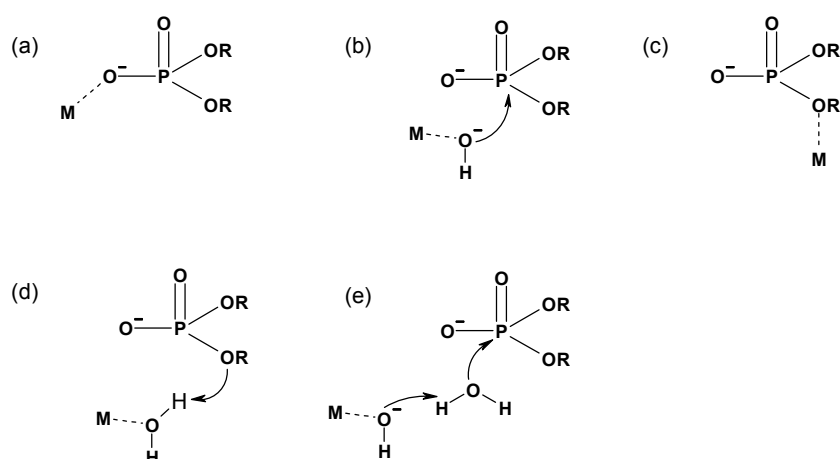


Figura 1.20 Ruolo giocato dagli ioni metallici nell'accelerare l'idrolisi di esteri fosforici.

L'attivazione del fosfato verso l'idrolisi può avvenire in modo diretto per:

- attivazione come acido di Lewis, coordinando l'ossigeno del fosfato
- attivazione nucleofila, coordinando un nucleofilo, come uno ione idrossile
- attivazione del gruppo uscente mediante coordinazione dell'ossigeno

e in modo indiretto per:

- catalisi basica generale da parte di un idrossido coordinato dal metallo
- catalisi acida generale da parte di una molecola di acqua coordinata
- interazione elettrostatica tra il metallo e il fosfato.

Quando due ioni metallici si trovano vicini (distanza tra 3 e 5 Å) essi possono agire in maniera simultanea a dare una doppia attivazione di Lewis, oppure un'attivazione di Lewis unita ad

un'attivazione del nucleofilo o del gruppo uscente, con un'accelerazione complessiva della reazione molto forte che può teoricamente arrivare a 10^{18} volte [37].

Nei sistemi artificiali quindi per ottenere reattività elevate due ioni metallici vengono complessati in modo da trovarsi vicini tra loro, ad esempio mediante leganti a ponte (figura 1.21). [38].

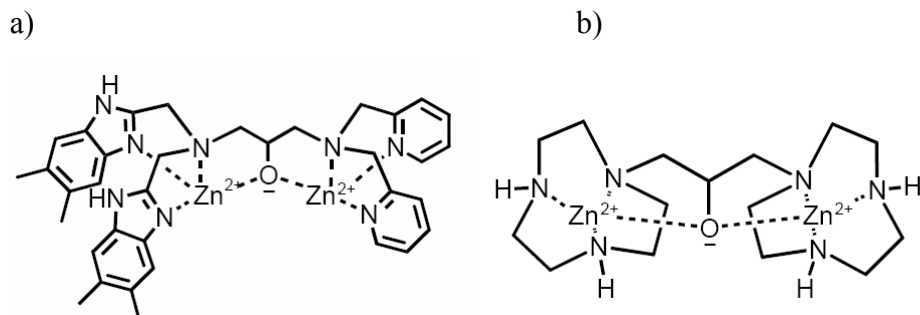


Figura 1.21 Complessi dinucleari attivi nell'idrolisi di diesteri fosforici a) [39]; b) [40]

Oltre che da un secondo ione metallico, una maggiore attività può essere fornita anche da altri gruppi funzionali presenti nella posizione adatta [41]. Il complesso di zinco in figura 1.21 ad esempio catalizza l'idrolisi del bis-p-nitrofenilfosfato, con accelerazioni di 3000 volte rispetto all'idrolisi spontanea a pH 7.0. La presenza delle ammine sulle piridine aumenta la reattività di 230 volte rispetto al complesso che ne è privo.

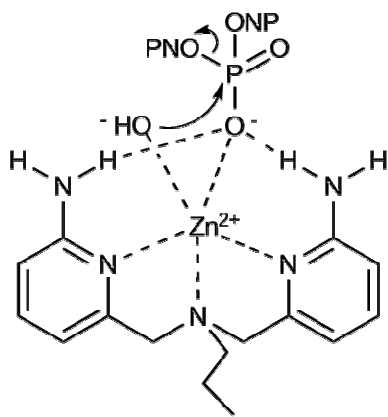


Figura 1.22 Catalizzatore dell'idrolisi del BNPP, meccanismo di reazione [41].

La prossimità tra i complessi metallici, necessaria alla cooperatività può essere indotta per un processo allosterico, ossia per una variazione conformazionale dovuta alla complessazione di un altro ione metallico. Ad esempio nel nostro gruppo sono stati studiati dei catalizzatori formati da una molecola di Tren (Tris(2-etilammino)ammina) funzionalizzata alle tre estremità con dei leganti per ioni Zn(II) [42]. Un quarto ione metallico può essere complessato dall'ammina terziaria al centro, questo evento provoca una modificazione della molecola per cui i tre complessi terminali si avvicinano, in tal modo le loro interazioni sono più efficaci e l'efficacia catalitica è maggiore (figura 1.22).

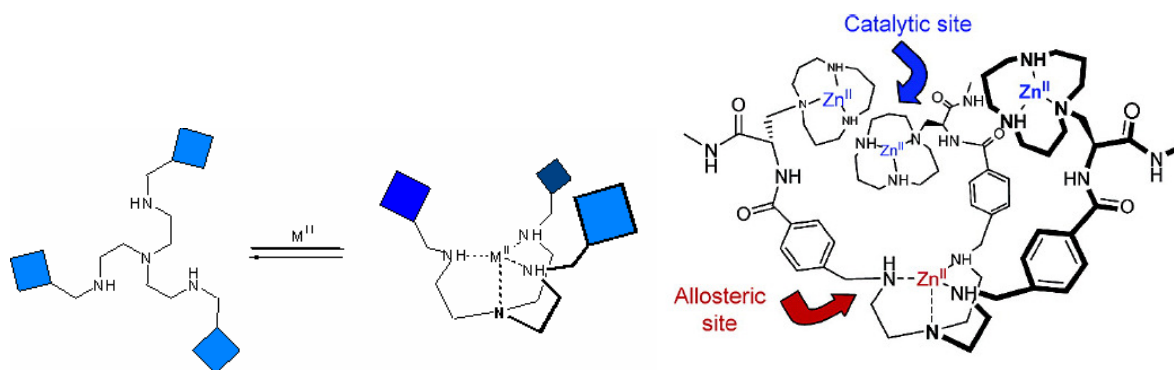


Figura 1.22 Modificazione allosterica per il Tren funzionalizzato.

Tale fenomeno è ben evidenziato dal confronto con una molecola analoga, in cui però la complessazione dello ione centrale viene impedita per acetilazione delle ammine secondarie. Il grafico della velocità di idrolisi al variare della quantità di Zn^{2+} presente, evidenzia la differenza tra i due sistemi, e l'instaurarsi di un meccanismo cooperativo per il legante allosterico (figura 1.24).

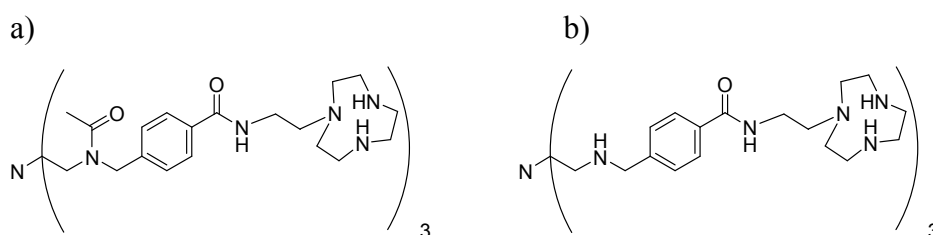


Figura 1.23 Leganti a base di Tren per $Zn(II)$ a) non allosterico, b) allosterico.

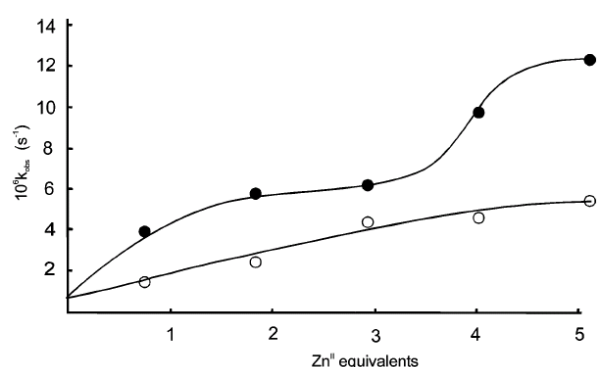


Figura 1.24 Costanti cinetiche per l'idrolisi dell'HPNPP al variare della quantità di Zn^{2+} .

Un'altra strategia può essere quella di unire un gran numero di complessi metallici in una struttura multivalente. Ad esempio nel nostro gruppo di ricerca sono stati studiati dei dendrimeri DAB funzionalizzati con complessi di zinco (figura 1.25) [43].

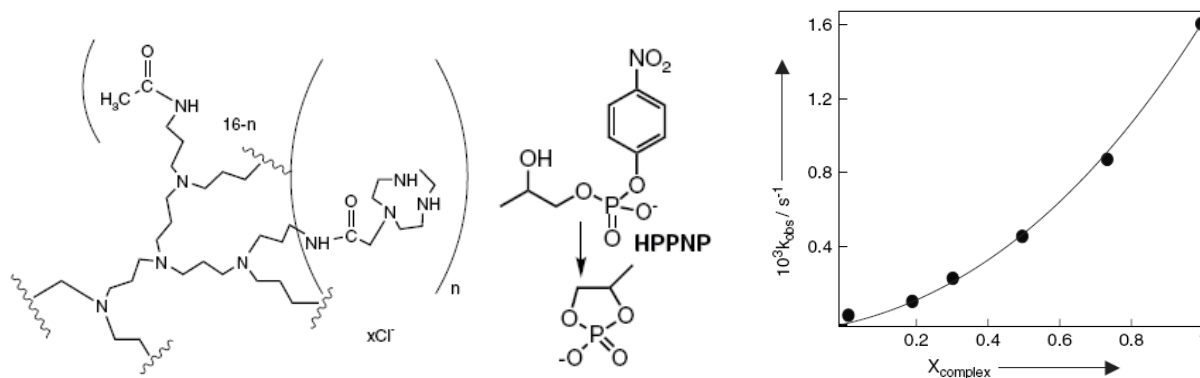


Figura 1.25 Dendrimeri DAB-Tacn a vari gradi di funzionalizzazione, variazione della costante catalitica al crescere della % di Tacn [43].

Come legante è stata usata una poliammina ciclica, il triazaciclononano, questo etere corona azotato ha la capacità di complessare fortemente gli ioni Zn^{2+} , che possono agire ai fini della catalisi. Il substrato utilizzato è stato l'HPNPP, questa può essere considerato un sistema modello dell'RNA, in quanto analogamente l'idrolisi avviene per attacco nucleofilo intramolecolare da parte di un idrossile. In seguito all'idrolisi si libera p-nitrofenolo che è rivelabile per via spettrofotometrica, rendendo più semplice seguire la cinetica di idrolisi rispetto all'RNA o agli oligonucleotidi. Sono stati testati dendrimeri con diversi gradi di funzionalizzazione, e si è riscontrato che l'attività catalitica aumenta in modo non lineare al crescere della percentuale di complesso metallico presente sul dendrimero. L'evidenziarsi di un effetto dendrimerico di questo tipo, indica chiaramente l'effetto cooperativo tra i gruppi metallici. Attività molto elevate si sono ottenute poi legando tioli funzionalizzati con il Tacn a nanoparticelle d'oro (figura 1.26) [44]. Anche in questo caso l'interazione dei gruppi metallici posti vicini sulla superficie del nanocluster fornisce un forte incremento della reattività. Un'evidenza della cooperatività è data dall'andamento sigmoidale dell'attività catalitica in funzione della quantità di ione metallico presente.

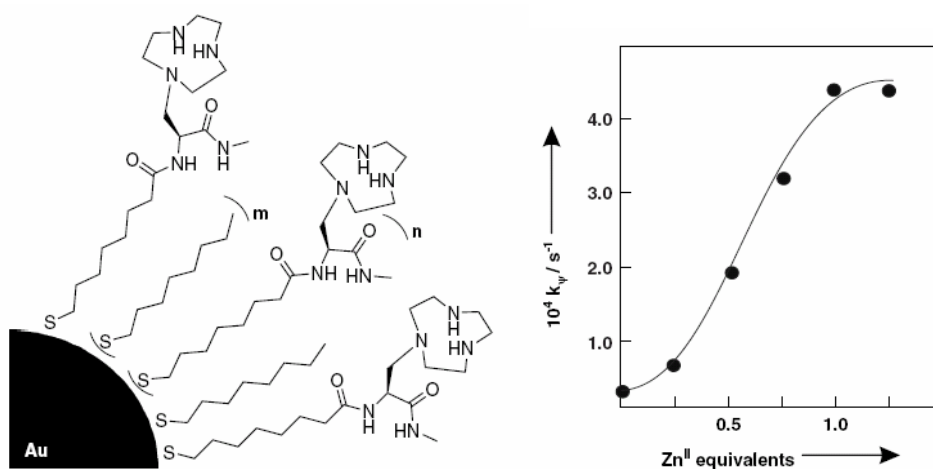


Figura 1.26 Nanoparticelle d'oro ricoperte con Tacn-tiolo/ ottantiolo 50:50, variazione della costante catalitica per l'idrolisi dell'HPNPP al variare della quantità di Zn^{2+} presente [44].

2 SINTESI E STUDIO DI SISTEMI MULTIVALENTI SU FASE SOLIDA

2.1 INTRODUZIONE

Come visto nella parte introduttiva la sintesi di strutture multivalenti funzionalizzate è di cruciale importanza per un'ampia varietà di possibili studi ed applicazioni. Tra le metodologie sintetiche possibili, la più comune è quella di legare ad un'opportuna struttura multivalente preformata, mediante una reazione di coupling, i gruppi funzionali desiderati. Dal momento che allo scaffold vanno legate molteplici unità, il cui numero può essere anche grande, come nel caso dei dendrimeri, è importante che la reazione di coupling sia il più possibile quantitativa. In caso contrario si avranno sottoprodotti di derivatizzazione parziale, che oltre ad abbassare la resa, possono rendere anche molto difficoltosa la purificazione del prodotto voluto, in quanto ad esso molto simili. In ogni caso solitamente per spingere a completezza la reazione si utilizza di solito un eccesso dei reagenti, da cui sarà necessario separare il prodotto.

Una tecnica che può offrire interessanti vantaggi per questi sistemi è la sintesi su fase solida. In questa metodica il prodotto viene formato e modificato legato a beads di resina, le successive fasi della sintesi vengono effettuate aggiungendo i reagenti in soluzione e, terminata la reazione filtrando via la fase liquida e lavando la fase solida. In questo modo i reagenti e i sottoprodotti della reazione vengono eliminati, mentre il prodotto desiderato rimane legato alla resina. Solo quando la sintesi è terminata il prodotto viene staccato, mediante un'apposita reazione, dalla fase solida e recuperato in forma pura, o comunque più semplice da purificare. Un vantaggio utile nel caso di strutture multivalenti è quello di poter utilizzare un grande eccesso di reagenti, quindi spingere la reazione a completezza, in quanto i reagenti non reagiti vengono eliminati semplicemente per lavaggio. Inoltre questa tecnica permette di introdurre una grande varietà di gruppi diversi, utilizzando la stessa procedura sintetica, in quanto presenta meno problemi di solubilità e compatibilità. Questo permette quindi di effettuare studi di tipo combinatoriale, variando i gruppi legati allo scaffold, e anche di inserire più gruppi insieme, ottenendo sistemi multivalenti eterofunzionali.

La nostra ricerca si è rivolta quindi a mettere a punto una metodica sintetica per funzionalizzare scaffold multivalenti, sfruttando la sintesi su fase solida. In particolare ci siamo concentrati su molecole simmetriche dotate di più gruppi amminici, e su dendrimeri di piccole dimensioni, sempre recanti ammine terminali. L'idea di base è stata quella di attaccare questi scaffold alla resina, e quindi eseguire la funzionalizzazione, in modo da ottenere una reazione quantitativa. Una volta

2 - SISTEMI MULTIVALENTI SU FASE SOLIDA

filtrata e lavata la resina si avrà il prodotto legato alla fase solida, da cui può essere staccato ottenendolo in forma pura senza necessità di particolari purificazioni (figura 2.1).

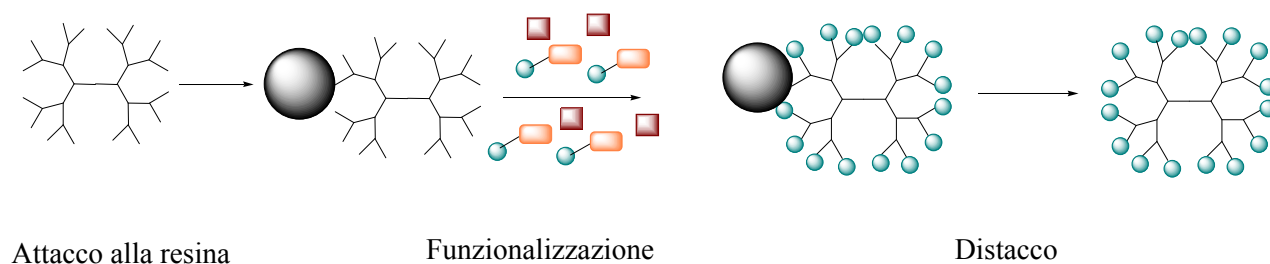


Figura 2.1

Tale procedura deve però tenere conto di alcune complicazioni che derivano dall'utilizzo di sistemi multivalenti (figura 2.2). In primo luogo se lo scaffold viene attaccato alla fase solida tramite una delle sue ammine terminali, questa ammina non sarà disponibile per la successiva funzionalizzazione, per cui il prodotto finale non sarà simmetrico ma presenterà vacanze. Inoltre l'attacco alla resina potrà avvenire mediante più gruppi terminali, che reagiscono con siti attivi della fase solida vicini tra loro. Vi potranno essere quindi più modalità di attacco, che portano alla fine a diversi prodotti con diversi gradi di derivatizzazione.

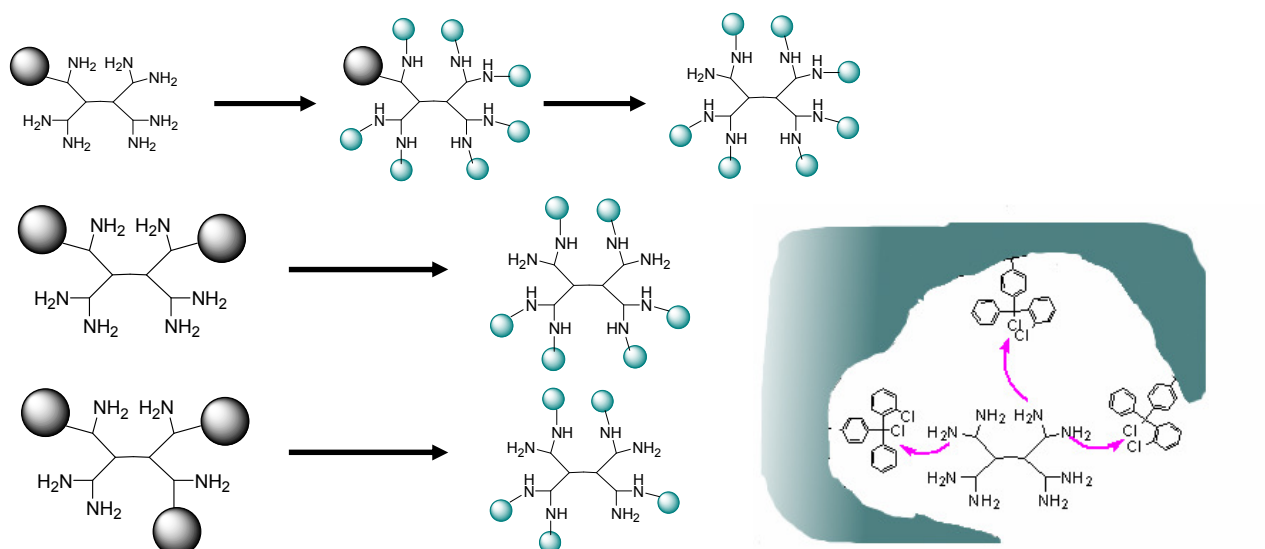


Figura 2.2

Per superare questi inconvenienti è stata quindi studiata una procedura di sintesi che permette di eseguire la funzionalizzazione degli scaffold, ottenendo alla fine dei composti simmetrici (figura 2.3) [45].

Per prima cosa la poliammina non viene legata direttamente alla fase solida, ma alla resina viene attaccato un amminoacido che funge da linker, e al quale viene legato lo scaffold. Questo attacco, come visto, può avvenire con diverse modalità, in seguito comunque le ammine dello scaffold che non hanno reagito vengono fatte reagire con l'amminoacido che funge da linker, in tal modo viene ricreata la simmetria del composto. La funzionalizzazione desiderata viene quindi eseguita per coupling sulle ammine in α del linker, il prodotto viene poi staccato dalla resina, ottenendo lo scaffold multivalente funzionalizzato con il linker e un qualunque gruppo.

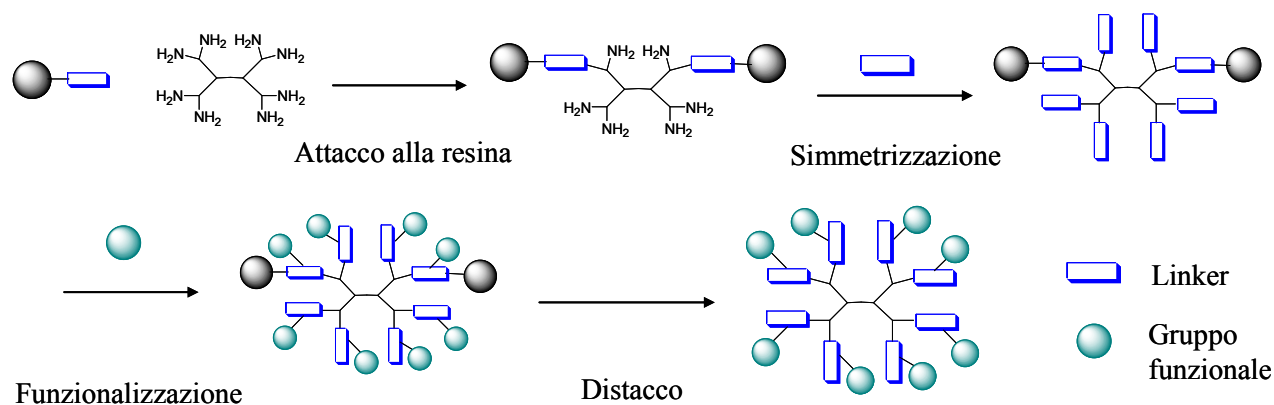
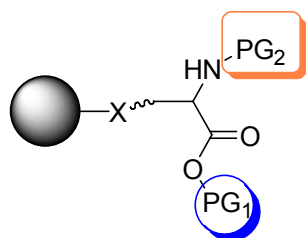


Figura 2.3

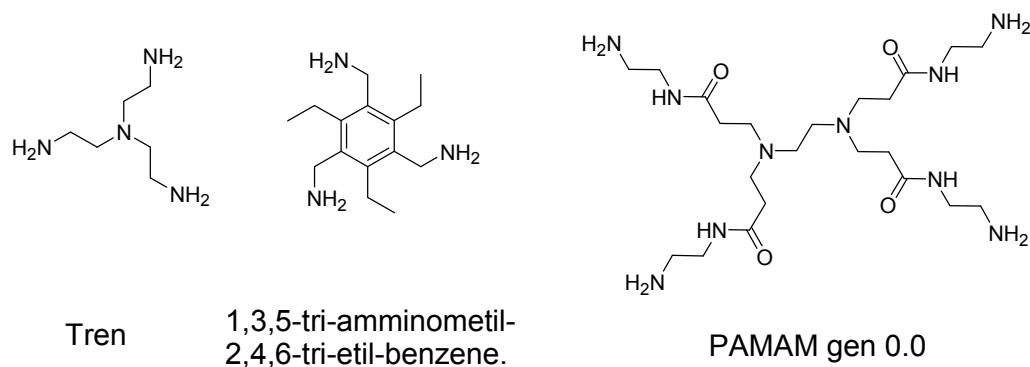
Una procedura di questo tipo richiede una scelta dell'amminoacido da usare come linker, in base al tipo di resina che si intende utilizzare. L'attacco del linker avviene tramite il gruppo funzionale in catena laterale dell'amminoacido, mentre il gruppo carbossilico viene utilizzato per il legame con la poliammina, infine l'ammina in α viene fatta reagire con il gruppo funzionale da inserire. Questi tre gruppi devono quindi poter reagire in successione, è necessario quindi che l'acido e l'ammina siano inizialmente bloccati con gruppi protettori ortogonali (schema 2.1), ossia che possono essere sbloccati in modo indipendente tra loro, e senza provocare il distacco del composto dalla resina [46].



Schema 2.1

La nostra ricerca ha previsto l'utilizzo di due diversi tipi di resine: una di tipo Cl-tritile, e una del tipo Rink-ammide. La scelta della resina può essere dettata anche dal tipo di prodotto che si vuole ottenere: a seconda del tipo di legame con la fase solida, in seguito al distacco si possono formare

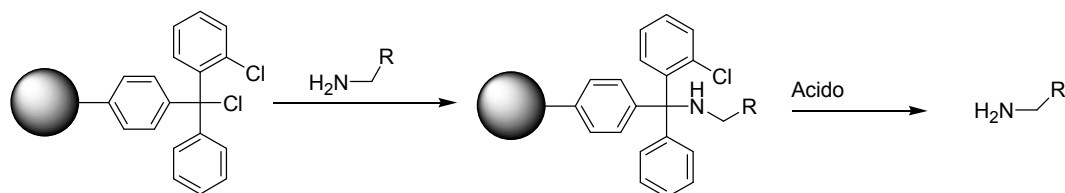
diversi gruppi terminali. Nel nostro caso per la resina Cl-tritile lo sblocco libera un gruppo amminico, mentre per la Rink si ottiene un'amide. Come scaffold per il nostro studio sono state utilizzate due diverse triammine simmetriche (schema 2.2): una di tipo alchilico, la tris(2-amminoetil)ammina (Tren), che presenta una certa flessibilità, e una di tipo aromatico, l'1,3,5-triamminometil-2,4,6-trietil benzene, con una struttura più rigida. Inoltre è stata provata la funzionalizzazione di un piccolo dendrimero, il PAMAM di generazione 0, che porta quattro gruppi amminici.



Schema 2.2 Scaffold multivalenti utilizzati

2.2 SINTESI SU RESINA Cl-TRITILE

In questa procedura di sintesi la resina utilizzata è stata una resina polistirenica di tipo Cl-tritile, in cui l'attacco alla fase solida può essere effettuato per reazione diretta con un'ammina (schema 2.3). Lo sblocco finale avviene in condizioni acide, con la liberazione dell'ammina di partenza. Questa resina ha la caratteristica di avere un linker particolarmente labile, anche in condizioni acide blande si ha infatti il distacco dalla resina.



Schema 2.3 Resina Cl-tritile: reazioni di attacco e di sblocco.

E' importante quindi per il buon esito della sintesi porre attenzione a non porre la resina in ambiente acido, ma mantenere in tutti gli step di sintesi condizioni basiche, aggiungendo se necessario una base organica non nucleofila come la DIPEA.

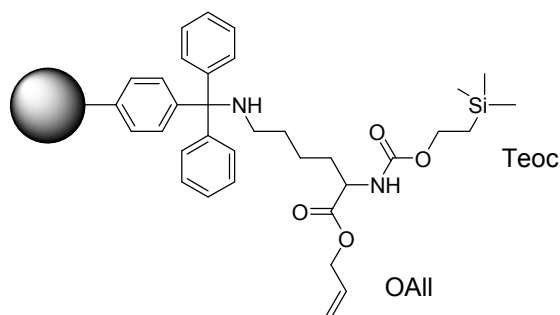
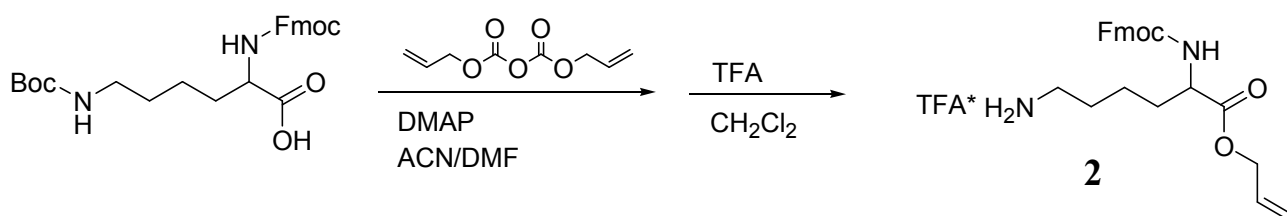


Figura 2.4 Linker Teoc-Lys-OAll.

Come linker è stata utilizzata una lisina, che è stata attaccata al gruppo tritile della resina tramite l'ammina in catena laterale (figura 2.4). Il gruppo carbossilico è stato protetto con un estere allilico: lo stacco dell'estere avviene per reazione catalizzata da un complesso di Pd(0), riformando l'acido carbossilico libero [47]. L'ammina in α è stata invece protetta mediante il gruppo Teoc ((trimetilsilil)-etossicarbonile), che risulta stabile in condizioni basiche e al trattamento con Pd, mentre è instabile in condizioni acide: il suo distacco può avvenire per reazione con ioni fluoruro [48].

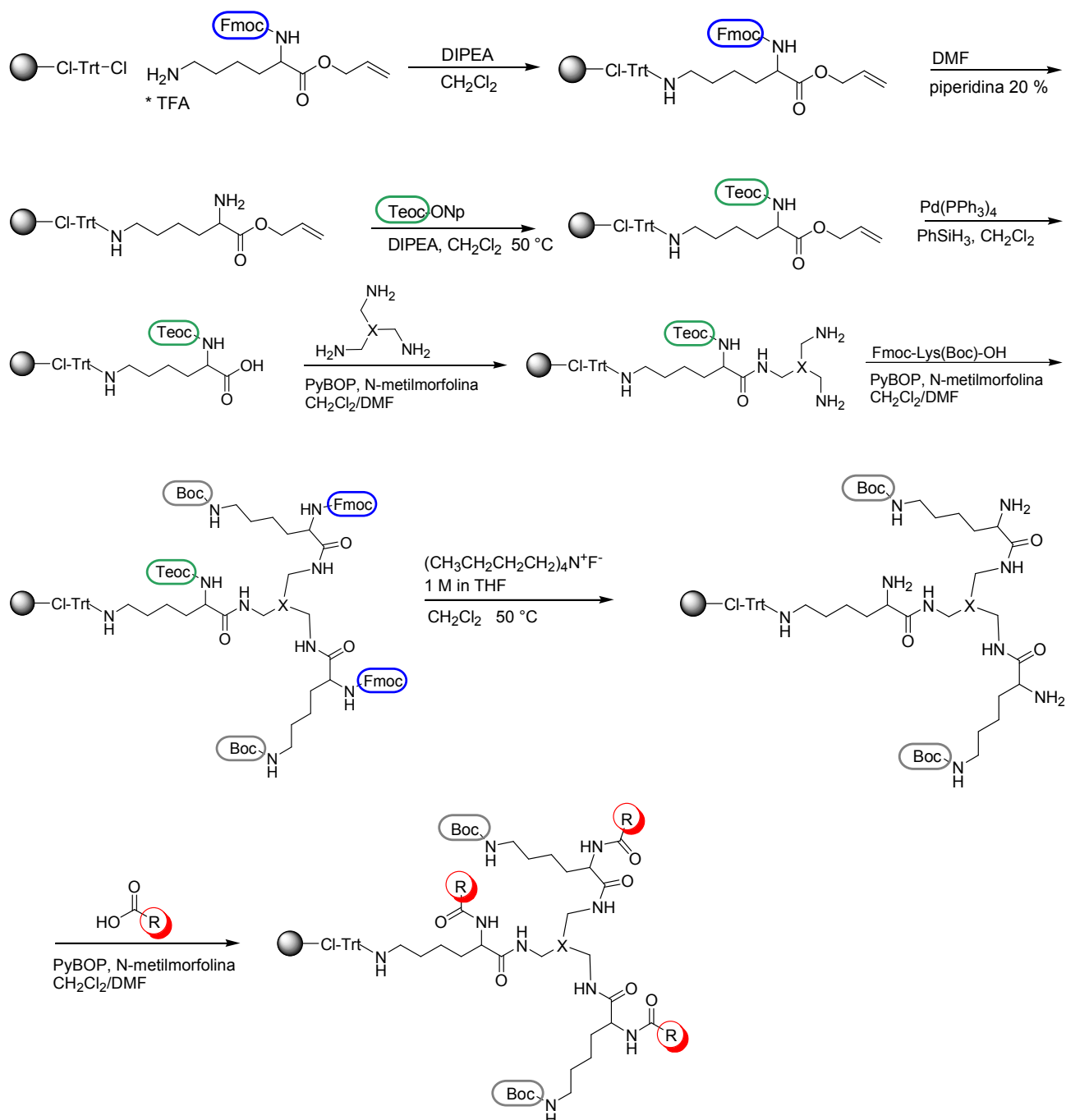
La lisina è stata attaccata sulla resina come Fmoc-Lys-OAll, questo amminoacido è stato sintetizzato a partire dalla Fmoc-Lys(Boc)-OH, per reazione del carbossile con diallilpirocarbonato, e successiva deprotezione del Boc sull'ammina ϵ con acido trifluoroacetico (schema 2.4).



Schema 2.4 Sintesi Fmoc-Lys-OAll.

Lo schema completo della procedura di sintesi è riportato in seguito [49].

2 - SISTEMI MULTIVALENTI SU FASE SOLIDA



Schema 2.5 Procedura sintetica per la funzionalizzazione di poliammine simmetriche su resina Cl-Trt.

La lisina viene attaccata alla resina per semplice aggiunta in condizioni basiche, per attacco nucleofilo dell'ammina in catena laterale al gruppo tritile. Quindi l'ammina α viene deprotetta dal gruppo protettore Fmoc, per trattamento con piperidina al 20 % in DMF. L'ammina libera viene poi derivatizzata con il gruppo protettore Teoc, mediante reazione con 4-nitrofenil 2-(trimetilsilil)etil carbonato (Teoc-ONp) (figura 2.5).

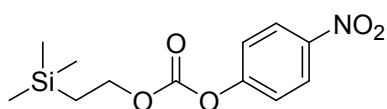
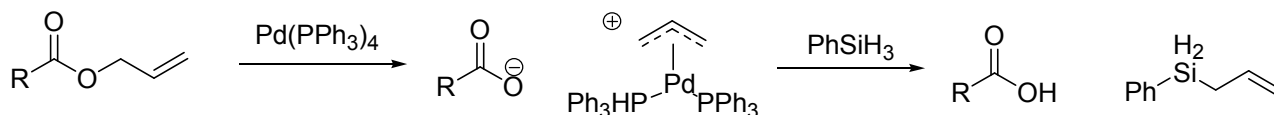


Figura 2.5

In seguito si deprotegge il gruppo carbossilico per reazione con catalizzatore di Pd(0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) in presenza di fenilsilano, che agisce da scavenger nei confronti del carbocatione allilico che si libera (schema 2.6).



Schema 2.6 Deprotezione estere allilico.

A questo punto viene effettuato il coupling della poliammina, in seguito all'attivazione del gruppo carbossilico sulla resina, tra i reagenti per attivare l'acido il più adatto si è rivelato il PyBOP. Il coupling da parte dello scaffold può avvenire anche più di una volta, come si può vedere se si effettua uno sblocco a scopo analitico a questo punto della sintesi (figura 2.6). Del resto la resina presenta un loading piuttosto alto (1.2 mmol/g) per cui la poliammina si trova a poter reagire con vari gruppi posti vicini.

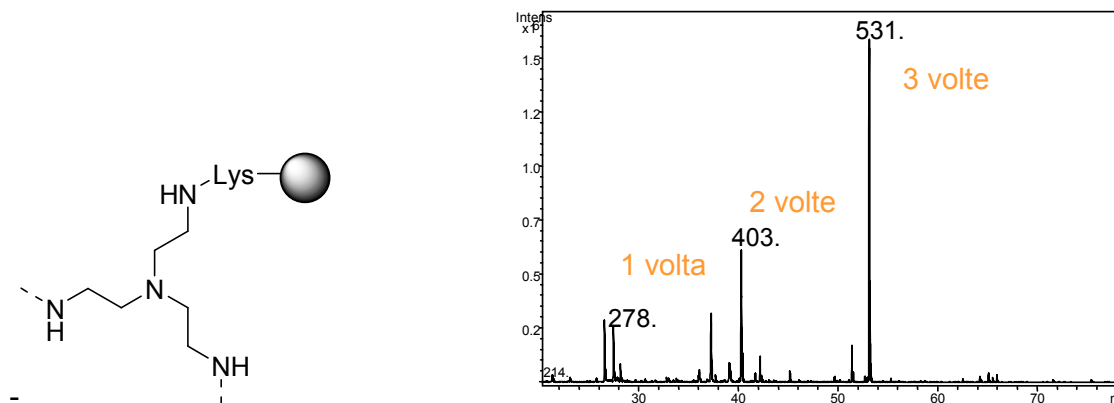


Figura 2.6 Tren legato alla fase solida. ESI-MS da sblocco analitico che evidenzia come sia favorito l'attacco multiplo

Le ammine dello scaffold che non hanno reagito, vengono quindi fatte reagire con la Fmoc-Lys(Boc)-OH, mediante un coupling attivato da PyBOP; in questo modo si ha la simmetrizzazione del sistema.

A questo punto della sintesi si sono sbloccate le ammine in α delle lisine per la successiva funzionalizzazione: la deprotezione è avvenuta per mezzo di ioni fluoruro, che agiscono sia sul gruppo Teoc legato al linker, sia sul gruppo Fmoc sulle lisine non legate alla resina. E' importante che la deprotezione sia completa, altrimenti il coupling successivo non potrà avvenire e si avranno

dei sottoprodotti mancanti di uno o più gruppi. Inizialmente la deprotezione è stata effettuata con tetrabutylammonio fluoruro per 4 h a 25 °C, ma dall'analisi del successivo prodotto finale, si è visto che la reazione non è completa. Quindi si è provato a sostituire la fonte di ioni fluoruro, usando TAS-F (tris(dimetilammino)solfuro di trimetilsilildifluoruro), e allungando i tempi di reazione fino a 18 h, ma l'esito della prova è stato negativo. Una deprotezione completa è stata ottenuta invece usando TBAF, scaldando a 50 °C per 18 h.

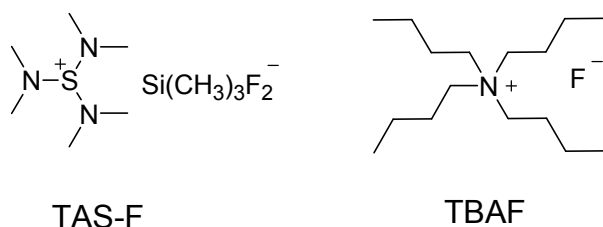


Figura 2.7 Reagenti utilizzati per la deprotezione del gruppo Teoc.

La funzionalizzazione finale avviene per coupling amidico sulle ammine, mediante attivazione dell'acido con HBTU e HOBT, come acido per le nostre prove abbiamo utilizzato la N-Acetil-fenilalanina, in modo da potere analizzare meglio i prodotti con HPLC.

Alla fine il composto viene staccato dalla resina per trattamento con acido trifluoroacetico, in presenza di triisopropilsilano, che agisce da scavenger per i carbocationi che si vengono a formare durante la reazione di sblocco.

La procedura si è rivelata efficace per la sintesi di strutture tripodali funzionalizzate, ad esempio derivati del Tren (figura 2.8). La sintesi permette di ottenere i prodotti desiderati con buona resa e purezza, senza la necessità di ulteriori purificazioni in seguito allo sblocco dalla resina [49].

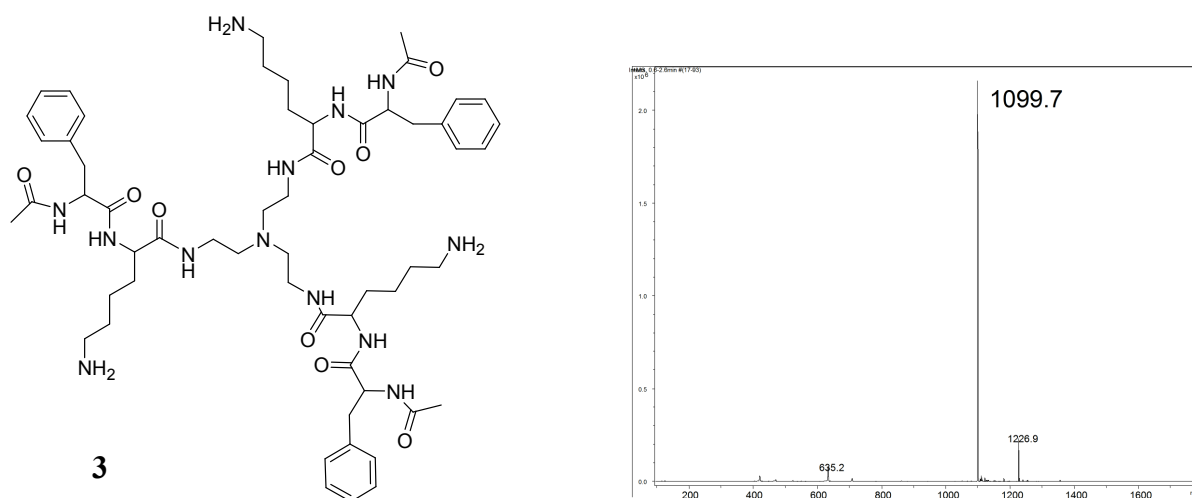


Figura 2.8 Tren(LysPhe-NAC)₃ e relativo spettro ESI-MS (prodotto non purificato).

Con la stessa metodica è stato funzionalizzato anche un dendrimero di piccole dimensioni: il PAMAM gen 0.0 che presenta 4 gruppi amminici terminali (figura 2.9). In questo caso la sintesi, per quanto riuscita con discreta resa, si è rivelata più difficoltosa, questo indica che la metodica da noi messa a punto, se funziona bene con sistemi piccoli, potrebbe non rivelarsi del tutto efficace con scaffold di dimensioni e valenza elevata. In questi casi infatti le reazioni di coupling e di deprotezione del Teoc sono più difficili da portare a completezza, il che causa la formazione di un maggior numero di sottoprodotti.

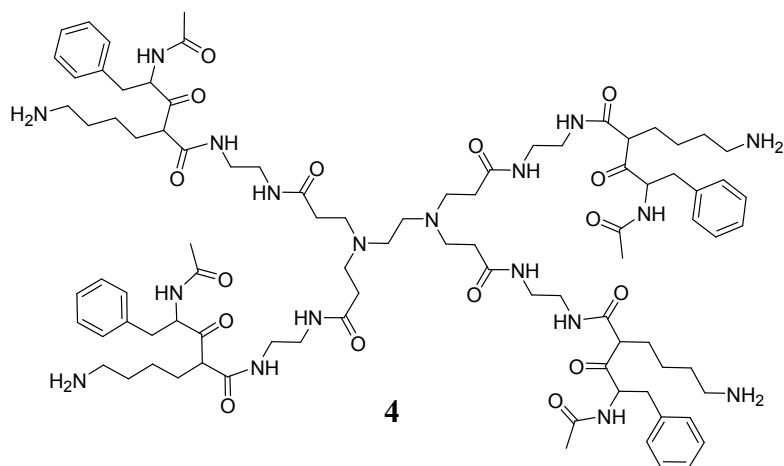
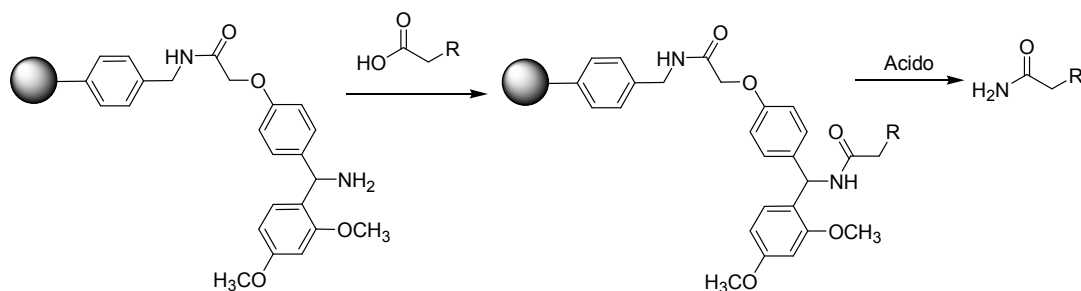


Figura 2.9 PAMAM(LysPhe-NAc)₄.

2.3 SINTESI SU RESINA RINK-AMMIDE

Una metodica sintetica simile alla precedente è stata messa a punto utilizzando una diversa fase solida, una resina polistirenica di tipo Rink-ammide.

Questa resina presenta un linker con un gruppo amminico legato ad un difenilmetano, a cui può essere attaccato per coupling peptidico un gruppo carbossilico. Lo sblocco avviene per reazione con acido, e non comporta la riformazione dell'acido originario, la scissione infatti avviene con formazione di un carbocatione del difenilmetano, e la liberazione di un gruppo ammidico (schema 2.7).



Schema 2.7 Resina Rink-ammide: reazioni di attacco e di sblocco.

Questa procedura consente quindi di ottenere composti multivalenti funzionalizzati, in cui non sono presenti, come in precedenza, gruppi amminici derivati dal linker, ma gruppi ammidici.

Come linker in questo caso è stato utilizzato un acido aspartico, che è stato attaccato alla resina tramite il carbossile in catena laterale. Il gruppo acido è stato nuovamente protetto con un estere allilico, mentre per l'ammina in α è stato utilizzato un 4-metossitritile (Mmt), che può essere sbloccato mediante un trattamento acido blando (figura 2.10).

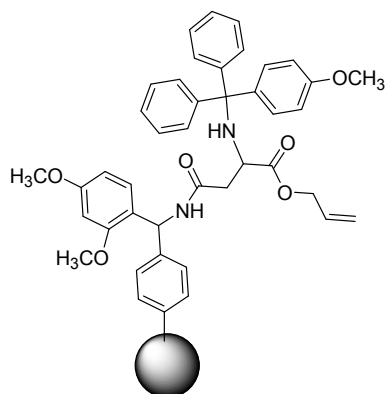
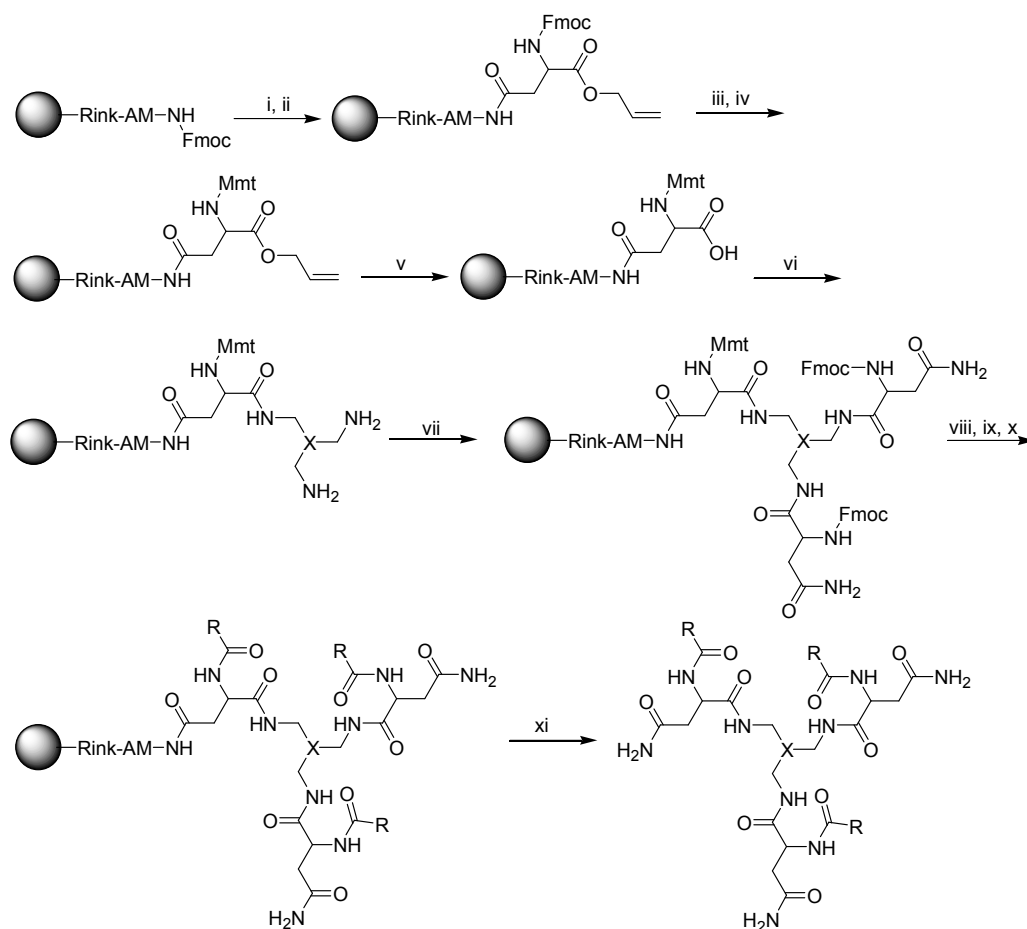


Figura 2.10 Linker Mmt-Asp-OAll.

Lo schema completo della procedura di sintesi è riportato in seguito.



Schema 2.8 Procedura sintetica per la funzionalizzazione di poliammine simmetriche su resina Rink-Am.

- i) DMF, piperidina 20 %; ii) Fmoc-Asp-OAll, HOBt, EDC, DIPEA, DMF/CH₂Cl₂;
 iii) DMF, piperidina 20 %; iv) Mmt-Cl, DIPEA, DMF/CH₂Cl₂; v) Pd(PPh₃)₄, PhSiH, CH₂Cl₂;
 vi) X(CH₂NH₂)_n, HBTU, HOBT, NMM, DMF/DCM; vii) Fmoc-Asn-OH, HBTU, HOBT, NMM, DMF/CH₂Cl₂;
 viii) DMF, piperidina 20 %; ix) CH₂Cl₂/TFE/Ac. Acetico 6:2:1;
 x) RCOOH, HBTU, HOBT, NMM, DMF/CH₂Cl₂; xi) TFA 80 %, CH₂Cl₂ 10 %, iPr₃SiH 9 %, H₂O 1 %.

Inizialmente lo Fmoc-Asp-OAll viene legato, mediante coupling ammidico del gruppo carbossilico in catena laterale, alla resina. Quindi il gruppo Fmoc sull'ammina viene staccato e sostituito con il gruppo metossitritile, per reazione in ambiente basico con il cloruro corrispondente (figura 2.11).

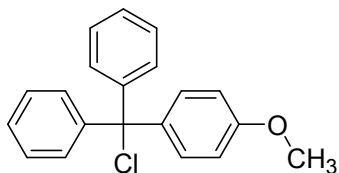


Figura 2.11

Quindi l'estere allilico viene deproteetto per scissione catalitica con Pd(PPh₃)₄, e viene effettuato il coupling tra l'acido libero e la poliammina. La simmetria viene ristabilita legando alle ammine rimaste libere una Fmoc-asparagina. A questo punto i gruppi protettori delle ammine, Mmt e Fmoc,

sono stati sbloccati in modo indipendente, il primo mediante un trattamento con una soluzione debolmente acida, per un tempo molto breve in modo da non provocare il distacco dalla resina, il secondo con l'usuale reazione con piperidina. A questo punto le ammine sono state funzionalizzate, con N-AcPhe, per coupling peptidico, e il prodotto è stato staccato con acido trifluoroacetico come già visto nel paragrafo precedente.

La procedura di sintesi è stata testata utilizzando come piattaforma il 1,3,5-tri-amminometil-2,4,6-tri-etil-benzene, ma i risultati ottenuti hanno evidenziato alcune problematiche.

A partire dallo stadio in cui lo scaffold viene legato alla fase solida se si effettuano degli sblocchi a scopo analitico, si osserva la formazione di sottoprodotti con un peso molecolare inferiore di 16 unità rispetto all'atteso (figura 2.12).

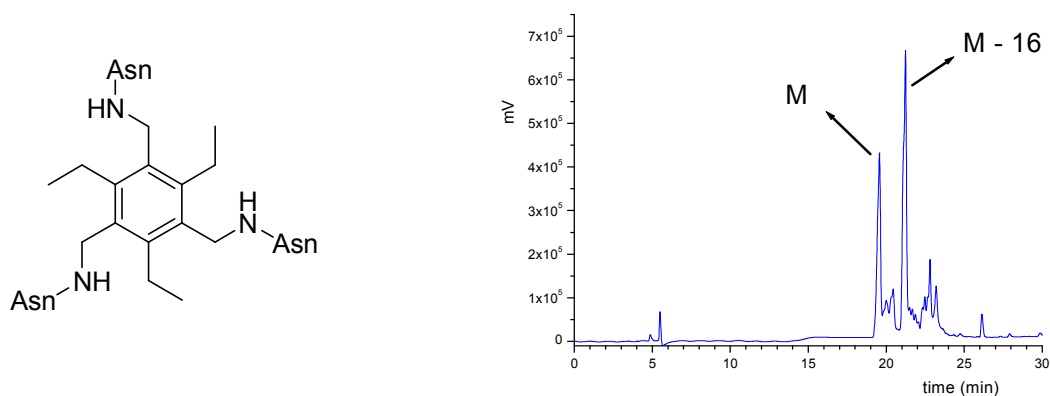


Figura 2.12 Prodotto sbloccato dopo lo stadio di simmetrizzazione e corrispondente HPLC.

Continuando con la procedura, al termine anziché il prodotto trifunzionalizzato atteso, si è ottenuto un prodotto in cui lo scaffold è stato funzionalizzato solo due volte, e che manca di 16 unità di massa (figura 2.13).

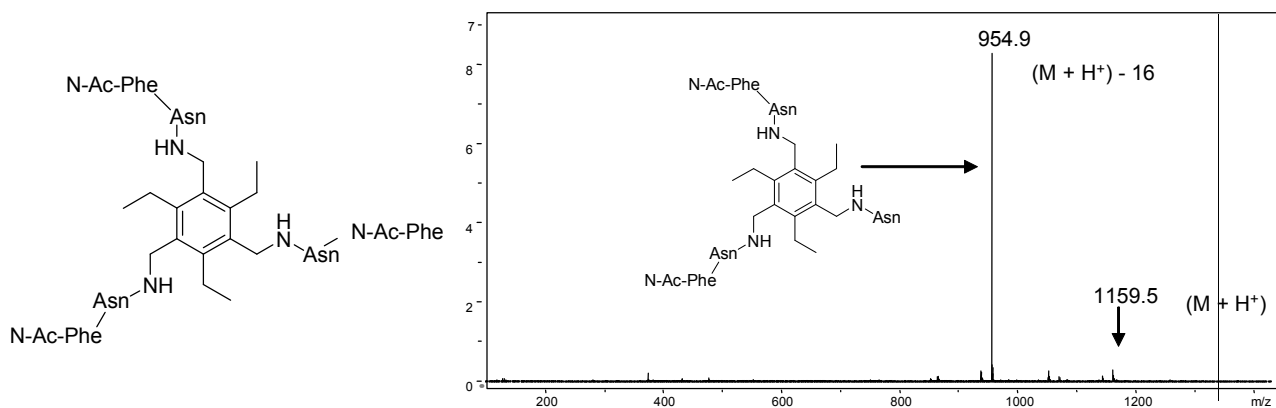


Figura 2.13 Prodotto atteso e spettro ESI-MS ottenuto.

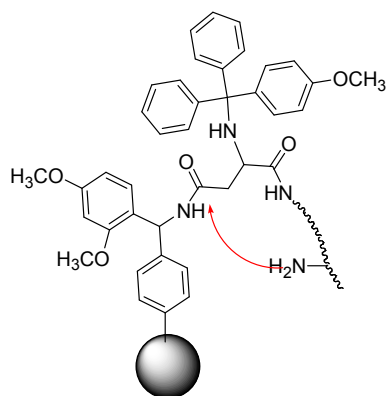


Figura 2.14 Possibile origine dei sottoprodotti.

L'origine e la natura di questi prodotti indesiderati non è ben chiara, i dati sembrano indicare che si tratti di prodotti di ciclizzazione a carico delle ammine libere, a quanto pare favoriti da un ambiente acido (figura 2.14). Tuttavia i tentativi effettuati per ovviare a questo problema, come quello di invertire l'ordine di deprotezione dei gruppi Fmoc e Mmt, non hanno avuto esito favorevole.

In conclusione la metodica per la funzionalizzazione in modo simmetrico di scaffold multivalenti è stata applicata con due diversi tipi di fase solida, con risultati differenti. Sulla resina Cl-tritile la procedura si è dimostrata applicabile e ha permesso di ottenere con buona resa e purezza i prodotti desiderati. Al contrario con la resina Rink-AM si sono riscontrati dei problemi, per la formazione di sottoprodotti nel corso della sintesi. Nel primo caso comunque il protocollo sintetico, utile ed interessante per scaffold a bassa valenza, risulta più problematico per sistemi con un maggior numero di gruppi, come nel caso di dendrimeri ($n > 4$).

Visto che era nostro interesse studiare l'effetto dell'aumento della valenza sull'attività di dendrimeri funzionalizzati, siamo quindi passati a metodi di sintesi diversi. In particolare abbiamo effettuato la derivatizzazione di strutture multivalenti ramificate già supportate su fase solida, studiando quindi un sistema di tipo eterogeneo (capitolo 2.4). In seguito siamo invece passati a studi in fase omogenea, non funzionalizzando sistemi preformati, ma sintetizzando dendrimeri di tipo peptidico, utilizzando la sintesi su fase solida (capitolo 3).

2.4 DENDRIMERI SUPPORTATI SU FASE SOLIDA

2.4.1 SINTESI

Per lo studio degli effetti cooperativi in dendrimeri funzionalizzati sono stati inizialmente utilizzati sistemi dendrimerici supportati su fase solida. Questa scelta è stata dettata per prima cosa da motivi di praticità e velocità sintetica: sono infatti commercialmente disponibili resine recanti strutture ramificate multivalenti, che possono essere derivatizzate mediante un semplice passaggio sintetico, sfruttando i vantaggi della sintesi su fase solida. Inoltre questi sistemi risultano interessanti per effettuare studi di tipo combinatoriale, in quanto permettono di introdurre nelle medesime condizioni una grande varietà di funzionalità diverse, vi è quindi la possibilità di sviluppare sintesi e screening in parallelo su un gran numero di gruppi funzionali e di combinazioni tra gli stessi in modo veloce, allo scopo di individuare quale tra esse presenta l'attività maggiore. Utilizzando ad esempio piastre a pozzetti si può pensare di effettuare in serie la sintesi e il successivo screening senza necessità di purificazioni, ma semplicemente filtrando la miscela di reazione. Questi sistemi supportati presentano però, come vedremo, anche delle problematiche relative alla manipolazione della resina, all'analisi dei prodotti ottenuti, ed a fenomeni di diffusione e ripartizione fra fasi eterogenee.

Le resine scelte per gli studi sono del tipo Tentagel, costituite da un copolimero polistirene-polioissoetilene; questo polimero ha la caratteristica di un buon rigonfiamento in solvente organico, in cui viene condotta la sintesi, ma anche di una discreta affinità per solventi polari, che conferisce un sufficiente swelling anche in soluzione acquosa (figura 2.16), in cui invece verranno condotti i test cinetici, garantendo una sufficiente permeazione da parte delle molecole in soluzione.

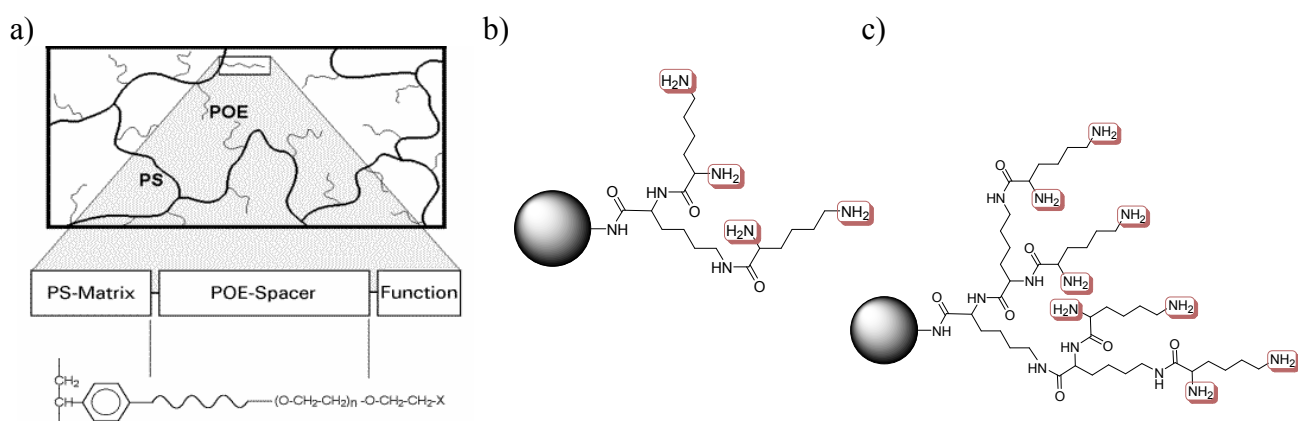


Figura 2.15 a) Struttura chimica della resina Tentagel, b) Resina MAP-4 deprotetta, c) resina MAP-8 deprotetta.

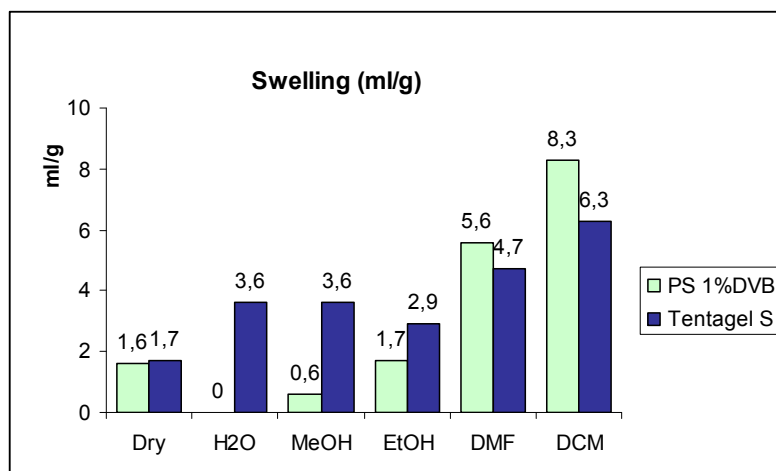
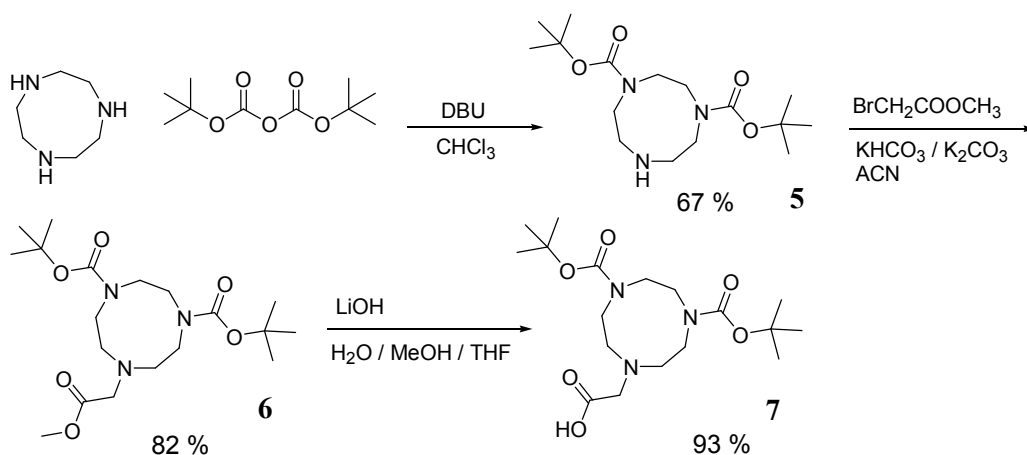
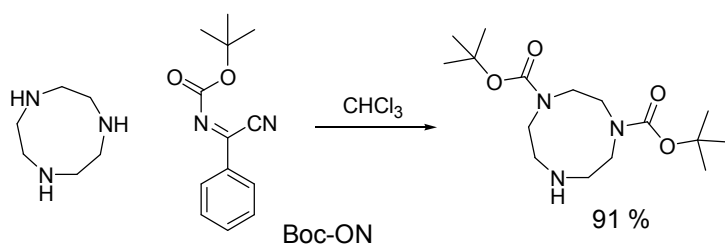


Figura 2.16 Rigonfiamento nei vari solventi per le resine Tentagel e per le resine polistireniche.

Le resine utilizzate presentano un diametro di 90 micron e sono del tipo MAP-4 e MAP-8, esse sono derivatizzate con delle strutture dendrimeriche a base di poli-lisina recanti rispettivamente 4 e 8 gruppi amminici, che possono essere sfruttati per la derivatizzazione (figura 2.15). Il termine MAP è l'acronimo di Multiple Antigenic System, infatti queste resine sono state sviluppate per la funzionalizzazione dei dendrimeri con peptidi per compiere studi di tipo immunologico [50]. I gruppi amminici sono inizialmente forniti commercialmente protetti mediante un gruppo Fmoc, quindi è necessario per prima cosa sbloccarli mediante trattamento con piperidina in DMF. Inoltre, misurando l'assorbanza della soluzione di sblocco a 301 nm, si può ricavare la quantità di gruppo Fmoc presente e quindi calcolare il loading effettivo della resina. La deprotezione viene ripetuta due volte, in modo da verificare, sempre per misura spettrofotometrica, che lo Fmoc non è più presente. I loading (in gruppi NH₂) misurati per le resine sono di 0.6 mmol/l per MAP-4 e di 0.8 mmol/l per MAP-8. In seguito le ammine possono essere funzionalizzati con un coupling peptidico con una funzione acida tramite una normale procedura per SPPS (schema 2.11). Le due resine sono stati fatti reagire con triazaciclononano derivatizzato con un gruppo carbossilico e protetto mediante Boc ai gruppi amminici. La sintesi di tale composto (schema 2.9) è stata effettuata a partire dal triazaciclononano commercialmente disponibile, che è stato protetto a due delle tre ammine con il gruppo Boc, il prodotto diprotetto può essere ottenuto in quantità prevalente rispetto al mono e al trisostituito aggiungendo lentamente 2 equivalenti di Boc-anidride al Tacn sciolto in cloroformio. Una procedura alternativa che dà risultati ancora migliori prevede l'uso anziché della Boc-anidride del reagente Boc-ON (schema 2.10). L'ammina libera viene quindi alchilata con bromoacetato di metile, quindi in seguito all'idrolisi dell'estere metilico in ambiente basico si ottiene l'acido carbossilico libero, che può essere fatto reagire via coupling peptidico con gruppi amminici.

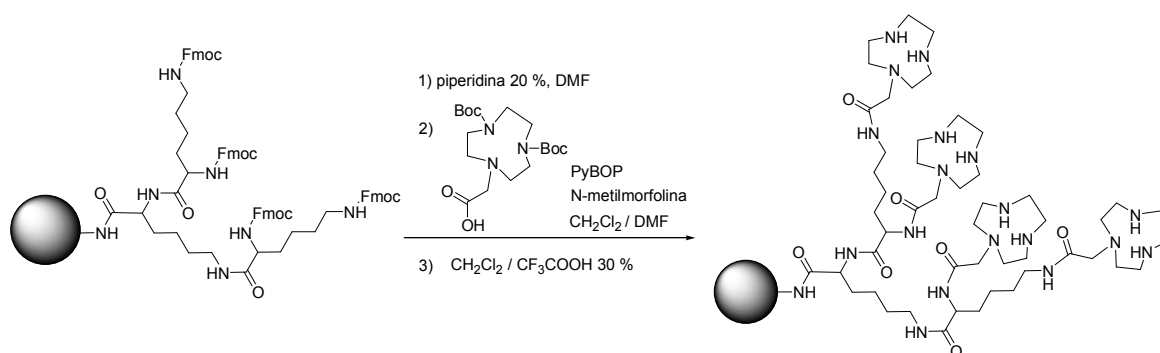


Schema 2.9 Sintesi dell'acido 2-(di-Boc)triazaciclonoan-acetico.



Schema 2.10 Metodo alternativo per la protezione di due delle tre ammine del Tacn.

Poiché non è possibile il distacco del prodotto dalla resina, in quanto la struttura di polilisine è legata direttamente mediante un legame ammidico non labile al polimero, l'analisi della completezza della reazione deve essere effettuata basandosi su test di tipo colorimetrico. Nel nostro caso è stato utilizzato il Kaiser test (basato su ninidrina, fenolo e piridina, in caso di presenza di ammine libere la resina si colora di blu) e la reazione con fluoresceina tioisocianato (se sono ancora presenti ammine libere la resina diventa fluorescente). Prima di procedere ai test catalitici è stata effettuata la deprotezione delle ammine del triazacyclononano con trattamento acido, per reazione della resina con acido trifluoroacetico al 30 % in diclorometano.

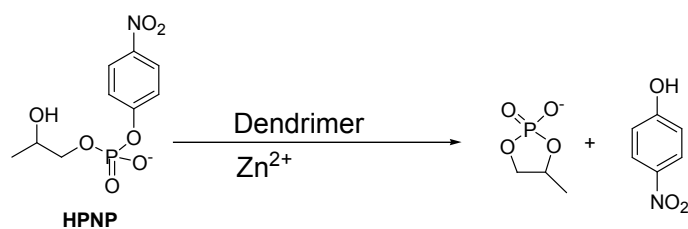


Schema 2.11 Funzionalizzazione di MAP-4 con Tacn

2.4.2 STUDI CINETICI

Per i successivi studi cinetici si è dovuta affrontare la problematica di come seminare nei pozzetti delle micropiastre, che vengono utilizzate per lo screening catalitico, quantità ben definite di resina, nell'ordine del centinaio di beads, che non possono essere misurate per pesata. A tale scopo è stata realizzata una sospensione il più possibile omogenea della resina in miscela acqua – etanolo 30 %, che è stata mantenuta gorgogliando, in modo vigoroso ma uniforme, mediante una cannula dell'aria. La proporzione tra acqua e etanolo è stata ottimizzata in modo che la resina rimanga a lungo in sospensione, ma nello stesso tempo le bolle di gas siano di piccole dimensioni. Mediante una micropipetta sono state prelevate porzioni della sospensione e inserite nei pozzetti, ottenendo una buona riproducibilità, dal controllo effettuato su una scansione ingrandita della piastra si è visto che l'errore medio è nell'ordine del 10 %. Noti il loading in moli/g della resina (ottenibile da misura di assorbanza della soluzione di sblocco dello Fmoc) e il n° di beads per grammo di resina (fornito dal produttore in $2.86 \cdot 10^6$ beads/g) è quindi possibile ottenere dal n° di beads prelevati la concentrazione di gruppi catalitici nei pozzetti. Negli esperimenti in seguito riportati sono stati usati dai 90 ai 250 beads per pozzetto, per concentrazioni di Tacn da 0.4 a $1.2 \cdot 10^{-4}$ M.

I test catalitici sono stati effettuati in soluzione acquosa a pH 7,0 in tampone HEPES, formando in situ il complesso metallico del triazaciclononano con l'aggiunta di una soluzione di Zn(II), quindi aggiungendo il substrato HPNPP e seguendo per via spettrofotometrica il decorso della reazione dalla formazione del p-nitrofenolo (schema 2.12).



Schema 2.12 Reazione di idrolisi dell'HPNPP.

Il primo esperimento è consistito nel misurare la velocità di idrolisi mantenendo costante la quantità di resina e aumentando via via la quantità di Zn(II); per confronto i test sono stati effettuati con le medesime concentrazioni di Zn(II) in assenza di resina. Quello che si osserva è innanzitutto che i metallodendrimeri legati alla resina presentano una buona attività catalitica, con una notevole accelerazione rispetto allo ione metallico non complessato; inoltre all'aumentare della quantità di zinco l'attività aumenta fino ad un equivalente di metallo rispetto al legante, in seguito l'aumento è minore e dovuto al contributo dello ione libero (figura 2.18). Nella figura 2.17 viene riportato un esempio dell'andamento di una cinetica: come si vede la differenza rispetto allo zinco semplice è

ben evidente. La formazione del prodotto avviene con un andamento sigmoidale, anziché un semplice esponenziale, in seguito si proverà a dare una spiegazione a questa forma; inoltre bisogna notare che in realtà l'assorbanza raggiunta alla fine della reazione è inferiore a quella attesa, come se una parte del prodotto fosse sequestrata e "nascosta".

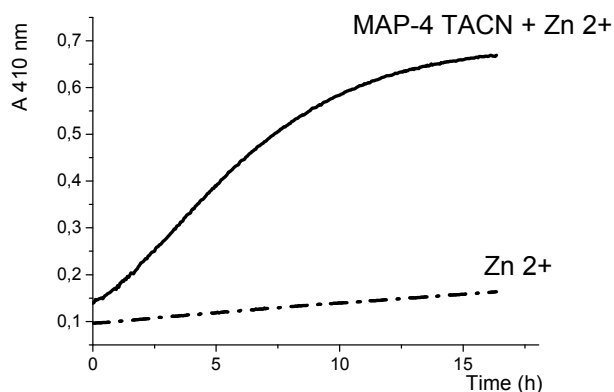


Figura 2.17 Cinetica di idrolisi dell'HPNPP, pH 7.0, 40 °C, [HPNPP] = $1.6 \cdot 10^{-4}$ M, [Tacn] = $0.8 \cdot 10^{-4}$ M.

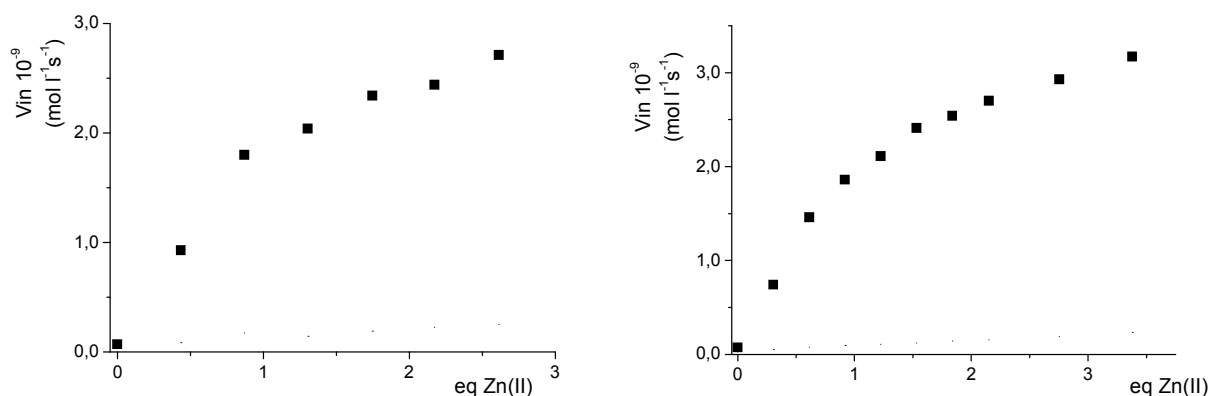


Figura 2.18 Velocità iniziali di idrolisi di HPNPP catalizzate da: a) MAP-4-Tacn*Zn b) MAP-4-Tacn*Zn in funzione di [Zn(II)]. Condizioni: [Tacn]= $7.5 \cdot 10^{-5}$ M (a), $5.3 \cdot 10^{-5}$ (b), [HPNPP] = $1.6 \cdot 10^{-4}$ M, [HEPES]= $1.6 \cdot 10^{-2}$ M, pH = 7.0, T = 40°C.

Mantenendo fissa la quantità di catalizzatore è stata quindi misurata la variazione della velocità di idrolisi all'aumentare della concentrazione di substrato, ottenendo quindi il profilo di saturazione per le due differenti generazioni di dendrimeri (figura 2.19). Il grafico può essere fittato secondo il modello della cinetica enzimatica di Michaelis-Menten, ottenendo i parametri catalitici k_{cat} e K_M (tabella 2.1).

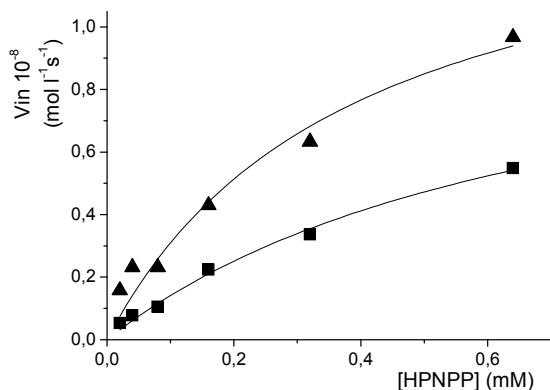


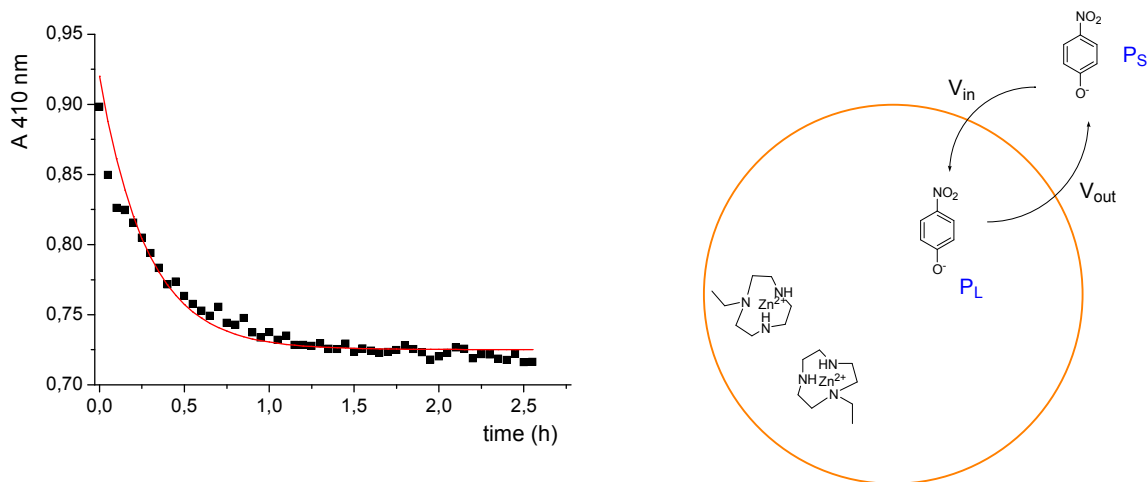
Figura 2.19 Velocità iniziali di idrolisi di HPNPP catalizzate da: MAP-4 (■), MAP-8 (▲); in funzione di [HPNPP]. Condizioni: [Tacn]= $4.3 \cdot 10^{-5}$ M (per MAP-4); $3.1 \cdot 10^{-4}$ M (per MAP-8); $[Zn^{2+}] = 1$ eq, [HEPES]= $1.6 \cdot 10^{-2}$ M, pH = 7.0, T = 40°C.

Tabella 2.1 Parametri di Michaelis-Menten per Tacn su Tentagel-MAP (da $V_{init} = k_{cat}[Tacn][HPNPP] / (K_M + [HPNPP])$)

	MAP-4	MAP-8
k_{cat} (s ⁻¹)	$2.7 \cdot 10^{-4}$	$3.5 \cdot 10^{-4}$
K_M (mol l ⁻¹)	$7.1 \cdot 10^{-4}$	$3.9 \cdot 10^{-4}$
k_{cat}/K_M (l mol ⁻¹ s ⁻¹)	0.37	0.89

Per prima cosa si nota come, a parità di concentrazione di Tacn il dendrimero MAP-8 sia più attivo rispetto al MAP-4, l'aumento della valenza della struttura multivalente ha quindi un effetto positivo sulla catalisi. Analizzando i parametri si vede che la costante cinetica k_{cat} aumenta poco all'aumento della valenza, il binding nei confronti del substrato, rappresentato dalla costante K_M , invece presenta un aumento significativo ed è il fattore che fa sì che l'efficacia catalitica k_{cat}/K_M del dendrimero MAP-8 sia più che doppia rispetto al MAP-4.

In precedenza si era osservato il particolare andamento sigmoidale delle curve cinetiche, seguendo ulteriori esperimenti variando la quantità di resina presente si sono riscontrati alcuni problemi: in particolare si è visto che si ha un assorbimento del *p*-nitrofenolo formatosi nell'idrolisi da parte dei beads di resina, con una assorbanza misurata in soluzione inferiore all'attesa. La presenza di contributi dovuti alla diffusione e alla ripartizione tra fasi eterogenee è anche osservabile nella forma della cinetica che appare sigmoidale anziché esponenziale (fig 2.17). Per analizzare anche da un punto di vista quantitativo il fenomeno sono stati effettuati degli esperimenti di diffusione del *p*-nitrofenolo in presenza della resina, ricavando in tal modo la velocità di diffusione tra soluzione e l'interno dei beads e la costante di ripartizione (figura 2.20).



$$k_{in} = 1.6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}, k_{out} = 7.9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}, K_{res} = k_{in} / k_{out} = 0.2$$

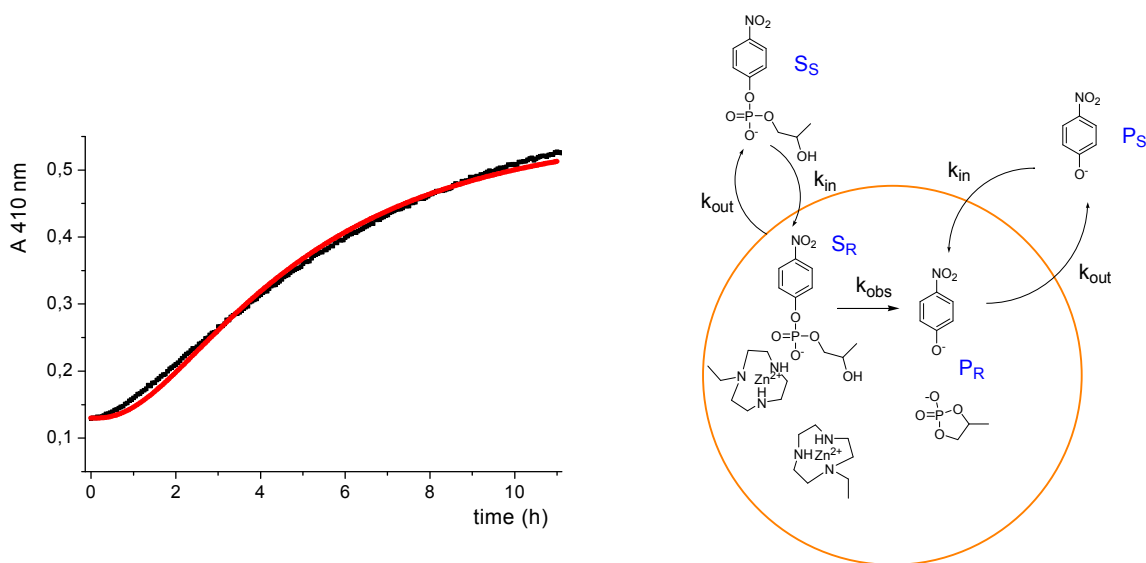
Figura 2.20 Cinetica dell'assorbimento del p-nitrofenolato da parte della resina Tentagel-MAP-4 e valori delle costanti ottenute dal fitting. $[PNP] = 1.6 \cdot 10^{-4}$, $[resina] = 150$ beads su $250 \mu\text{l}$

$$d[P_S]/dt = k_{out}[P_R] - k_{in}[P_S]$$

$$d[P_R]/dt = k_{in}[P_S] - k_{out}[P_R]$$

$$P_{TOT} = P_S + P_R \quad A(t) = \frac{P_S(t)}{P_S(t_0)} A(t_0)$$

Per tenere conto di questi effetti è stato utilizzato un modello cinetico che tenga conto della diffusione, inserendo i valori precedentemente ottenuti, e ipotizzando che essi siano uguali per l'HPNPP, l'andamento della cinetica è stato fittato, riproducendo l'andamento sigmoideale (figura 2.21).



$$k_{in} = 1.6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}, k_{out} = 7.9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}, k_{obs} = 1.4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

Figura 2.21 Cinetica di idrolisi dell'HPNPP, pH 7.0, 40 °C, $[HPNPP] = 5.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[Tacn] = 1.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[Zn^{2+}] = 1.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, e valori delle costanti ottenute dal fitting (per semplificazione si è assunto che le costanti di diffusione del HPNPP siano uguali a quelle del PNP).

$$d[P_S]/dt = k_{out}[P_R] - k_{in}[P_S][R]$$

$$d[P_R]/dt = k_{OBS}[S_R] + k_{in}[P_S][R] - k_{out}[P_R]$$

$$d[S_S]/dt = k_{out}[S_R] - k_{in}[S_S][R]$$

$$d[S_R]/dt = -k_{OBS}[S_R] + k_{in}[S_S][R] - k_{out}[S_R]$$

$$d[R]/dt = -k_{in}[S_S][R] + k_{out}[S_R] - k_{in}[P_S][R] + k_{out}[P_R]$$

$$A = A_0 + \varepsilon[P_S]$$

La costante catalitica ottenuta dal fitting risulta essere dello stesso ordine di grandezza delle costanti di diffusione, questo indica che la diffusione delle molecole inizia ad essere un fattore da tenere in conto per la velocità delle reazioni. Questo fatto pone delle limitazioni ai nostri studi in quanto, anche se le costanti sono ancora inferiori a quelle di diffusione, non sono molto lontane, per cui un catalizzatore più efficace potrebbe giungere ad essere sotto controllo diffusionale. In queste condizioni diventa difficile valutare differenze di attività tra diversi catalizzatori, e ottenere i reali parametri catalitici. Lo studio di sistemi a valenza ancora maggiore sarà quindi svolto passando da catalizzatori supportati a molecole in soluzione.

2.5 PARTE SPERIMENTALE

Reagenti e solventi

I reagenti e i solventi commerciali (Aldrich, Fluka, Acros, Iris Biotech) sono stati utilizzati senza particolari purificazioni. Per la sintesi su fase solida è stata utilizzata DMF peptide grade, anidrificata mediante setacci molecolari.

Le resine utilizzate sono state le seguenti:

Resina PS 2-Cl-tritil cloruro (Aldrich) loading: 1.2 mmol/g

Resina PS Rink-ammide (NovaBiochem) loading 0.65 mmol/g

Resina Tentagel MAP-4 (Iris Biotech) loading 0.4 mmol/g

Resina Tentagel MAP-4 (Iris Biotech) loading 0.6 mmol/g

Strumentazione

NMR: sono stati utilizzati gli strumenti Bruker 250 MHz e Bruker Advance 300 MHz.

ESI-MS: gli spettri di massa sono stati ottenuti con uno strumento Agilent LC/MSD Trap SL, dotato di uno spettrometro a trappola ionica, con metodo di FIA (flow injection analysis) e ionizzazione di tipo ESI +. Come eluente è stata utilizzata una miscela 50:50 di H₂O +0.1 % HCOOH e ACN + 0.1 % HCOOH.

HPLC: per l'analisi cromatografica è stato utilizzato un sistema Shimadzu con doppia pompa LC10AD e rivelatore UV-VIS SPD-10AD.

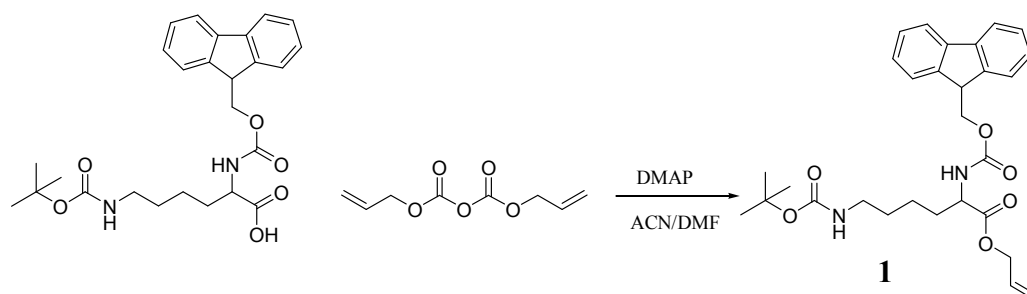
Spettrofotometria UV-VIS

Per la registrazione degli spettri UV-VIS si sono utilizzati gli spettrofotometri Perkin Elmer lambda 5, Perkin Elmer lambda 16 e Perkin Elmer lambda 45, equipaggiati con portacelle termostatati a circolazione d'acqua. Per le misure si sono usate celle di quarzo HELLMA con cammino ottico di 1.0 e 10 mm. Gli spettri si intendono registrati a 25 °C, se non diversamente indicato.

Le cinetiche sono state realizzate con strumento multiplate reader TECAN-infinite F200, dotato di filtri ottici per la selezione della lunghezza d'onda, di cui è stato utilizzato quello centrato a 405 (± 10) nm. Gli esperimenti sono stati svolti su piastre Greiner trasparenti a 96 pozzetti con fondo piatto da 250 µl.

2.5.1 SINTESI SU RESINA CI-TRITILE

Fmoc-Lys(Boc)-OAll (1)

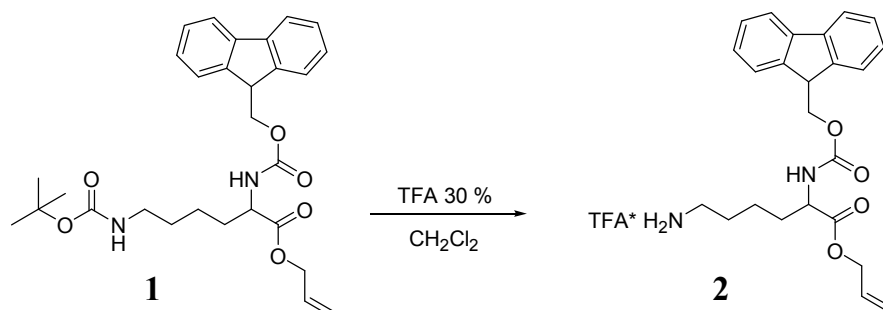


[51] (Takeda, K., *Tetr. Lett.* **1995**, *34*, 113-114.)

La Fmoc-Lys(Boc)-OH (5 g, 10.7 mmoli) è stata sciolta in 40 ml di acetonitrile, quindi sono stati aggiunti 120 mg di DMAP (1 mmole, 0.1 eq) e 10 ml di DMF per solubilizzare. Il diallilpirocarbonato (4 ml, 24 mmoli, 2.3 eq) è stato sciolto in 5 ml di ACN ed è stato aggiunto nell'arco di 30' mediante syringe pump. TLC: SiO₂ (CHCl₃) Rf: 0 (UV, reagente), 0.2 (UV + nin, prodotto), 0.8 (UV, impurezza). Dopo ulteriori 10' il solvente è stato evaporato e il residuo è stato sciolto in 30 ml di etile acetato. La soluzione è stata lavata con 3x30 ml di soluzione satura di NH₄Cl, anidrificata con Na₂SO₄, filtrata e portata a secco. Il prodotto è stato purificato mediante colonna cromatografica Flash (SiO₂, CHCl₃), ottenendo 4.0 g di solido bianco (resa 74 %).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.77 (d, 2H, H_{arom} Fmoc); 7.61 (d, 2H, H_{arom} Fmoc); 7.44-7.32 (m, 4H, H_{arom} Fmoc); 5.91 (m, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.42-5.25 (m, 2H, CH₂CH=CH₂); 4.65 (d, 2H, CH₂ Fmoc); 4.43-4.38 (m, 3H, CH₂CH=CH₂ + CH Fmoc); 4.23 (t, 1H, CH_α Lys); 3.12 (mb, 2H, CH₂ ε Lys); 1.90-1.71 (mb, 2H, CH₂ β Lys); 1.51-1.44 (s + mb, 13H, CH₂ δ + γ Lys + CH₃ tBu).

Fmoc-Lys-OAll*TFA (2)



4.00 g di Fmoc-Lys(Boc)-OAll (1) sono stati sciolti in 20 ml di diclorometano, quindi sono stati aggiunti 10 ml di acido trifluoroacetico. La reazione è proseguita per 3 h, poi la soluzione è stata

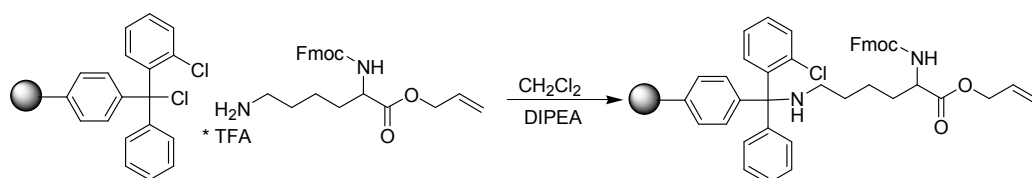
2 - SISTEMI MULTIVALENTI SU FASE SOLIDA

distillata sotto vuoto. L'olio rimasto è stato ricristallizzato con 5 ml di cloroformio e 200 ml di etere etilico a 0 °C, sono stati ottenuti 3.40 g di prodotto (resa 83 %).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 7.77 (d, 2H, H_{arom} Fmoc); 7.60 (d, 2H, H_{arom} Fmoc); 7.43-7.31 (m, 4H, H_{arom} Fmoc); 5.91 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.62 (d, 1H, NH); 5.35-5.23 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 4.63 (d, 2H, CH_2 Fmoc); 4.38 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ + CH Fmoc); 4.21 (t, 1H, CH α Lys); 2.95 (mb, 2H, CH_2 ϵ Lys); 1.83-1.69 (mb, 2H, CH_2 β + δ Lys); 1.51-1.44 (mb, 2H, CH_2 γ Lys).

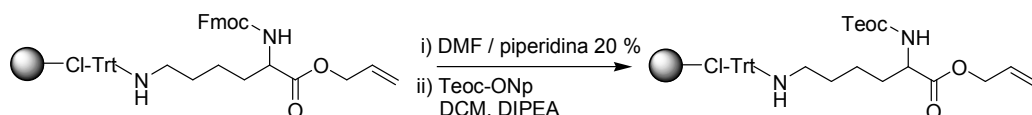
ESI-MS (m/z): 409.2 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1) Attacco N-Fmoc-Lys-OAll su resina



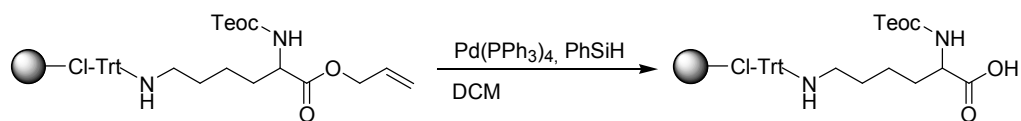
La resina è stata rigonfiata con CH_2Cl_2 per 30', quindi sono stati aggiunti 3 equivalenti (rispetto ad un loading fornito di 1.2 mmol/g) di Fmoc-Lys-OAll*TFA N sciolti in CH_2Cl_2 con il 10 % di DIPEA. La reazione è proseguita per 3 h, quindi la resina è stata filtrata e fatta reagire per 10' con una soluzione $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10 %/DIPEA 5 %, allo scopo di bloccare le funzionalità non reagite (capping). La resina è stata poi lavata 3x CH_2Cl_2 , 3xDMF, 3x CH_2Cl_2 . Una porzione pesata della resina è stata trattata con piperidina 20 % in DMF per 15', dalla lettura dell'assorbanza della soluzione di sblocco (ϵ fluorene = 7800) si ricava un loading di 1.0 mmol/g.

2) Scambio Fmoc - Teoc



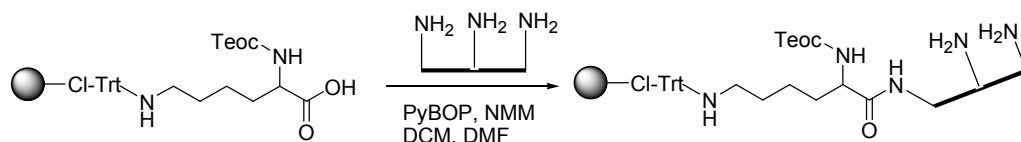
La resina è stata trattata per due volte con piperidina 20 % in DMF per 15', e quindi lavata 3xDMF, 4x CH_2Cl_2 . Sono stati quindi aggiunti 3.5 eq di Teoc-ONp sciolti in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DIPEA}$ 10 % e la reazione è proseguita 6 h a temperatura ambiente. La resina è stata lavata 3x CH_2Cl_2 , 3xNMP, 3x CH_2Cl_2 , quindi la reazione con Teoc-ONp è stata ripetuta per una notte.

3) Deprotezione estere allilico



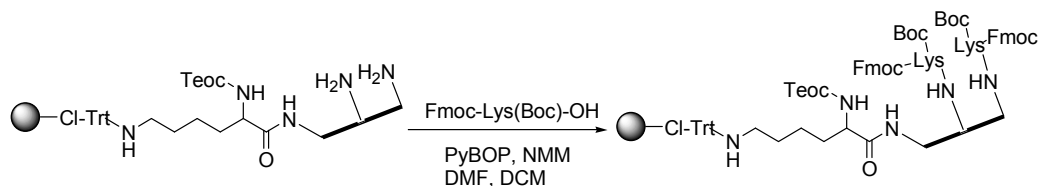
La resina è stata fatta reagire con 0.3 eq di $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ e 25 eq di fenilsilano sciolti in CH_2Cl_2 per 45', in un contenitore resistente alla pressione. In seguito la resina è stata lavata con $3 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2$, $3 \times \text{NMP}$, trattata 2 volte per 20' con NMP/DIPEA 20 %, e quindi lavata con $3 \times \text{NMP}$, $3 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2$.

4) Coupling con la poliammina



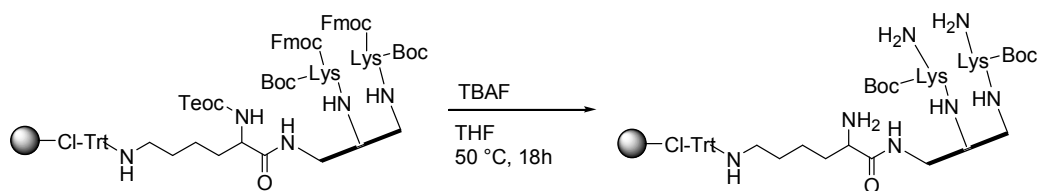
La resina è stata fatta reagire con 5 eq di PyBOP sciolti in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ 1:1 con 10 eq di N-metilmorfolina per 1 h e 30'. Alla soluzione sono stati quindi aggiunti 3 eq della poliammina $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ 1:1 con 10 eq di N-metilmorfolina e la reazione è proseguita per 3 h. La resina è stata poi lavata con $4 \times \text{DMF}$ e $4 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2$.

5) Coupling con Fmoc-Lys(Boc)-OH



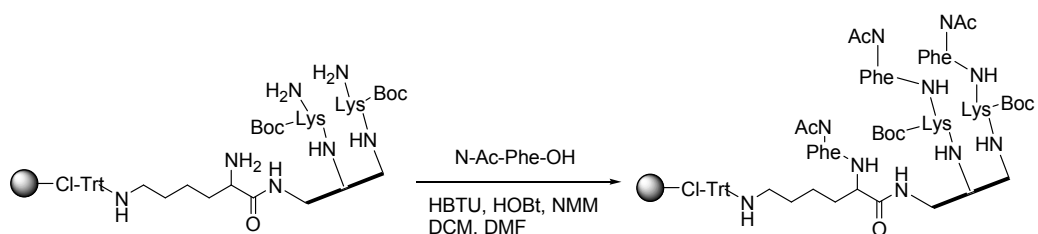
In DMF sono stati sciolti 6 eq di Fmoc-Lys(Boc)-OH , e sono stati aggiunti 8 eq di PyBOP e 20 eq di N-metilmorfolina. La soluzione è stata aggiunta alla resina e la reazione è proseguita per 3 h, quindi la resina è stata lavata con $4 \times \text{DMF}$, $4 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2$.

6) Deprotezione gruppi Teoc e Fmoc



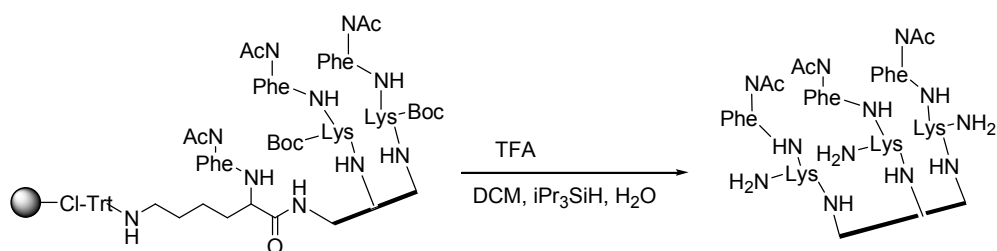
La resina è stata sospesa in CH_2Cl_2 , quindi sono stati aggiunti 10 eq di tetrabutylammonio fluoruro 1 M in THF. La reazione è proseguita una notte a 50 °C, quindi la resina è stata lavata con 4xDMF, 4x CH_2Cl_2 .

7) Funzionalizzazione: coupling con N-Ac-Phe



La N-Ac-Phe (9 eq) è stata sciolta in DMF, quindi sono stati aggiunti 10 eq di HBTU, 10 eq di HOBT, 20 eq di N-metilmorfolina e CH_2Cl_2 . Dopo 10' la soluzione è stata aggiunta alla resina, quindi la reazione è proseguita per 3 h. La resina è stata quindi lavata con 3xDMF, 3x CH_2Cl_2 , 3xNMP, 3x CH_2Cl_2 .

8) Sblocco dalla resina



Alla resina sono stati aggiunti 100 μl di CH_2Cl_2 , 100 μl di tri-isopropilsilano, 800 μl di acido trifluoroacetico e 10 μl di H_2O , e la reazione è proseguita per 45'. La soluzione è stata filtrata ed evaporata in centrifuga sotto vuoto. Il residuo è stato sciolto in $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 1:1 con lo 0.1 % di HCOOH , ed è stato analizzato mediante HPLC e ESI-MS.

Tren(LysPhe-NAc)₃ (3)

¹H NMR (CD₃OD 250 MHz) δ 0.89 (m, 6H), 1.45 (m, 6H), 1.68 (m, 6H), 1.96 (d, 9H), 2.92 (m, 12H), 3.41 (m, 6H), 3.58 (m, 6H), 4.09-4.24 (m, 3H), 4.39-4.53 (m, 3H), 7.28 (m, 15 H).

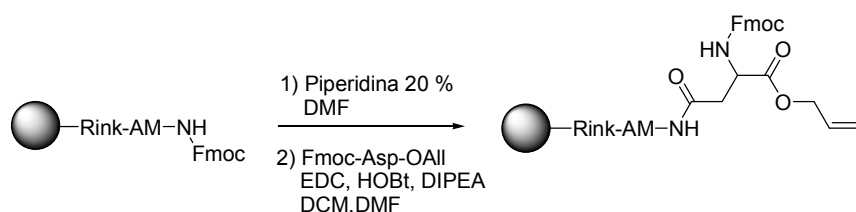
ESI-MS (m/z): 1097.7 (M+H⁺).

HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradient: H₂O/TFA (0.1%)-CH₃CN/TFA (0.1%) 5 % for 5 min from 5 % to 50 % in 20 min, UV-detection 226nm): 19.9 min (100%).

PAMAM(LysPhe-NAc)₃ (4)

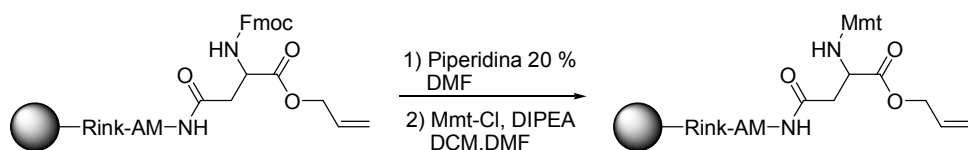
ESI-MS (m/z): 1787.1 (M+H⁺).

HPLC (Agilent Eclipse XDB-C18; gradient: H₂O/TFA (0.1%)-CH₃CN/TFA (0.1%) 5 % for 5 min from 5 % to 50 % in 20 min, UV-detection 226nm): 22.1 min (100%).

2.5.2 SINTESI SU RESINA RINK-AM**1) Attacco Fmoc-Asp-OAll su resina**

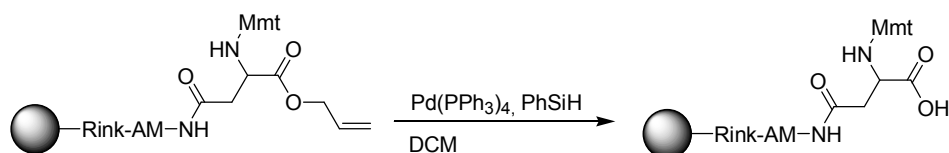
La resina PS-Rink-AM (loading fornito 0.65 mmol/g) è stata rigonfiata con DCM per 30', lavata con 2 x DCM, 2 x DMF. E' stata quindi fatta reagire con DMF/piperidina 20 % per 15' e poi lavata con 3 x DMF, 3 x CH₂Cl₂, quindi il trattamento è stato ripetuto. Lo Fmoc-Asp-OAll (3 eq) è stato sciolto in DMF, sono stati aggiunti 4 eq di HOBT, 4 eq di EDC, 20 eq di DIPEA, la soluzione è stata posta in agitazione per 10' a 0 °C e quindi aggiunta alla resina in DCM. La reazione è proseguita per 3 h, quindi il coupling è stato ripetuto allo stesso modo. La resina è stata poi lavata con 3 x DMF, 3 x CH₂Cl₂ e seccata; dallo sblocco dello Fmoc e dalla lettura dell'assorbanza a 301 nm si ricava un loading di 0,56 mmol/g.

2) Sostituzione Fmoc con Mmt.



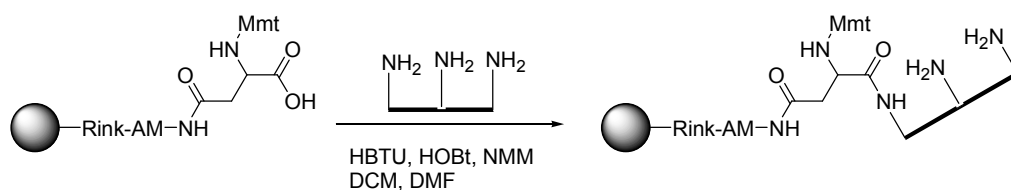
La resina è stata trattata per due volte con piperidina 20 % in DMF per 15', e quindi lavata 3xDMF, 4xCH₂Cl₂. Sono stati quindi aggiunti 6 eq di Mmt-Cl sciolto in CH₂Cl₂/DMF 20 % con 12 eq di DIPEA. LA reazione è proseguita 3 h, quindi la resina è stata lavata 3xDMF, 3xCH₂Cl₂.

3) Deprotezione estere allilico



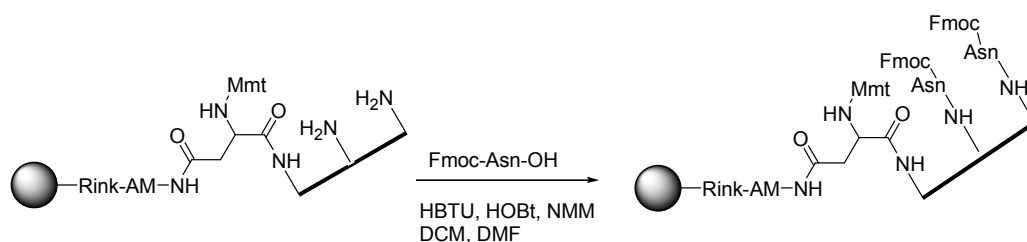
La resina è stata fatta reagire con 0.3 eq di Pd(PPh₃)₄ e 25 eq di fenilsilano sciolto in CH₂Cl₂ per 45', in un contenitore resistente alla pressione. In seguito la resina è stata lavata con 3xCH₂Cl₂, 3xNMP, trattata 2 volte per 20' con NMP/DIPEA 20 %, e quindi lavata con 3xNMP, 3xCH₂Cl₂.

4) Coupling con la poliammina



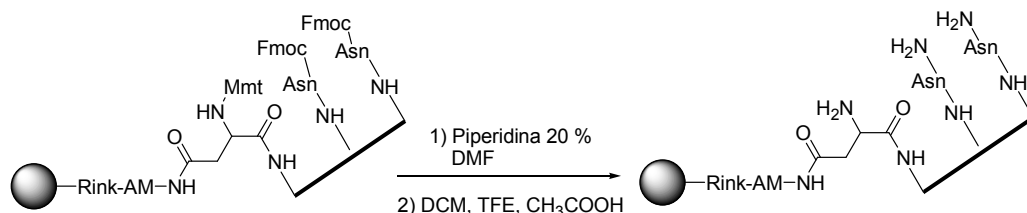
In DMF vengono sciolti 4 eq di HBTU e 4 eq di HOBT, vengono poi aggiunti 12 eq di N-metilmorfolina e CH₂Cl₂, e la soluzione viene aggiunta alla resina. Dopo 15' di reazione vengono aggiunti 3 eq di poliammina in DCM con 12 eq di NMM e la reazione prosegue per altre 3 h. La resina viene lavata con 3 x DMF, 3 x CH₂Cl₂.

5) Coupling con Fmoc-Asn-OH



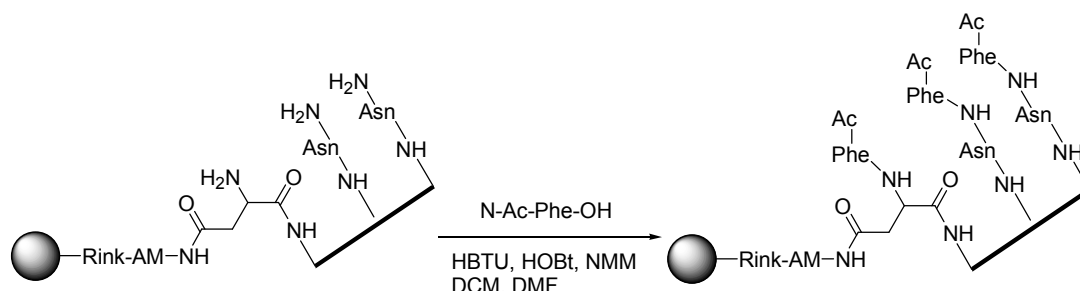
La Fmoc-Asn-OH (6 eq.) viene sciolta in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ con 6 eq. di HBTU, 6 eq. di HOBT e 10 eq. di NMM, dopo 10' di agitazione la soluzione viene aggiunta alla resina e la reazione prosegue per 4 h. La resina viene poi lavata con 3xDMF, 3x CH_2Cl_2 .

6) Deprotezione gruppi amminici



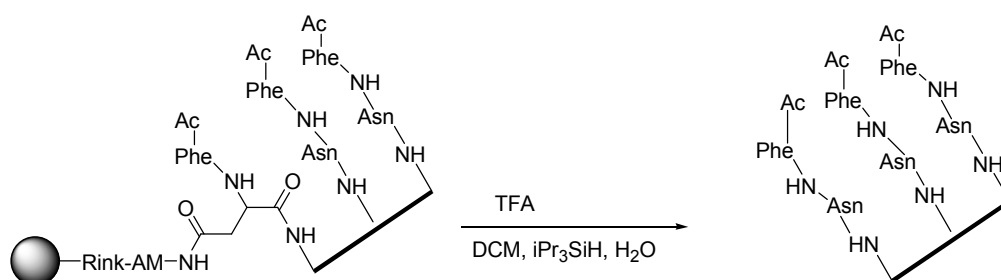
Le ammine protette con Fmoc sono state deprotette trattando due volte la resina con piperidina 20 % in DMF per 20'. Dopo aver lavato la resina con 3xDMF, 3x CH_2Cl_2 , le ammine protette con Mmt sono state sbloccate aggiungendo una soluzione CH_2Cl_2 /trifluoroetanolo/acido acetico 6:2:1 per 5'. La resina è stata quindi lavata 3x CH_2Cl_2 , 3xDMF, 3x CH_2Cl_2 .

7) Funzionalizzazione: coupling con N-Ac-Phe



La procedura è analoga a quella utilizzata per la resina Cl-Trt.

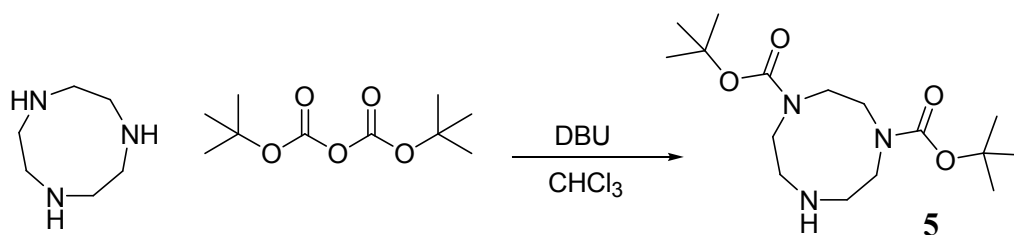
8) Sblocco dalla resina



La procedura è analoga a quella utilizzata per la resina Cl-Trt.

2.5.3 DENDRIMERI SUPPORTATI SU FASE SOLIDA

Di-Boc-triazaciclononano (con Boc₂O) (5)

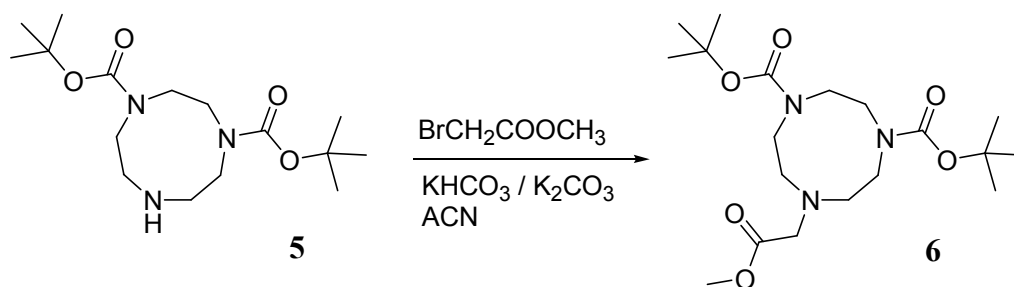


In 20 ml di cloroformio precedentemente anidrificati con Na₂SO₄ sono stati sciolti 1,00 g di triazaciclononano base libera (7,7 mmoli), quindi sono stati aggiunti 2,4 ml di DBU (15,5 mmoli, 2 eq). 3,40 g di Boc-anidride sono stati sciolti in 20 ml di cloroformio anidro e aggiunti mediante syringe pump alla soluzione del Tacn (1,6 ml/min). L'aggiunta è avvenuta a temperatura ambiente in atmosfera di N₂ sotto agitazione. TLC: SiO₂ (CHCl₃, 10 % MeOH) Rf: 0,8 (nin., Tri-Boc), 0,4 (nin., prodotto), 0,1 (nin, mono-Boc). Dopo una notte la soluzione è stata evaporata ottenendo un olio giallo che è stato purificato mediante cromatografia Flash (eluente: CHCl₃ 4 % MeOH) ricavando 1,81 g di prodotto puro come olio trasparente (70 % resa).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.43 (s, 18H, t-Bu), 2.91 (br, 4H, CH₂NHCH₂), 3.25 (m br, 4H, N(Boc) CH₂ CH₂NH), 3.45 (m br, 4H, N(Boc) CH₂ CH₂N(Boc)).

¹³C-NMR (CDCl₃, 62.9 MHz) δ(ppm): 155.2, 79.1, 79.0, 52.5, 51.9, 51.8, 51.0, 49.8, 49.2, 48.9, 47.7, 47.6, 47.2, 27.9.

ESI-MS (m/z): 330.2 (M+H⁺).

2-(Di-Boc-triazaciclononano)acetato di metile (6)

1,00 g di Di-Boc-triazaciclononano (**5**) (3.04 mmoli) sono stati sciolti in 10 ml di acetonitrile anidro, quindi sono stati aggiunti una punta di spatola di KHCO_3 , una di K_2CO_3 e 0,6 ml di metil bromoacetato (6.1 mmoli, 2 eq). La reazione è proseguita a temperatura ambiente per 4 h. TLC: SiO_2 (CHCl_3 , 5 % MeOH) Rf: 0.3 (nin, reagente), 0.7 (nin + UV, prodotto + metil bromoacetato).

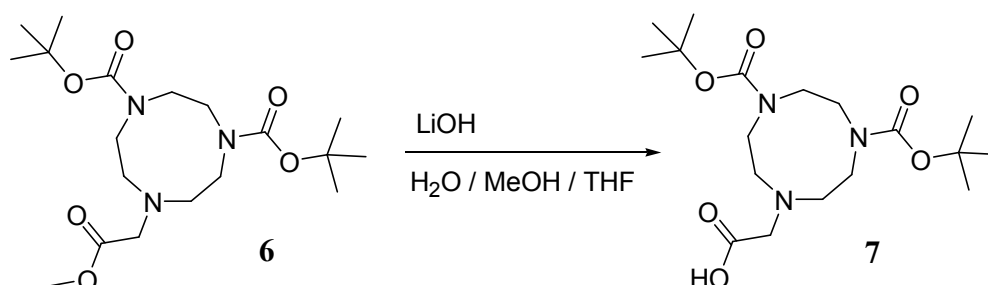
La soluzione è stata filtrata ed evaporata, quindi il residuo è stato purificato mediante cromatografia SiO_2 Flash (eluente: etere di petrolio 10 % etil acetato fino eluizione metil bromo acetato, poi etere di petrolio 20 % etil acetato). Sono stati ottenuti 0,99 g di prodotto puro come olio giallo (82 % resa).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.45 (s, 18H, t-Bu), 2.83 (br, 4H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{AcMe})\text{CH}_2$), 3.23 (m br, 4H, $\text{N}(\text{Boc})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{AcMe})$), 3.43 (m br, 6H, $\text{N}(\text{Boc})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Boc})$), + $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$, 3.67 (m br, 3H, COOCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.9 MHz) δ (ppm): 172.50, 155.45, 155.39, 79.45, 79.36, 79.31, 55.97, 55.89, 54.18, 53.69, 53.60, 53.49, 51.22, 50.92, 50.75, 50.71, 50.39, 50.31, 50.10, 49.85, 49.46, 28.47

IR (KBr) cm^{-1} : 2974, 2930, 1744, 1691, 1461, 1365, 1251.

ESI-MS (m/z): 402.2 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Acido 2-(Di-Boc-triazaciclononano)acetico (7)

Il di-Boc-Tacn-acetato di metile (427 mg, 1.06 mmoli) (**6**) è stato sciolto in 4 ml di metanolo con 3 ml di H_2O e 2 ml di THF, quindi sono stati aggiunti 50 mg di idrossido di litio (2 mmoli, 2 eq). La reazione è proseguita per una notte.

2 - SISTEMI MULTIVALENTI SU FASE SOLIDA

TLC: SiO₂ (CHCl₃, 5 % MeOH) Rf: 0.1 (nin, prodotto), 0.75 (nin, reagente). Il metanolo è stato evaporato, la soluzione rimasta è stata portata a pH 3 con l'aggiunta di soluzione di KHSO₄ al 10 %. La soluzione è stata estratta 6x30 ml con etile acetato, le fasi organiche riunite sono state anidrificate con Na₂SO₄ ed evaporate ottenendo 385 mg del prodotto come solido bianco (93 % resa).

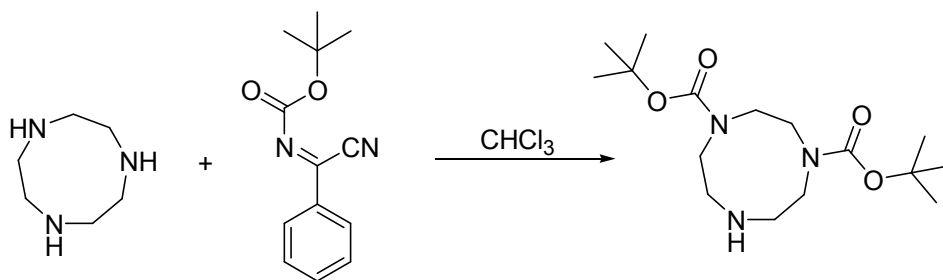
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.49 (s, 18H, t-Bu), 2.74 (br, 4H, CH₂N(Ac)CH₂), 3.50-3.34 (m br, 10H, N(Boc)CH₂CH₂N(Ac) + N(Boc)CH₂CH₂N(Boc), + CH₂COOH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 62.9 MHz) δ(ppm): 172.21, 155.60, 155.39, 81.27, 80.92, 80.79, 60.75, 60.61, 54.73, 53.85, 50.76, 50.34, 49.29, 28.72, 28.67.

IR (KBr) cm⁻¹: 2977, 2932, 1685, 1478, 1464, 1415, 1368, 1251, 1161, 910, 733.

ESI-MS (m/z): 388.2 (M+H⁺); 338 (M+H⁺ - Boc), 410.2 (M + Na⁺).

Di-Boc-triazaciclononano (procedura con Boc-ON)



[52] (Kimura, S., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6025-6039).

1 g di triazaciclononano a base libera (7.7 mmol) è stato sciolto in 25 ml di CHCl₃ anidro; a 0 °C sono stati aggiunti 3,8 g di 2-(Boc-ossimmino)-2-fenilacetone nitrile (Boc-ON, 1,5 mmol, 2 eq.). la reazione è proseguita a T ambiente per 4 h. TLC: SiO₂ (CHCl₃, 10 % MeOH) Rf: 0.8 (nin., Tri-Boc), 0.6 (UV, ON), 0.4 (nin., prodotto). La soluzione è stata tirata a secco e il residuo è stato purificato mediante cromatografia SiO₂ Flash (eluente: CHCl₃ fino uscita ON, poi CHCl₃ 5 % MeOH). Sono stati ottenuti 2,32 g di prodotto sotto forma di olio trasparente (resa 91 %).

Deprotezione ammine della resina – Misura loading

Una quantità pesata di resina viene posta in un reattore per SFS e fatta rigonfiare per 30' con DMF. Una volta filtrata vengono aggiunti 1 ml di piperidina al 20 % in DMF e la reazione viene proseguita sotto mescolamento per 15'.

Misura loading: la sospensione della resina viene fatta decantare per 1', quindi vengono prelevati 8 µl di soluzione che vengono portati a 800 µl con la medesima miscela di sblocco in una cuvetta

a volume ridotto. Viene quindi misurato lo spettro di assorbimento della soluzione (usando come bianco la miscela di sblocco) e la concentrazione di gruppo Fmoc viene ricavata dall'assorbanza del picco a 301 nm ($\epsilon = 7800$).

La resina viene filtrata e il trattamento con piperidina viene ripetuto per 15', quindi la resina viene lavata 3xDMF e 3xCH₂Cl₂.

Coupling con Tacn

Il (di-Boc)Tacn-CH₂COOH (6 eq. rispetto alla quantità di ammine ricavata dal loading) viene sciolto in 400 μ l di CH₂Cl₂, quindi vengono aggiunti 400 μ l di DMF, N-metilmorfolina (20 eq.), e PyBOP (8eq.). Dopo un'attivazione di 10' la soluzione viene aggiunta alla resina e la reazione viene fatta proseguire per 4 ore. La resina viene quindi lavata 3xDMF e 3xCH₂Cl₂. La completezza della reazione viene verificata con Kaiser test e con fluoresceina tioisocianato. Solitamente è necessario un ulteriore ciclo di coupling di 4 h.

Kaiser test

Soluzione A: 1 g di ninidrina in 20 ml di etanolo

Soluzione B: 20 g di fenolo in 5 ml di etanolo

Una punta di spatola di resina viene posta in una provetta da saggio, vengono aggiunte 3 gocce di soluzione A, 3 gocce di soluzione B e 3 gocce di piridina, si riscalda a 100 °C per un minuto con pistola termica. La presenza di ammine libere viene evidenziata dalla colorazione blu dei beads di resina.

[53] (Gaggini, F., *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 805-810).

Test con fluoresceina tioisocianato

Una punta di spatola di resina viene posta in una provetta e sospesa in diclorometano, quindi viene aggiunta una punta di spatola di fluoresceina tioisocianato. Dopo 10' la presenza di ammine libere è evidenziata dalla comparsa di una fluorescenza verde dei beads irradiati da luce UV.

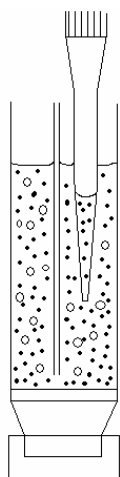
Deprotezione Boc

Alla resina vengono aggiunti 1 ml di TFA 30 % in CH₂Cl₂ e la reazione viene proseguita per 3 ore.

La resina viene quindi lavata 4xCH₂Cl₂.

Metodo per la semina della resina sui pozzetti da saggio

5 mg di resina funzionalizzata vengono posti in un reattore per SFS da 2 ml, quindi viene aggiunto 1 ml di miscela H₂O / etanolo 30 % (la percentuale di etanolo si è rivelata l'ottimale per consentire allo stesso tempo una buona sospensione della resina e la formazione di bolle d'aria di piccole dimensioni). Una cannula di plastica di piccolo diametro (1 mm) collegata alla linea dell'azoto viene posta all'interno del liquido, in modo da terminare vicino al fondo. Mediante un flusso di gas adeguato si cerca di ottenere una sospensione il più possibile omogenea della resina. Volumi di sospensione da 8 a 20 µl vengono prelevati per mezzo di una micropipetta (dalla parte centrale del liquido) e posti nei pozzetti di una piastra a 96 pozzetti (volume pozzetti 300 µl). In tutte queste operazioni si deve evitare l'utilizzo del vetro in quanto la resina tende ad aderire ad esso.



Cinetiche di idrolisi dell'HPNPP

Le cinetiche sono state seguite utilizzando un lettore a micropiastre a 96 pozzetti, misurando ad intervalli regolari di tempo l'assorbanza a 401 nm relativa alla forma deprotonata del p-nitrofenolo liberatosi. Le cinetiche sono state svolte a pH 7.0 tamponato con HEPES, a 40°C, ponendo nel pozzetto per prima la sospensione della resina, quindi il tampone e Zn(II), per formare in situ il complesso Zn-Tacn attivo. Solo alla fine è stato aggiunto il substrato, la soluzione è stata portata a volume con H₂O milliql. Le velocità iniziali sono state calcolate dal fitting lineare della parte iniziale delle curve cinetiche (conversione < 10 %), i valori in assorbanza sono stati convertiti in valori in concentrazione utilizzando una retta di taratura per il p-nitrofenolo.

Soluzioni madre: MAP-4 e MAP-8: sospensione di 5 mg di resina in 1 ml H₂O/etanolo 30 %
 Tampone HEPES 0.1 M in H₂O pH 7.0
 Zn(NO₃)₂ 1 10⁻³M
 HPNPP 2 10⁻³M

Cinetiche variando la quantità di Zn(II)

Sono state utilizzate le seguenti condizioni:

- MAP-4: 20 μl di sospensione ottenendo $[\text{Tacn}] = 7.5 \cdot 10^{-4}\text{M}$
- MAP-8: 15 μl di sospensione ottenendo $[\text{Tacn}] = 5.3 \cdot 10^{-4}\text{M}$
- Zn^{2+} : $0 - 2 \cdot 10^{-4}\text{M}$
- HEPES pH 7.0 : $1.6 \cdot 10^{-2}\text{M}$
- HPNPP: $1.6 \cdot 10^{-4}\text{M}$
-

Cinetiche variando la quantità di HPNPP

Sono state utilizzate le seguenti condizioni:

- MAP-4: 10 μl di sospensione ottenendo $[\text{Tacn}] = 4.3 \cdot 10^{-4}\text{M}$
- MAP-8: 8 μl di sospensione ottenendo $[\text{Tacn}] = 3.1 \cdot 10^{-4}\text{M}$
- Zn^{2+} : 1 eq. rispetto a Tacn
- HEPES pH 7.0 : $1.6 \cdot 10^{-2}\text{M}$
- HPNPP: $0.2 - 6.4 \cdot 10^{-4}\text{M}$

Cinetiche di assorbimento del p-nitrofenolo

La cinetica è stata effettuata in condizioni uguali alle cinetiche di idrolisi, ma al posto del substrato HPNPP, è stato aggiunta una uguale quantità di p-nitrofenolo. Si è andati quindi a misurare il calo rispetto all'assorbanza iniziale nel tempo, in seguito all'assorbimento del fenolo da parte della fase solida.

Sono state utilizzate le seguenti condizioni:

- MAP-4: 10 μl di sospensione ottenendo $[\text{Tacn}] = 4.3 \cdot 10^{-4}\text{M}$
- Zn^{2+} : 1 eq. rispetto a Tacn
- HEPES pH 7.0 : $1.6 \cdot 10^{-2}\text{M}$
- P-nitrofenolo: $0.5 - 1.6 \cdot 10^{-4}\text{M}$

Modelli cinetici

Il fitting delle curve cinetiche per ricavare le costanti è stato eseguito utilizzando il programma Micromath Scientist; in seguito sono riportati gli script dei modelli utilizzati.

2 - SISTEMI MULTIVALENTI SU FASE SOLIDA

DIFFUSIONE PNP

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: T
DepVars: A, PL, PS, PTOT
Params: kin, kout, A0, PL0, PS0
PL'=-kin*PL+kout*PS
PS'=kin*PL-kout*PS
PTOT=PL+PS
A=(PL*A0)/PL0
//initial conditions
t=0
PL=PL0
PS=PS0
***
```

CINETICA DI IDROLISI

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: T
DepVars: A, SL, SSR, PSR, PL, R
Params: k1,k2,kobs, SL0, R0
SL'=-k2*SL*R+k1*SSR
SSR'=k2*SL*R-k1*SSR-kobs*SSR
PSR'=kobs*SSR-k1*PSR+k2*R*PL
PL'=k1*PSR-k2*PL*R
R'=-k2*SL*R+k1*SSR+k1*PSR-k2*R*PL
A=0.1298+5181*PL
//initial conditions
t=0
SL=SL0
SSR=0
PSR=0
PL=0
R=R0
***
```

3 DENDRIMERI COME CATALIZZATORI: SINTESI E STUDIO

Nella nostra ricerca abbiamo studiato le proprietà di strutture dendrimeriche funzionalizzate come catalizzatori, in fase omogenea, per l'idrolisi di diesteri fosforici. Ci siamo in particolare interessati all'effetto delle dimensioni del dendrimero sull'efficacia catalitica, effettuando uno studio sistematico per comprendere l'origine del cosiddetto "effetto dendrimerico". A tale scopo sono state sintetizzate, sfruttando la sintesi su fase solida, due diverse serie di strutture ramificate, di diverse dimensioni e valenza. In questi dendrimeri è stato inserito un numero via via crescente di gruppi triazaciclononano, che complessando ioni Zn^{2+} fungono da unità catalitiche. Ciascuno di questi dendrimeri è stato quindi testato in esperimenti catalitici, nell'idrolisi dell'HPNPP, substrato modello dell'RNA. In particolare per ogni composto sono stati ricavati i parametri catalitici di Michaelis-Menten, k_{cat} e K_M .

3.1 SINTESI DI DENDRIMERI A VARIA VALENZA

Per lo studio dell'attività catalitica di strutture dendrimeriche funzionalizzate, sono state sintetizzate delle molecole ramificate di dimensioni e valenza via via crescenti. I dendrimeri sviluppati presentano una struttura di tipo peptidico, ciò permette di sfruttare la ben nota chimica dei peptidi per la loro sintesi, e di utilizzare, come costituenti, amminoacidi commercialmente disponibili: la funzionalizzazione terminale inoltre può avvenire sui gruppi amminici nelle medesime condizioni.

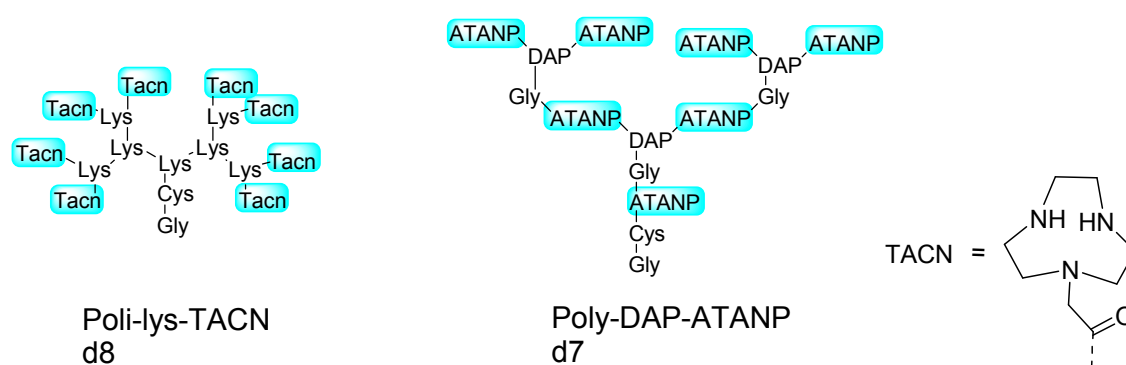
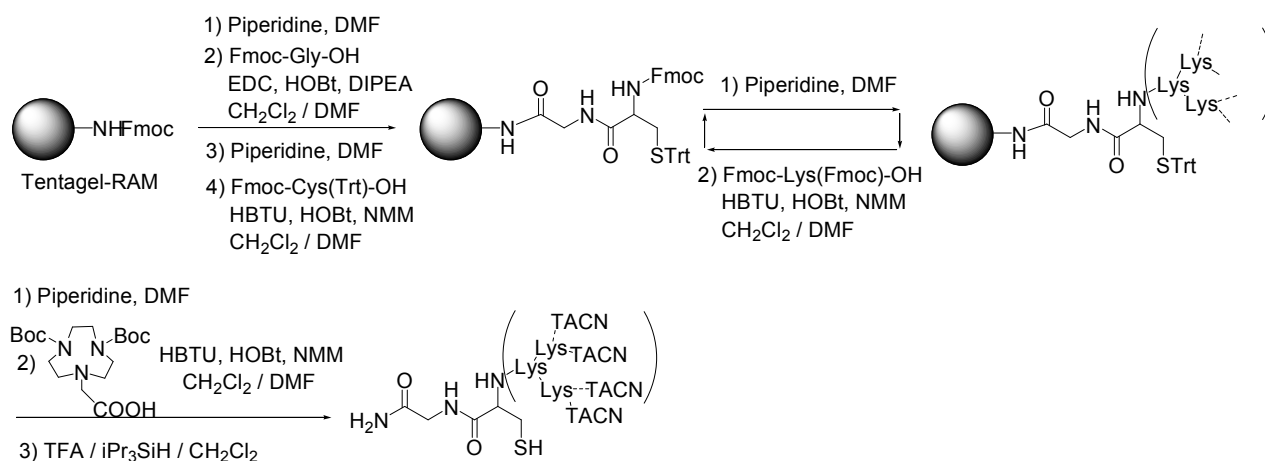


Figura 3.1 Struttura dei due tipi di costituenti base ramificati.

3.1.1 DENDRIMERI A BASE DI LISINA

La prima serie di dendrimeri si basa su poli-lisine ramificate, la lisina possedendo due gruppi amminici (quello in α e quello in catena laterale) funge da punto di ramificazione: ad ogni coupling permette di raddoppiare la valenza della struttura. La funzionalizzazione avviene sulle ammine della lisina stessa, mediante normale coupling peptidico. La sintesi è avvenuta su fase solida, questo per sfruttare i vantaggi di completezza delle reazioni e di lavaggio dei sottoprodotti di reazione, i dendrimeri sono stati quindi fatti “crescere” legati alla resina e, solo una volta ottenuti, i prodotti finali sono stati staccati e portati in soluzione. La resina utilizzata è stata inizialmente del tipo PS-RAM (loading 0.65 mmol/g), e la sintesi è stata condotta a partire dal C-terminale mediante procedura di tipo Fmoc: in seguito allo sblocco il C terminale viene liberato sotto forma di ammine. Questa resina di tipo polistirenico tuttavia non si è rivelata adatta per dendrimeri di valenza > 8 , per la sintesi di strutture di dimensioni maggiori si è quindi passati ad una resina di tipo Tentagel-RAM che presenta un minore loading (loading 0.35 mmol/g).



Schema 3.1. Procedura di sintesi dei dendroni [54].

Prima delle lisine sono state legate una glicina e una cisteina a fungere da linker per allontanare la parte ramificata dalla resina. Il gruppo tiolico della cisteina assumerà, come vedremo, inoltre un importante ruolo per la successiva modificazione dei dendrimeri. Sono state quindi sintetizzate quattro generazioni della poli-lisina che presentano rispettivamente 2, 4, 8, 16 ammine terminali (figura 3.2); queste ammine sono state funzionalizzate mediante coupling con Tacn-CH₂COOH (7), legando quindi sulla superficie esterna del dendrimero gruppi triazaciclononano. Alla fine, i peptidi sono stati staccati dalla resina in condizioni acide, la soluzione di sblocco è stata evaporata e il residuo ottenuto è stato riprecipitato con etere; il prodotto è stato quindi sciolto in H₂O / MeOH.

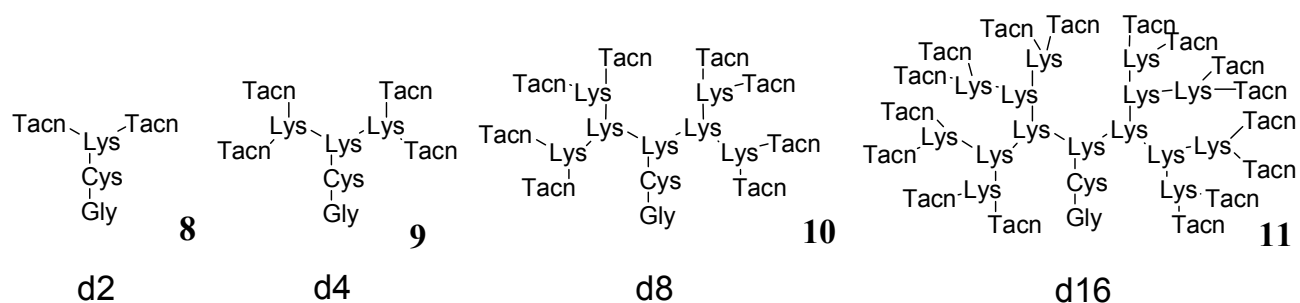
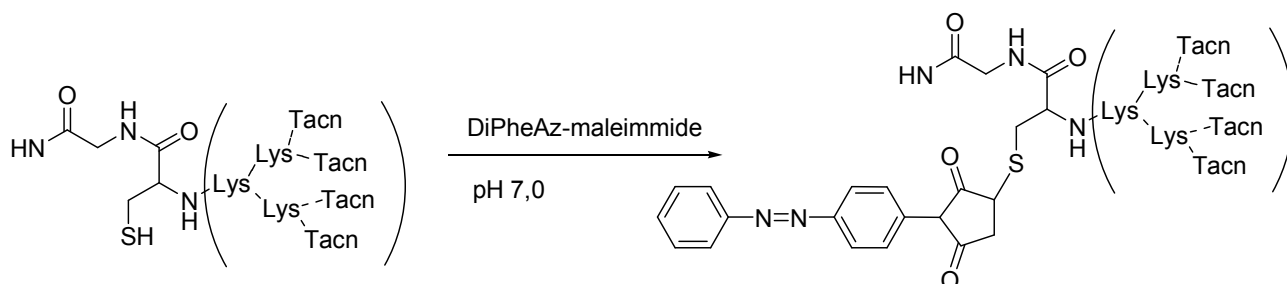


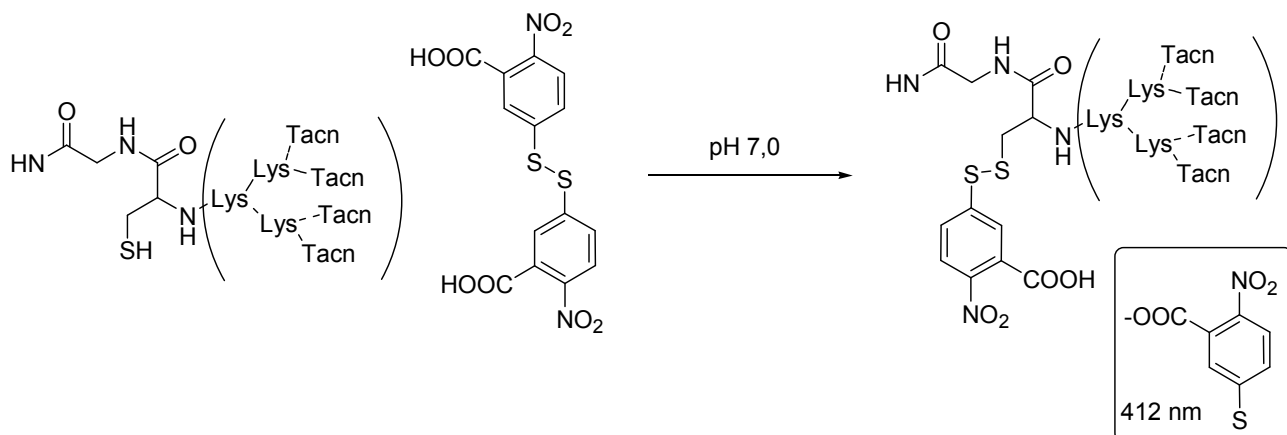
Figura 3.2 Serie di dendroni Poly-lys-Tacn [54].

L'analisi della purezza del prodotto ottenuto è stata facilitata dalla presenza del tiolo della cisteina. Prima dell'analisi HPLC esso è stato infatti derivatizzato in maniera specifica mediante una maleimide recante un marcatore organico, per permettere un'analisi cromatografica più semplice e più sensibile (schema 3.2). Come marcatore è stata utilizzata la difenildiazomaleimide, che presenta un intenso assorbimento a 328 nm.



Schema 3.2 Tagging dei dendroni per analisi HPLC.

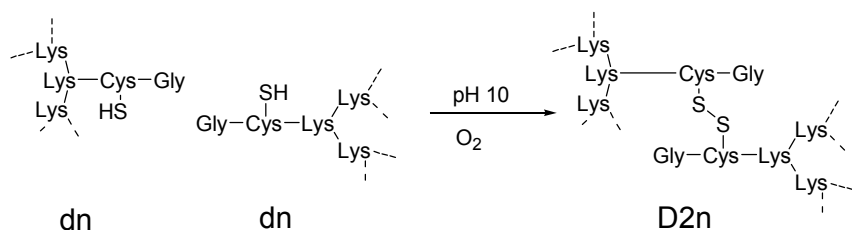
La quantificazione della concentrazione del peptide nella soluzione madre è stata effettuata mediante misura spettrofotometrica in seguito a reazione colorimetrica con il reattivo di Ellmann (schema 3.3). Questa analisi permette una misura della concentrazione di tioli liberi, e di conseguenza del peptide; la precisione di tale misura è senza dubbio superiore a quella che sarebbe stata possibile ottenere preparando le soluzioni per pesata.



Schema 3.3 Reazione del test di Ellmann per la quantificazione dei tioli.

3 - DENDRIMERI COME CATALIZZATORI

Le strutture ottenute presentano una ramificazione che avviene in un solo verso, e la loro forma è di tipo conico più o meno allargata. Esse possono essere definite quindi dei dendroni secondo la nomenclatura corrente. Questi dendroni possono comunque essere dimerizzati mediante la formazione di un ponte disolfuro tra i tioli delle cisteine, in tal modo si vengono a formare delle strutture di tipo sferico, ovvero dei dendrimeri veri e propri, con valenza doppia rispetto ai dendroni di partenza. Per la dimerizzazione la soluzione dei dendroni è stata portata a pH basico e vi è stata fatta gorgogliare aria, la completa formazione del disolfuro è stata verificata dalla scomparsa di tioli liberi mediante test di Ellmann (schema 3.4). In tal modo sono stati ottenuti dendrimeri recanti sulla superficie 4, 8, 16 e 32 gruppi Tacn (figura 3.3).



Schema 3.4 Reazione di dimerizzazione dei dendroni.

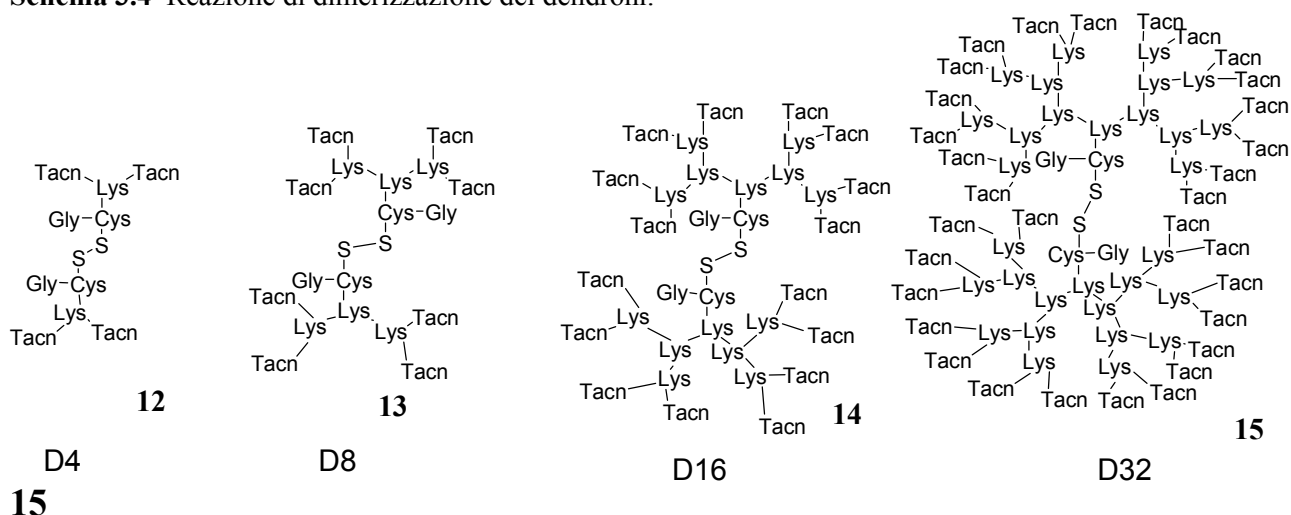


Figura 3.3 Serie di dendrimeri poli-lys-Tacn.

3.1.2 DENDRIMERI A BASE DI DAP – ATANP

In seguito è stata sintetizzata una diversa serie di dendrimeri con una struttura modificata, ispirata ai dendrimeri sintetizzati dal gruppo di Raymond per l'idrolisi di esteri [35]. Per fare in modo che i gruppi attivi si trovino anche all'interno del dendrimero e non solo sulla periferia, ad ogni generazione è stato introdotto l'amminoacido ATANP (acido 2-ammino-3-[1-(1,4,7-triazaciclononan)]propanoico). Inoltre per aver una struttura più compatta la lisina è stata sostituita

con l'acido 2,3 diammino propanoico, in cui le due ammine si trovano più vicine tra loro (figura 3.4).

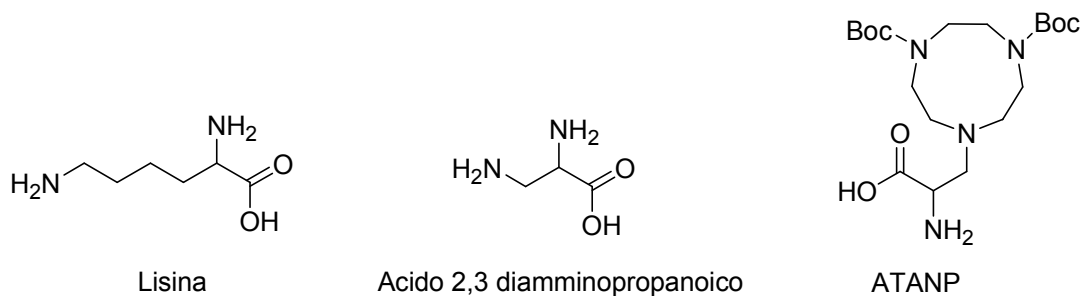
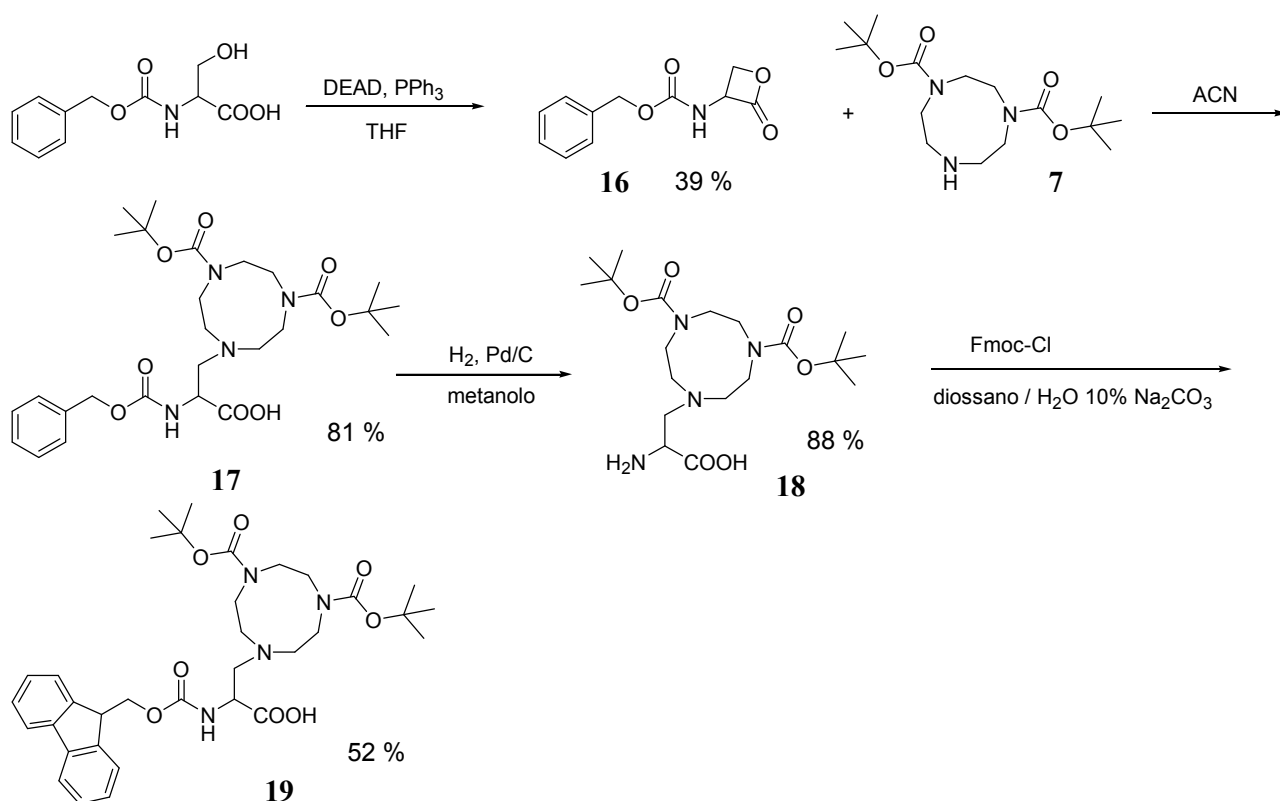


Figura 3.4

L'ATANP è stato sintetizzato protetto in maniera ortogonale alle ammine secondarie del ciclo con il gruppo Boc, e con Fmoc all'ammina in α . La sintesi avviene a partire dalla Z-serina che viene convertita nel corrispondente lattone mediante reazione con DEAD e trifenilfosfina (reazione di Mitsunobu). Il lattone viene quindi fatto reagire con il diBoc-Tacn per dare lo Z-diBoc-ATANP, il gruppo Z viene staccato mediante idrogenazione catalitica e l'ammina viene protetta con il gruppo Fmoc mediante reazione con il fluorenil-metil-cloroformiato (schema 3.5).



Schema 3.5 Sintesi di Fmoc-ATANP(di-Boc)-OH.

3 - DENDRIMERI COME CATALIZZATORI

La sintesi dei dendroni è stata effettuata su fase solida, con le medesime procedure riportate in precedenza. La resina utilizzata è stata la Tentagel-RAM e anche in questo caso sono state inserite all'inizio una glicina e una cisteina. Sono stati sintetizzati dendroni recanti 1, 3, 7 gruppi triazaciclonano (figura 3.5), che sono stati staccati e analizzati come descritto sopra (in aggiunta prima dello sblocco dalla resina le ammine primarie sono state acetilate). Inoltre le strutture sono state dimerizzate mediante ponte disolfuro a dare i corrispondenti dendrimeri a 2, 6, 14 gruppi. Ad ogni generazione è stata inserita nella sequenza una glicina, allo scopo di porre una certa distanza tra l'ATANP e la ramificazione del DAP, evitando che vi fosse troppo ingombro sterico che avrebbe potuto rendere difficoltosa la sintesi.

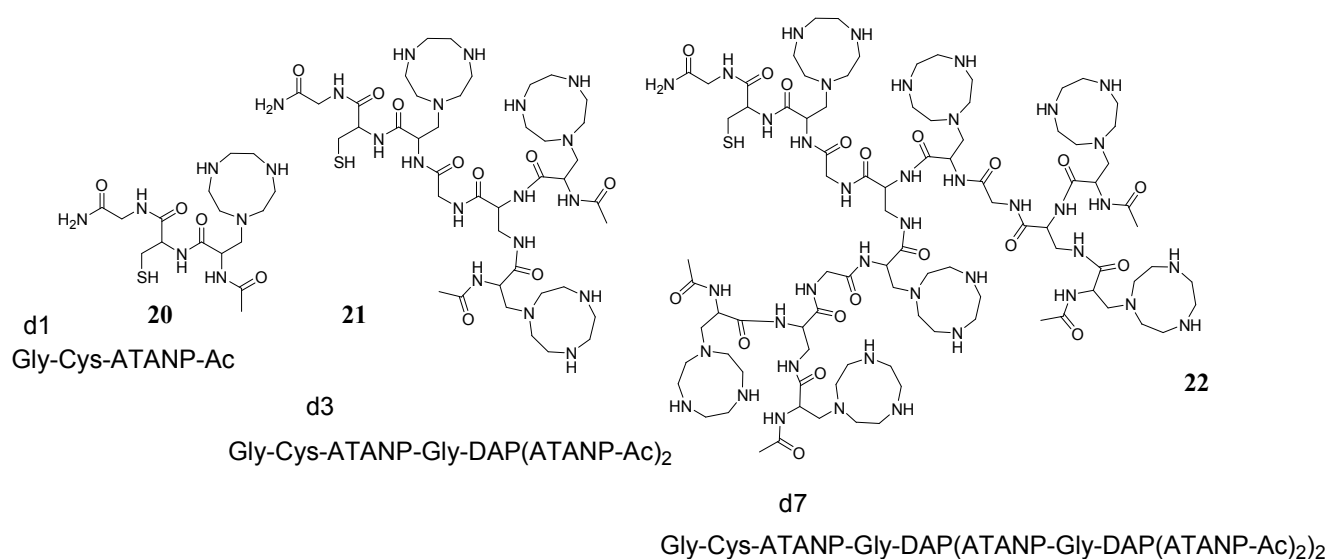


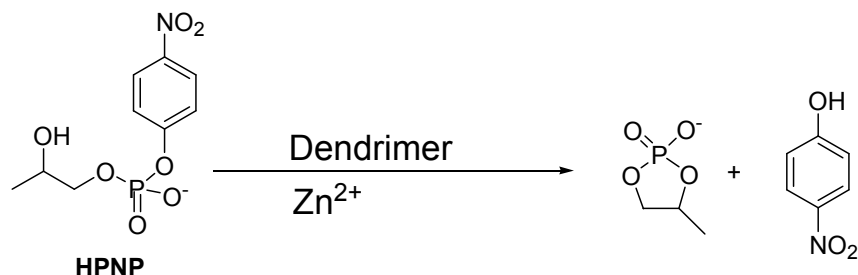
Figura 3.5 dendroni DAP-ATANP sintetizzati.

3.2 ESPERIMENTI CINETICI

3.2.1 DENDRIMERI POLI-LYS-TACN

Gli studi di attività catalitica sono stati svolti sia sui dendroni che sui dendrimeri, nei confronti della reazione di idrolisi dell'HPNPP. Nel caso dei dendroni, per evitare interferenze da parte del gruppo tiolico libero, esso è stato fatto reagire con N-etil maleimmide prima di procedere agli esperimenti cinetici. Le cinetiche sono state effettuate utilizzando un lettore a multiplastre a 96 pozzetti, in modo da poter svolgere in contemporanea un gran numero di esperimenti. Alla soluzione del dendrimero in tampone HEPES a pH 7.5 è stata aggiunta una determinata quantità di soluzione di Zn(NO₃)₂, in modo da formare in situ il complesso metallico con il triazaciclononano. Il pH è stato

scelto vicino a quello delle condizioni fisiologiche, in quanto in tali condizioni ci aspettiamo una buona accelerazione rispetto all'idrolisi spontanea. In seguito è stato aggiunto il substrato ed è stato seguito per via spettrofotometrica il decorso della reazione dalla liberazione del p-nitrofenato che assorbe a 412 nm (schema 3.6).



Schema 3.6 Reazione di idrolisi dell'HPNPP

Inizialmente le cinetiche sono state svolte in eccesso di substrato rispetto al catalizzatore, così da appurare che i complessi usati fossero dei veri catalizzatori in grado di compiere turnover. Le reazioni sono particolarmente lente, per cui generalmente non sono state seguite fino a completezza, ma ci si è limitati alla parte iniziale (< 10 % di conversione) in cui l'andamento è rettilineo, calcolando la velocità iniziale di idrolisi. Poiché nei nostri studi sono stati confrontati dendrimeri di diversa valenza, gli esperimenti sono stati condotti alla medesima concentrazione di gruppo attivo (il triazaciclononano) e variando di conseguenza la quantità di dendrimero; operando in questo modo dai valori ottenuti possiamo evidenziare direttamente l'effetto della valenza sulla reattività, eliminando il semplice effetto additivo.

Cinetiche variando la quantità di Zn²⁺

Il primo studio è consistito nel variare la quantità di ione Zn²⁺ presente in rapporto al legante, realizzando una sorta di titolazione per via cinetica dei catalizzatori multivalenti. Dai risultati (figura 3.6) si vede che lo ione legato al dendrimero presenta un'attività catalitica superiore rispetto allo ione libero in soluzione: infatti la reattività cresce fino ad un equivalente di zinco rispetto al Tacn. Raggiunta la concentrazione stechiometrica l'aumento, dovuto allo ione non complessato, è molto minore. Inoltre vi è una differenza evidente di reattività per i diversi dendroni e dendrimeri: all'aumentare della valenza la catalisi è maggiore e la saturazione viene raggiunta più rapidamente. Questo è un primo indizio della presenza di un effetto positivo della multivalenza e di una cooperatività tra i complessi metallici. La cooperatività è provata inoltre dalla forma sigmoide delle curve. Nel caso la catalisi fosse di tipo mononucleare la forma della parte iniziale sarebbe lineare [10].

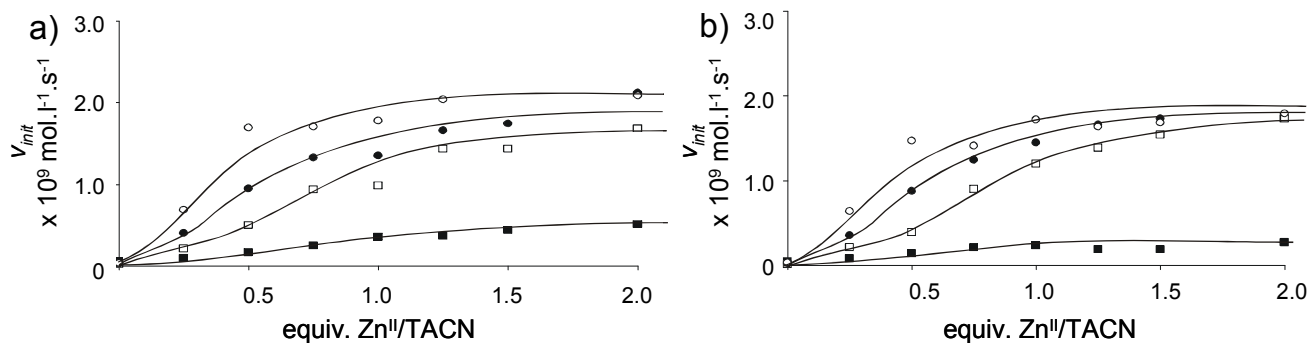


Figura 3.6 Velocità iniziali nell'idrolisi di HPNPP (a) catalizzata da: (b) dendroni d_2 (■), d_4 (□), d_6 (●), d_8 (○) ; (c) dendrimeri D_4 (■), D_8 (□), D_{16} (●), D_{32} (○) in funzione degli eq. di Zn^{II} aggiunti. Condizioni: $[Tactn]=2 \times 10^{-5}$ M, $[HPNPP]=2 \times 10^{-4}$ M, $[HEPES]=1 \times 10^{-2}$ M, $pH = 7.5$, $T = 40^\circ C$, $H_2O:CH_3CN=7:3$.

Cinetiche variando la quantità di substrato

Per ogni dendrone e dendrimero è stata quindi misurata la velocità iniziale al variare della concentrazione di substrato presente, dai valori si ottiene il grafico di saturazione per ciascun catalizzatore.

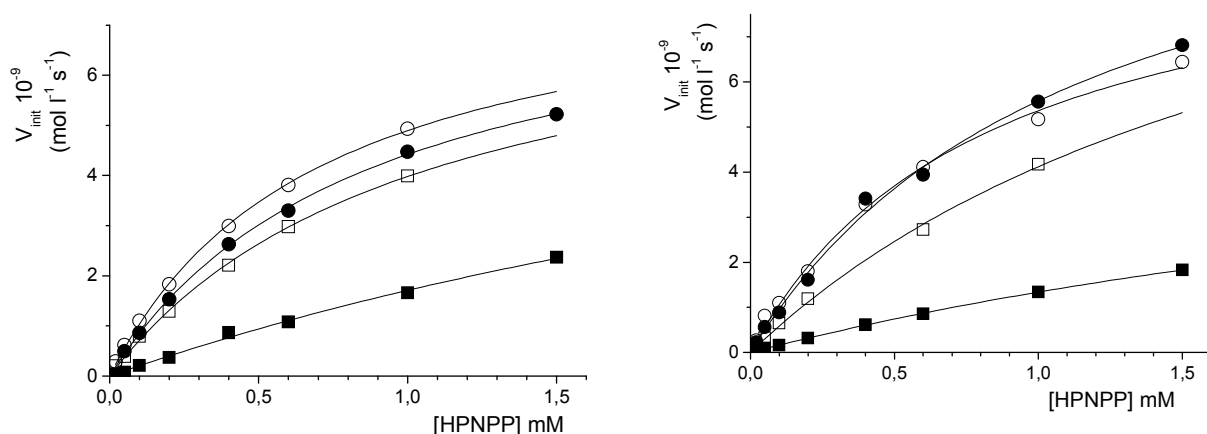
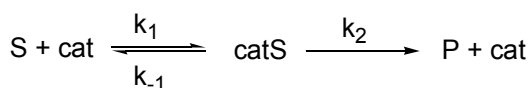


Figura 3.7 Velocità iniziali di idrolisi di HPNPP catalizzate da: dendroni d_2 (■), d_4 (□), d_8 (●), d_{16} (○); dendrimeri D_4 (■), D_8 (□), D_{16} (●), D_{32} (○) in funzione di $[HPNPP]$. Condizioni: $[Tactn]=2 \times 10^{-5}$ M, $[Zn^{II}] = 2 \times 10^{-5}$ M, $[HEPES]=1 \times 10^{-2}$ M, $pH = 7.5$, $T = 40^\circ C$, $H_2O:CH_3CN=7:3$.

I grafici ottenuti (figura 3.7) presentano, specie per i catalizzatori a valenza più alta, una curvatura e quindi un andamento simile a quello che si riscontra per gli enzimi; è possibile quindi interpolare i

dati mediante l'equazione $V_{in} = \frac{k_{cat}[cat][S]}{K_M + [S]}$, basata sul modello di Michaelis-Menten per la catalisi

enzimatica .



$$K_M = k_{-1}/k_1$$

Per ogni dendrone e dendrimero si sono ottenuti quindi i parametri catalitici di Michaelis-Menten, che sono riportati nella tabella seguente [54].

Tabella 3.1 Parametri di Michaelis-Menten per i dendroni d₂-d₁₆ e per i dendrimeri D₄-D₃₂

	n° Tacn	$k_{cat,den}$ ($\times 10^3 s^{-1}$)	$k_{cat,unit}$ ($\times 10^4 s^{-1}$)	K_M ($\times 10^3 M$)	$k_{cat,den}/K_M$ ($l.mol^{-1}.s^{-1}$)	$k_{cat,den}/k_{unecat}^a$
d ₂	2	0.6	3.2	2.8	0.2	3190
D ₄	4	1.3	3.4	4.0	0.3	6710
d ₄	4	1.6	4.1	1.0	1.6	8120
D ₈	8	4.8	6.0	1.9	2.5	24000
d ₈	8	3.3	4.1	0.9	3.8	16600
D ₁₆	16	9.6	6.0	1.2	8.4	48000
d ₁₆	16	6.7	4.2	0.7	9.5	33400
D ₃₂	32	15.6	4.9	0.8	19.0	78200

a: $k_{unecat} = 2 \cdot 10^{-7} s^{-1}$ [43].

I valori di accelerazione catalitica sono molto buoni: giungono infatti ad un incremento di 80000 volte rispetto all'idrolisi spontanea per il dendrimero D₃₂, a concentrazioni inferiori al micromolare, questi valori pongono il sistema tra i migliori riportati in letteratura per questo tipo di reazione [55-59]. Inoltre i parametri mostrano una variazione al variare della valenza, e anche una differenza tra dendroni e dendrimeri della stessa valenza; un'analisi più approfondita e una interpretazione dei risultati sarà trattata nel capitolo successivo.

Cinetiche variando la quantità di catalizzatore

Su ciascun catalizzatore è stato effettuato poi uno studio in forma invertita rispetto al precedente: è stata mantenuta costante la concentrazione del substrato ed è stata variata la quantità di complesso metallico presente. Inoltre le reazioni sono state condotte in eccesso di catalizzatore rispetto al substrato. Anche in questo caso i grafici presentano un andamento a saturazione (figura 3.8) e possono quindi essere interpolati in modo analogo al caso precedente, mediante l'equazione

$$V_{in} = \frac{k_{cat,site}[cat][S]}{K_{M,site} + [cat]}$$

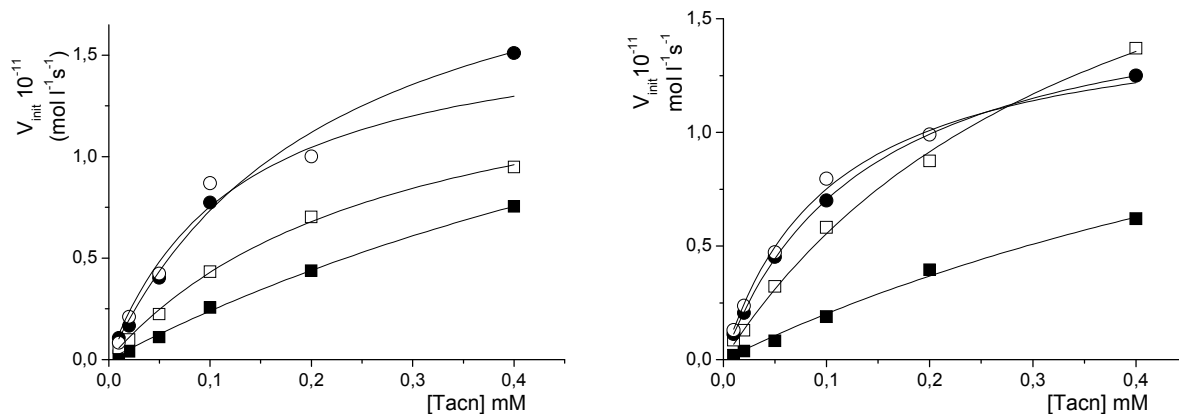


Figura 3.8 Velocità iniziali di idrolisi di HPNPP catalizzate da: dendroni d_2 (■), d_4 (□), d_8 (●), d_{16} (○); dendrimeri D_4 (■), D_8 (□), D_{16} (●), D_{32} (○) in funzione di [Tacn]. Condizioni: [HPNPP]= 2×10^{-5} M, $[Zn^{II}] = 1$ eq risp Tacn, [HEPES]= 1×10^{-2} M, pH = 7.5, T = 40°C, H₂O:CH₃CN=7:3.

Tabella 3.2 Parametri di Michaelis-Menten “inversa” per i dendroni d_2 - d_{16} e per i dendrimeri D_4 - D_{32}

	n° Tacn	$k_{cat,site}$ ($\times 10^4$ s ⁻¹)	$K_{M,site}$ ($\times 10^4$ M)	$k_{cat,site}/K_{M,site}$ (l.mol ⁻¹ .s ⁻¹)
d_2	2	1.34	10.2	0.13
D_4	4	1.06	9.46	0.11
d_4	4	0.82	2.80	0.29
D_8	8	1.32	3.74	0.35
d_8	8	1.18	2.21	0.53
D_{16}	16	0.84	1.38	0.60
d_{16}	16	0.86	1.28	0.72
D_{32}	32	0.77	1.05	0.73

In questo caso, in condizioni di saturazione, si può assumere che per ogni dendrone o dendrimero sia presente solo una molecola di substrato, quindi i parametri catalitici calcolati $k_{cat,site}$ e $K_{M,site}$ (tabella 3.2) possono essere riferiti ad un singolo sito catalitico [57]. Il confronto dei valori ottenuti con quelli di Michaelis-Menten “classici” permette quindi di ottenere una stima del numero di siti attivi presenti in ogni catalizzatore. Una discussione più ampia sarà effettuata nel prossimo capitolo.

3.2.2 DENDRIMERI DAP-ATANP

I dendrimeri del tipo DAP-ATANP sono stati testati dal punto di vista catalitico nelle stesse condizioni utilizzate per i dendrimeri a base di lisina. I risultati sono stati però decisamente differenti. Misurando la velocità di idrolisi dell'HPNPP al variare della quantità di Zn^{2+} presente, si vede che i metallodendrimeri non presentano alcuna attività catalitica, anzi hanno un effetto inibitorio nei confronti dell'attività dello ione metallico (figura 3.9a). I composti sono stati anche testati nei confronti dell'idrolisi di un estere carbossilico, il p-nitrofenil butirrato (PNPB), e anche in questo caso l'attività catalitica è risultata nulla (figura 3.9b). L'origine di questi risultati negativi non è stata ancora ben chiarita, una possibile spiegazione è che lo ione metallico venga complessato, oltre che dal triazaciclononano, anche dai numerosi gruppi ammidici presenti nella struttura del dendrimero; in queste condizioni la sua sfera di coordinazione risulterebbe saturata e l'attività catalitica inibita in quanto il substrato non sarebbe in grado di coordinarsi allo ione metallico.

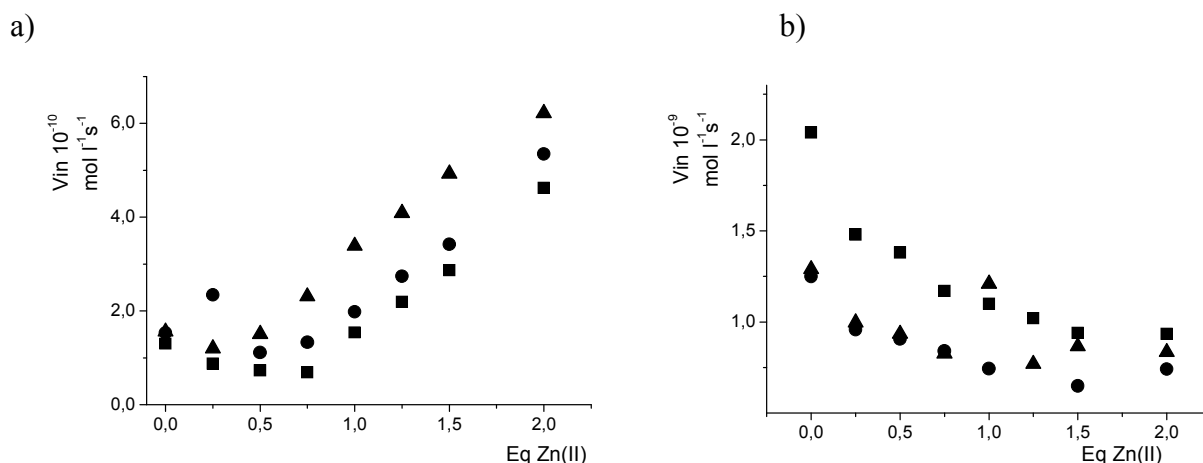


Figura 3.9 Velocità iniziali nell'idrolisi di a) HPNP e b) PNPB catalizzata da dendrimeri DAP-ATANP D₂ (■), D₆ (●), D₁₄ (▲), in funzione degli eq. di Zn(II) aggiunti. Condizioni: [Tacn]= 2×10^{-5} M, [substrato] = 2×10^{-4} M, [HEPES]= 1×10^{-2} M, pH = 7.5, T = 40°C, H₂O:CH₃CN=7:3.

Gli esperimenti di idrolisi dell'HPNPP sono stati ripetuti sostituendo lo Zn^{2+} con uno ione Ln(III), che è di dimensioni maggiori e presenta un numero di coordinazione più alto. L'effetto catalitico è risultato però molto basso e paragonabile a quello dello ione libero in soluzione, non evidenziando quindi alcun effetto positivo dovuto a interazioni cooperative (figura 3.10).

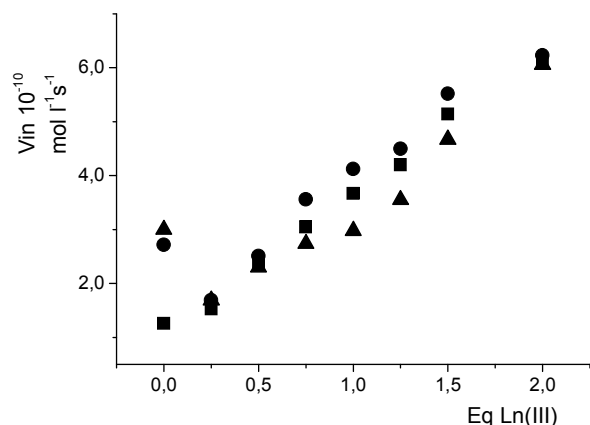


Figura 3.10 Velocità iniziali nell'idrolisi di HPNP catalizzata da dendrimeri DAP-ATANP D₂ (●), D₆ (▲), e in assenza di legante (■), in funzione degli eq. di Ln(NO₃)₃ aggiunti. Condizioni: [Tacn]=2x10⁻⁵ M, [HPNPP] = 2x10⁻⁴ M, [HEPES]=1x10⁻² M, pH = 7.5, T = 40°C, H₂O:CH₃CN=7:3.

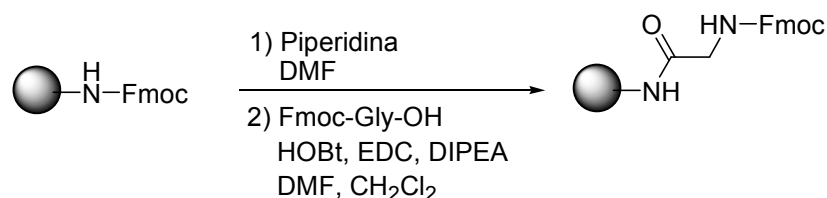
3.3 PARTE SPERIMENTALE

Per i reagenti e la strumentazione utilizzata si rimanda al capitolo 2.5

MALDI-MS: le misurazioni sono state effettuate dal dott. F. Galbiati, con uno strumento Voyager-DE PRO 6181, presso il gruppo di ricerca della prof.ssa H. Wennemers, al dipartimento di Chimica dell'Università di Basilea.

3.3.1 PROCEDURE PER LA SINTESI SU FASE SOLIDA E L'ANALISI

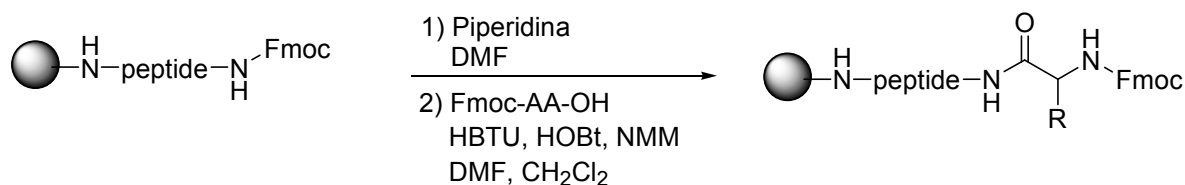
Attacco della glicina su resina Tentagel-RAM:



300 mg di resina Tentagel-RAM (Fluka, loading 0,35 mmol/g) sono stati posti in un reattore per SPS e rigonfiati con CH₂Cl₂ per 15'. Vengono aggiunti 1 ml di piperidina 20 % in DMF per 15', la resina viene lavata 2x DMF, quindi il trattamento viene ripetuto per 15', la resina viene quindi lavata 3x DMF e 3x CH₂Cl₂. 90 mg di Fmoc-Gly-OH (3 eq.) sono stati sciolti in 2 ml di DMF, quindi sono stati aggiunti nell'ordine 60 mg di HOBt (4 eq.), 80 mg di EDC (4 eq.), 2 ml di CH₂Cl₂, 300 µl di DIPEA (20 eq.). Dopo 10' sotto agitazione la soluzione è stata aggiunta alla resina e il

trattamento è proseguito per 2 h e 30'. La resina alla fine è stata lavata 3x DMF e 3x CH₂Cl₂, il coupling con la glicina è stato quindi ripetuto con le medesime quantità per 2 h e 30'. La completezza della reazione è stata verificata mediante Kaiser test.

Coupling di un Fmoc-amminoacido su resina (procedura generale).



Deprotezione Fmoc:

Alla resina vengono aggiunti 2 ml di piperidina 20 % in DMF per 15'. Dall'assorbanza della soluzione a 301 nm è possibile ricavare il loading in gruppi amminici della resina (basandosi su $\epsilon = 7800$). La resina viene lavata 2x DMF, quindi viene effettuato un ulteriore trattamento con piperidina, al termine del quale la resina viene lavata 3x DMF e 3x CH₂Cl₂.

Coupling:

Il Fmoc amminoacido (3 eq.) viene sciolto in 1 ml di DMF anidra e vengono aggiunti nell'ordine 4 eq. di HBTU, 4 eq. di HOBT, 1 ml di CH₂Cl₂, 20 eq. di N-metilmorfolina. La soluzione viene posta in agitazione a T ambiente per 10 minuti, quindi viene aggiunta alla resina e il coupling avviene a T ambiente sotto scuotimento al riparo dalla luce per 2 h e 30', al termine la resina viene filtrata e lavata 3x DMF e 3x CH₂Cl₂. Il coupling viene ripetuto con la medesima procedura per altre 2 h e 30'. La completezza della reazione viene verificata dall'esito negativo del Kaiser test.

Procedura di acetilazione su fase solida

La resina viene trattata con una soluzione composta dal 50 % di anidride acetica, 25 % di DIPEA e 25 % di CH₂Cl₂, il trattamento prosegue per 2 h 30', quindi la resina viene lavata con 3x DMF e 3x CH₂Cl₂. La completezza viene verificata mediante Kaiser test.

Procedura di sblocco dalla resina

Alla resina viene aggiunta una soluzione di TFA con 10 % di CH₂Cl₂ e il 10% di triisopropilsilano con una goccia d'acqua. La reazione viene proseguita per 1 h, quindi la resina viene filtrata, la resina viene quindi ripresa con metanolo, e nuovamente filtrata. Le soluzioni raccolte vengono portate a secco con concentratore rotativo a vuoto, il residuo viene precipitato con etere etilico e il

3 - DENDRIMERI COME CATALIZZATORI

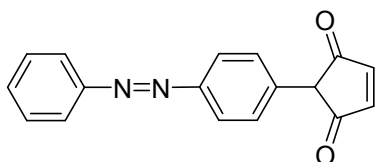
surnatante viene eliminato. Il peptide viene quindi sciolto in H₂O/ACN 1:1, e la concentrazione determinata mediante analisi spettrofotometrica con il reattivo di Ellmann.

Sblocco analitico

10 mg di resina vengono posti in un reattore per SPS. Vengono aggiunti 1 ml di piperidina 20 % in DMF per 15', la resina viene lavata 2x DMF, quindi il trattamento viene ripetuto per 15', la resina viene quindi lavata 3x DMF e 3x CH₂Cl₂. Si procede quindi all'acetilazione delle ammine libere, trattando la resina con 200 µl di CH₂Cl₂ + 200 µl di DIPEA + 400 µl di anidride acetica per 2 h e 30', al termine la resina viene lavata con 3x DMF e 3x CH₂Cl₂. Lo sblocco viene effettuato aggiungendo nell'ordine 100 µl di CH₂Cl₂ + 100 µl di tri-isopropilsilano + 700 µl di TFA + 1 goccia di H₂O e lasciando reagire per 1 h. Il filtrato viene recuperato e la resina viene ripresa e lavata con metanolo. Le soluzioni recuperate vengono portate a secco mediante centrifuga evaporativa, e il residuo viene sciolto in 200µl di ACN + 200 µl di H₂O.

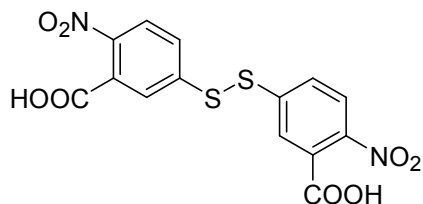
Tagging e analisi HPLC

Come dye viene utilizzata la 4-fenilazomaleinanile (CAS 16201-96-0), a 20 µl della soluzione del peptide vengono aggiunti 20 µl di tampone fosfato pH 7,0 0,1 M e 3 µl di soluzione della maleimmide in DMF 0,01 M preparata di fresco; dopo 10' la soluzione viene iniettata all'HPLC.



Quantificazione dei tioli: Test di Ellmann

La concentrazione di tioli in soluzione viene determinata mediante misura UV-VIS in seguito a reazione con il 5,5'-ditio-bis(acido p-nitrobenzoico) (DTNB, CAS 69-78-3), la presenza del tiolo è evidenziata dalla comparsa di una colorazione gialla. La procedura riportata si riferisce a soluzioni con concentrazione di tiolo tra 1 e 8 mmol/l.



In una cuvetta a volume ridotto vengono aggiunti nell'ordine:

400 µl di tampone fosfato pH 7,0 0,2 M ([tamp] = 0,1 M)

40 µl DTNB 2 10⁻³ M in soluzione acquosa di Acetato di sodio 0,05 M ([DTNB] = 1 10⁻⁴ M)

8 µl soluzione tiolo ([tiolo] = $1.8 \cdot 10^{-3}$ M)

qb a 800 µl di H₂O

Dopo 10 minuti viene misurata l'assorbanza a 412 nm; la concentrazione è stata ricavata basandosi su una retta di taratura ottenuta da soluzioni a titolo noto di acetil-cisteina ($\epsilon = 13468$).

Dimerizzazione dendroni

Dalla soluzione del dendrone sono stati prelevati 200 µl , che sono stati posti in un matraccio da 1 ml e sono stati portati a volume con 400 µl di soluzione pH 10 di NaOH in H₂O e 400 µl di ACN. Nel matraccio è stata inserita una cannula di plastica, collegata ad un palloncino gonfio d'aria, mediante la quale è stata insufflata aria all'interno della soluzione, mantenuta in agitazione grazie ad un'ancoretta magnetica. La completezza della dimerizzazione, che ha richiesto dalle tre alle sei ore, è stata verificata mediante scomparsa del tiolo libero al test di Ellmann.

Blocco del tiolo con etilmaleimmide

Dalla soluzione del dendrone sono stati prelevati 200 µl , che sono stati posti in un matraccio da 1 ml. E' stato quindi aggiunto un equivalente di etilmaleimmide come soluzione 0,05 M in metanolo, quindi la soluzione è stata portata a volume con una pari quantità di soluzione di NH₄Cl a pH 7 e di ACN. La completezza della reazione, che avviene entro un'ora, è stata verificata mediante scomparsa del tiolo libero al test di Ellmann.

3.3.2 DENDRIMERI POLI-LYS- TACN

Sintesi su fase solida

La sintesi della serie di dendroni a varia valenza è stata effettuata a partire da un unico batch di resina, nel corso della sintesi una volta aggiunta una generazione al peptide ramificato, una parte della resina è stata separata, funzionalizzata con Tacn e il prodotto è stato sbloccato dalla fase solida. La parte di resina rimanente è stata invece utilizzata per la crescita successiva.

Questo è lo schema dettagliato della sintesi:

3 - DENDRIMERI COME CATALIZZATORI

Resina Tentagel-RAM

Deprotezione Fmoc

Coupling con Fmoc-Gly-OH

Deprotezione Fmoc

Coupling con Fmoc-Cys(S-Trt)-OH

Deprotezione Fmoc

Coupling con Fmoc-Lys(N-Fmoc)-OH

Separata una parte

Deprotezione Fmoc

Coupling con (di-Boc)-Tacn-CH₂COOH

Sblocco dalla resina. Ottenuto dendrone d2-Tacn (**12**)

Deprotezione Fmoc

Coupling con Fmoc-Lys(N-Fmoc)-OH

Separata una parte

Deprotezione Fmoc

Coupling con (di-Boc)-Tacn-CH₂COOH

Sblocco dalla resina. Ottenuto dendrone d4-Tacn (**13**)

Deprotezione Fmoc

Coupling con Fmoc-Lys(N-Fmoc)-OH

Separata una parte

Deprotezione Fmoc

Coupling con (di-Boc)-Tacn-CH₂COOH

Sblocco dalla resina. Ottenuto dendrone d8-Tacn (**14**)

Deprotezione Fmoc

Coupling con Fmoc-Lys(N-Fmoc)-OH

Deprotezione Fmoc

Coupling con (di-Boc)-Tacn-CH₂COOH

Sblocco dalla resina. Ottenuto dendrone d16-Tacn (**15**)

Analisi HPLC (composti S-funzionalizzati con Dye)

Colonna: Phenomenex Jupiter 4u Proteo 90A

Eluenti: A: H₂O, 0,1 % TFA; B: Acetonitrile 0,1 % TFA

Gradiente: t = 0, B = 10 %; t = 50', B = 50 %; t = 60', B = 90 %; t = 65', B = 90 %; t = 75', B = 10%.

Flusso: 0,8 ml/min

Rivelatore: UV-VIS $\lambda = 328$ nm.

In alcuni casi si hanno due picchi per la presenza di due diastereoisomeri in seguito al coupling tiolo-maleimmide. Il dye in eccesso non reagito esce a 62,6 min.

Dendrone d2-Tacn (**12**): 32.8 min, 33.4 min;

Dendrone d4-Tacn (**13**): 26.5 min, 27.2 min;

Dendrone d8-Tacn (**14**): 23.8 min;

Dendrone d16-Tacn (**15**): 20.0 min.

Analisi HPLC

Colonna: Agilent Zorbax, C18, 300 Å

Eluenti: A: H₂O, 0,1 % TFA; B: Acetonitrile 0,1 % TFA

Gradiente: t = 0, B = 5 %; t = 5', B = 5 %; t = 20', B = 50 %; t = 30', B = 90 %; t = 40', B = 5 %.

Flusso: 0,8 ml/min

Rivelatore: UV-VIS $\lambda = 230$ nm.

Dendrone d2-Tacn (**12**): 13.8 min;

Dendrone d4-Tacn (**13**): 14.8 min;

Dendrone d8-Tacn (**14**): 16.3 min;

Dendrone d16-Tacn (**15**): 17.0 min.

Dendrimero D4-Tacn: 13.1 min;

Dendrimero D8-Tacn: 14.6 min;

Dendrimero D16-Tacn: 15.6 min;

Dendrimero D32-Tacn: 16.5 min;

Analisi di massa

Le analisi di massa sono state effettuate mediante spettrometria ESI-MS con eluente: (H₂O + 0.1% HCOOH / ACN + 0.1% HCOOH = 1:1).

Per i composti di dimensione maggiore è stata invece utilizzata la tecnica MALDI-TOF.

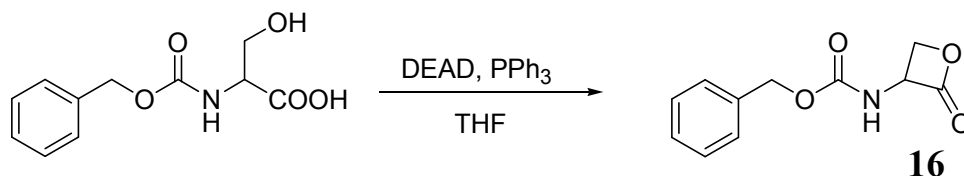
Dendrone d2-Tacn (**12**): ESI(+): m/z 645.0 (M+H⁺, calc. 644.4);

Dendrone d4-Tacn (**13**): ESI(+): m/z 1238.8 (M+H⁺, calc. 1238.8), 620.0 (M+2H⁺, calc. 619.9), 413.7 (M+3H⁺, calc. 413.6), 310.6 (M+4H⁺, calc. 310.5);

Dendrone d8-Tacn (**14**): MALDI-TOF: 2430 (M+H⁺, calc. 2428);

Dendrone d16-Tacn (**15**): MALDI-TOF: 4800 (M+H⁺, calc. 4804);

Dendrimero D4-Tacn: ESI(+): m/z 1286.0 (M+H⁺, calc. 1285.8).

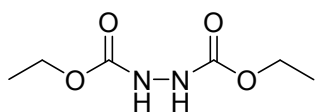
3.3.3 DENDRIMERI DAP- ATANP**Z-serina lattone (16)**

[60] (Pansare, S.V., *Organic Synthesis*, **1998**, 9, 58).

In un pallone a tre colli sotto N₂ sono stati posti 5,2 g di trifenilfosfina (21 mmol, 1 eq.) sciolti in 50 ml di THF anidro. La soluzione è stata raffreddata a -70 °C e sono stati aggiunti goccia a goccia sotto N₂ 9,6 ml di dietilazodicarbossilato (DEAD, 40 % wt in toluene, 21 mmol, 1 eq.) sciolti in 15 ml di THF anidro. Successivamente mediante imbuto gocciolatore sono stati aggiunti sotto N₂ 5 g di Z-serina (21 mmol) sciolti in 25 ml di THF anidro. La reazione è proseguita per 15' a -70 °C, e

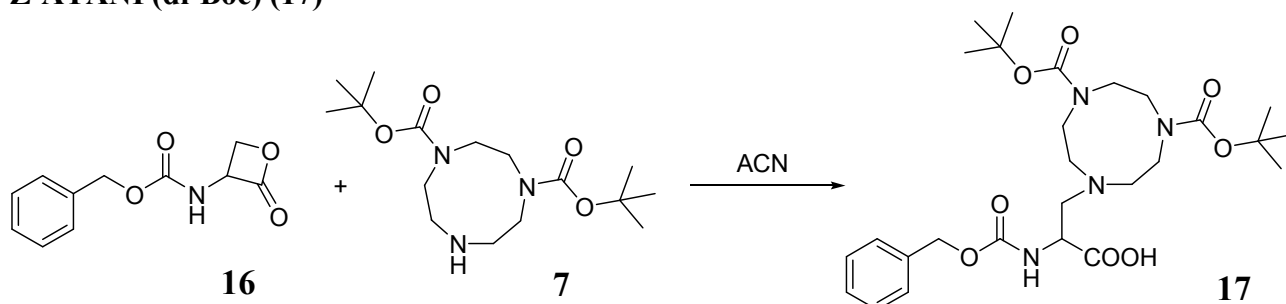
3 - DENDRIMERI COME CATALIZZATORI

quindi per 3 h a temperatura ambiente; il precipitato inizialmente presente si scioglie formando una soluzione gialla. TLC: SiO₂ (etere di petrolio, 40 % etile acetato) Rf: 0.5 (UV + Blue shift), 0.3 (UV + Blue shift, prodotto), 0.15 (Blue shift), 0 (Blue shift). La soluzione è stata portata a secco e il prodotto è stato purificato il giorno stesso, in quanto non è stabile nelle condizioni di reazione. Cromatografia: SiO₂ Flash (etere petrolio / etile acetato 20 %, dopo uscita prima macchia etile acetato 40 %). Il prodotto portato a secco è stato sciolto in 10 ml di etile acetato, sono stati aggiunti 100 ml di etere di petrolio e dopo una notte a 0 °C si ha la formazione di 2,9 g di cristalli bianchi aghifomi. Dall'analisi NMR si vede che il prodotto cristallizza insieme a 0.7 equivalenti di dietil idrazina-1,2-dicarbossilato.



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.34 (m, 5H, H fenile); 6.56 (br, 1H, NH); 5.80 (d, J=7 Hz, 1H, CH lattone); 5.13 (s, 2H, CH₂ benzile); 4.43 (d, J=7 Hz, 2H, CH₂ lattone); 4.19 (q, J=7 Hz, 2.8H, CH₂CH₃ idrazina); 1.25 (t, J=7 Hz, 4.2H, CH₂CH₃ idrazina).

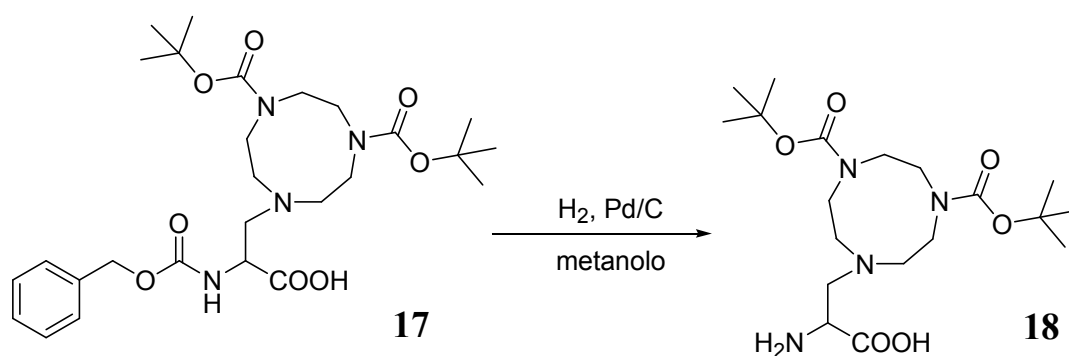
Z-ATANP(di-Boc) (17)



1 g di di-Boc-triazaciclononano (3 mmol) (**7**) è stato sciolto in 20 ml di acetonitrile anidro, sono stati poi aggiunti 1,1 g di Z-serina lattone (cocristallizzato con 0.7 equivalenti di dietil idrazina-1,2-dicarbossilato, 3 mmol, 1 eq.) (**16**) sciolti in 5 ml di ACN anidro. La reazione è proseguita per 4 giorni a temperatura ambiente sotto N₂. TLC: SiO₂ (45 % etere di petrolio / 45 % etile acetato / 9 % etanolo / 1 % acido acetico) Rf: 0.5 (UV), 0.45 (nin.), 0.4 (nin.), 0.25 (UV + nin., prodotto), 0.05 (nin., di-Boc-Tacn). La soluzione è stata evaporata e il prodotto è stato purificato mediante cromatografia SiO₂ Flash (CHCl₃ / MeOH da 1 % a 3 %). Sono stati ottenuti 1,34 g di prodotto come olio giallo-trasparente (2.4 mmol, resa 81 %).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.34 (m, 5H, H fenile); 5.91 (b, 1H, NH); 5.09 (s, 2H, CH₂ benzile); 4.21 (m, 1H, CH α); 3.52-2.73 (m, br, 14H, CH₂ β + 6 CH₂ Tacn); 1.47 (s, 18H, CH₃ t-Bu).

ESI-MS (m/z): 551.3 (M+H⁺).

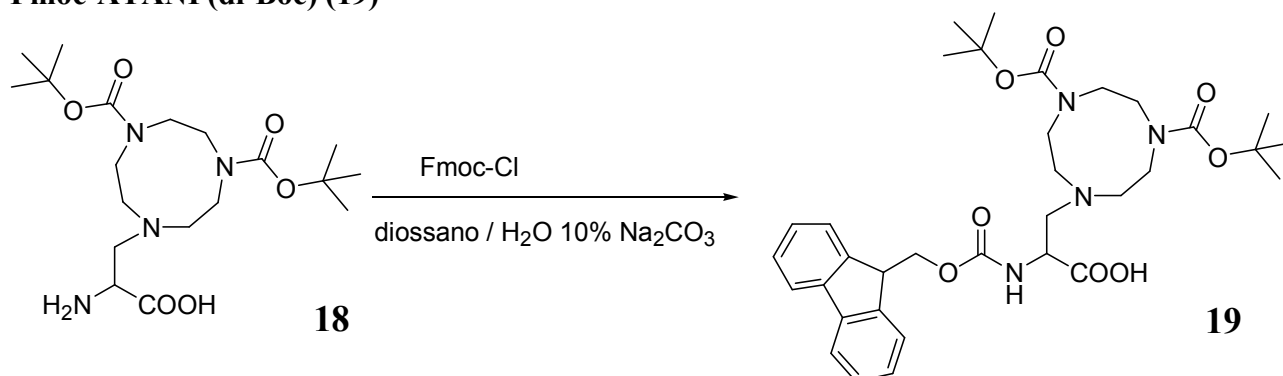
ATANP(di-Boc) (18)

1,34 g di Z-ATANP(di-Boc) (**17**) (2.4 mmol) sono stati sciolti in 30 ml di metanolo anidro, sono stati aggiunti 100 mg di Pd/C 10 % wtm e la soluzione è stata posta sotto atmosfera di H₂ per 4 h.

La soluzione è stata filtrata su celite, lavata con metanolo ed evaporata, per ottenere 886 mg di solido giallo chiaro (2.1 mmol, 88 % resa).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 3.76-2.64 (m, br, 15H, CH α + CH₂ β + 6 CH₂ Tacn); 1.47 (s, 18H, CH₃ t-Bu).

ESI-MS (m/z): 417.2 (M+H⁺), 431.2 (M+Na⁺).

Fmoc-ATANP(di-Boc) (19)

886 mg di ATANP(di-Boc) (**18**) (2.1 mmol) sono stati sospesi in 20 ml di H₂O 10 % Na₂CO₃. A 0 °C sono stati aggiunti 830 mg di fluorenilmetil cloroformiato (Fmoc-Cl, 3.2 mmol, 1.5 eq.) sciolti in 20 ml di diossano, la reazione è proseguita a temperatura ambiente per 3 h. TLC: SiO₂ (CHCl₃ / MeOH 10 %) Rf: 0.8 (UV, Fmoc-Cl), 0.65 (UV, Fmoc-Cl), 0.3 (UV + nin., prodotto), 0.1 (nin., ATANP).

Sono stati aggiunti 20 ml di H₂O e soluzione di HCl 1 M fino a pH 3, ottenendo la formazione di un precipitato colloso. La soluzione è stata estratta con 3x 75 ml di etile acetato, le fasi organiche sono state lavate con 2x 100 ml, anidificate ed evaporate, il diossano è stato eliminato mediante distillazione sotto vuoto con Kuglehor ottenendo 1.38 di prodotto grezzo come olio giallo.

3 - DENDRIMERI COME CATALIZZATORI

Il prodotto è stato purificato mediante cromatografia SiO₂ Flash (CHCl₃ / MeOH 5 %) ottenendo 700 mg di solido bianco (1.1 mmol, 52 % resa).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.74 (d, J=7 Hz, 2H, CH_{arom} Fmoc); 7.60 (d, J=7 Hz, 2H, CH_{arom} Fmoc); 7.36 (m, 4H, CH_{arom} Fmoc); 6.60 (br, 1H, NH); 4.32-4.17 (m, br, 4H, CH Fmoc + CH₂ Fmoc + CH α); 3.51-3.40 (m, br, 10H, CH₂ β + 4 CH₂ Tacn); 2.80 (m, br, 4H, NCH₂CH₂N(Boc)); 1.47 (s, 18H, CH₃ t-Bu).

ESI-MS (m/z): 639.3 (M+H⁺).

HPLC: colonna Colonna: Phenomenex Jupiter 4u Proteo 90A

Eluenti: A: H₂O, 0,1 % TFA; B: Acetonitrile 0,1 % TFA

Gradiente: B: da 10 % a 50 % in 25', da 50 % a 90 % in 10'. Flusso: 0,8 ml/min. λ = 328 nm.
rt = 30.3 min.

Sintesi dendroni-ATANP a varia valenza

La sintesi della serie di dendroni a varia valenza è stata effettuata a partire da un unico batch di resina, nel corso della sintesi una volta aggiunta una generazione al peptide ramificato, una parte della resina è stata separata, funzionalizzata con Tacn e il prodotto è stato sbloccato dalla fase solida. La parte di resina rimanente è stata invece utilizzata per la crescita successiva.

Questo è lo schema dettagliato della sintesi:

Resina Tentagel-RAM

Deprotezione Fmoc

Coupling con Fmoc-Gly-OH

Deprotezione Fmoc

Coupling con Fmoc-Cys(S-Trt)-OH

Deprotezione Fmoc

Coupling con Fmoc-ATANP(di-Boc)-OH

Separata una parte

Deprotezione Fmoc

Acetilazione

Sblocco dalla resina. Ottenuto dendrone d1-ATANP (**20**)

Deprotezione Fmoc

Coupling con Fmoc-Gly-OH

Deprotezione Fmoc

Coupling con N,N'-Fmoc-DAP-OH

Deprotezione Fmoc

Coupling con Fmoc-ATANP(di-Boc)-OH

Separata una parte

Deprotezione Fmoc

Acetilazione

Sblocco dalla resina. Ottenuto dendrone d3-ATANP (**21**)

Deprotezione Fmoc
Coupling con Fmoc-Gly-OH
Deprotezione Fmoc
Coupling con N,N'-Fmoc-DAP-OH
Deprotezione Fmoc
Coupling con Fmoc-ATANP(di-Boc)-OH
Deprotezione Fmoc
Acetilazione
Sblocco dalla resina. Ottenuto dendrone d7-ATANP (**22**)

Analisi HPLC (composti S-funzionalizzati con Dye)

Colonna: Phenomenex Jupiter 4u Proteo 90A
Eluenti: A: H₂O, 0,1 % TFA; B: Acetonitrile 0,1 % TFA
Gradiente: t = 0, B = 10 %; t = 50', B = 50 %; t = 60', B = 90 %; t = 65', B = 90 %; t = 75', B = 10%.
Flusso: 0,8 ml/min
Rivelatore: UV-VIS $\lambda = 328$ nm.

In molti casi si hanno due picchi per la presenza di due diastereoisomeri in seguito al coupling tiolo-maleimmide. Il dye in eccesso non reagito esce a 62,6 min.

NAc-Gly-Cys(S-Dye)-NAc: 46,7 min.
ESI-MS (H₂O + 0,1 % HCOOH, ACN + 0,1 % HCOOH, 1:1): m/z: 535.0 (M + K⁺, 10 %, calc. 535.1), 519.1 (M + Na⁺, 50 %, calc. 519.1), 497.1 (M + H⁺, 100 %, calc. 497.2).

Dendrone d1-ATANP (**20**):

NAc-Gly-Cys(S-Dye)-ATANP-NAc: 36,0 min, 36,7 min.
ESI-MS (H₂O + 0,1 % HCOOH, ACN + 0,1 % HCOOH, 1:1): m/z: 695.3 (M + H⁺, 100 %, calc. 695.3), 348.2 (M + 2H⁺, 20 %, calc. 348.2).

NAc-Gly-Cys(S-Dye)-ATANP-Gly-NAc: 35,4 min, 36,2 min.
ESI-MS (H₂O + 0,1 % HCOOH, ACN + 0,1 % HCOOH, 1:1): m/z: 752.3 (M + H⁺, 100 %, calc. 752.3), 376.6 (M + 2H⁺, 40 %, calc. 376.6).

NAc-Gly-Cys(S-Dye)-ATANP-Gly-DAP-(NAc)₂: 38,1 min, 39,1 min.
ESI-MS (H₂O + 0,1 % HCOOH, ACN + 0,1 % HCOOH, 1:1): m/z: 902.4 (M + Na⁺, 25 %, calc. 902.4), 880.5 (M + H⁺, 100 %, calc. 880.4), 440.8 (M + 2H⁺, 60 %, calc. 440.7).

Dendrone d3-ATANP (**21**):

NAc-Gly-Cys(S-Dye)-ATANP-Gly-DAP-(ATANP-NAc)₂: 30,7 min, 31,5 min.
ESI-MS (H₂O + 0,1 % HCOOH, ACN + 0,1 % HCOOH, 1:1): m/z: 1276.8 (M + H⁺, 5 %, calc. 1276.8), 649.9 (M + H⁺ + Na⁺, 40 %, calc. 649.9), 638.9 (M + 2H⁺, 100 %, calc. 638.9), 426.4 (M + 3H⁺, 90 %, calc. 426.2).

NAc-Gly-Cys(S-Dye)-ATANP-Gly-DAP-(ATANP-Gly-NAc)₂: 30,4 min, 31,1 min.
ESI-MS (H₂O + 0,1 % HCOOH, ACN + 0,1 % HCOOH, 1:1): m/z: 695.9 (M + 2H⁺, 70 %, calc. 695.9), 464.4 (M + 3H⁺, 100 %, calc. 464.2).

3 - DENDRIMERI COME CATALIZZATORI

NAc-Gly-Cys(S-Dye)-ATANP-Gly-DAP-(ATANP-Gly-DAP-(NAc)₂)₂: 30,0 min, 30,7 min.
ESI-MS (H₂O + 0,1 % HCOOH, ACN + 0,1 % HCOOH, 1:1): m/z: 824.0 (M + 2H⁺, 40 %, calc. 823.9), 549.9 (M + 3H⁺, 100 %, calc. 549.6).

Dendrone d7-ATANP (22):

NAc-Gly-Cys(S-Dye)-ATANP-Gly-DAP-(ATANP-Gly-DAP-(ATANP-NAc)₂)₂: 27,0 min.
ESI-MS (H₂O + 0,1 % HCOOH, ACN + 0,1 % HCOOH, 1:1): m/z: 814.1 (M + 3H⁺, 30 %, calc. 814.1), 610.8 (M + 4H⁺, 100 %, calc. 610.9), 488.9 (M + 5H⁺, 30 %, calc. 488.9).

3.3.4 ESPERIMENTI CINETICI

Gli esperimenti cinetici di attività catalitica sono state seguiti utilizzando un lettore a micropiastre a 96 pozzetti, misurando ad intervalli regolari di tempo l'assorbanza a 401 nm relativa alla forma deprotonata del p-nitrofenolo liberatosi. Le cinetiche sono state svolte a pH 7.5 tamponato con HEPES, a 40°C, ponendo nel pozzetto per prima la soluzione del dendrimero, quindi il tampone e Zn(II), per formare in situ il complesso Zn-Tacn attivo. Solo alla fine è stato aggiunto il substrato, la soluzione è stata portata a volume (250 µl) con H₂O milliQ e ACN (30 %). Le velocità iniziali sono state calcolate dal fitting lineare della parte iniziale delle curve cinetiche (conversione < 10 %), i valori in assorbanza sono stati convertiti in valori in concentrazione utilizzando una retta di taratura per il p-nitrofenolo.

Per ricavare k_{cat} e K_M , è stato eseguito un fitting numerico, utilizzando l'equazione di Michaelis-Menten, per mezzo del programma Origin[®].

Soluzioni madre:

- Dendrimeri: $1 \cdot 10^{-3}$ M in gruppi Tacn in H₂O/ACN 1:1
- Zn(NO₃)₂: $1 \cdot 10^{-3}$ M in H₂O
- La(NO₃)₂: $1 \cdot 10^{-3}$ M in H₂O
- Tampone: HEPES 0.1 M in H₂O pH 7.5
- HPNPP: 0.01 M in H₂O
- BNPB: 0.01 M in H₂O

Idrolisi HPNPP variando [Zn²⁺].

Condizioni utilizzate: [Tacn] = $2 \cdot 10^{-5}$ M
[Zn²⁺] = $0 - 4 \cdot 10^{-5}$ M
[HPNPP] = $2 \cdot 10^{-4}$ M
[HEPES] = 0.01 M pH 7.5

Idrolisi HPNPP variando [HPNPP].

Condizioni utilizzate: $[\text{Tacn}] = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
 $[\text{Zn}^{2+}] = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
 $[\text{HPNPP}] = 0.1 - 1.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
 $[\text{HEPES}] = 0.01 \text{ M pH } 7.5$

Idrolisi HPNPP variando [Tacn].

Condizioni utilizzate: $[\text{Tacn}] = 0.1 - 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
 $[\text{Zn}^{2+}] = 1 \text{ equivalente rispetto a Tacn}$
 $[\text{HPNPP}] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
 $[\text{HEPES}] = 0.01 \text{ M pH } 7.5$

Idrolisi PNPB variando $[\text{Zn}^{2+}]$.

Condizioni utilizzate: $[\text{Tacn}] = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
 $[\text{Zn}^{2+}] = 0 - 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
 $[\text{PNPB}] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
 $[\text{HEPES}] = 0.01 \text{ M pH } 7.5$

Idrolisi HPNPP variando $[\text{Ln}^{3+}]$.

Condizioni utilizzate: $[\text{Tacn}] = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
 $[\text{Ln}^{3+}] = 0 - 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
 $[\text{HPNPP}] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
 $[\text{HEPES}] = 0.01 \text{ M pH } 7.5$

4 L'EFFETTO DENDRIMERICO: ANALISI DEI DATI E MODELLI TEORICI

Una caratteristica tipica dei catalizzatori basati su dendrimeri, come si è già visto nell'introduzione, è un'attività che cresce all'aumentare della valenza del dendrimero. Questo effetto, definito "effetto dendrimerico", sembra essere presente anche nei dendrimeri da noi testati: l'efficacia catalitica infatti aumenta al crescere del numero di gruppi Tacn legati. Per comprendere da cosa ha origine questa attività superiore è stato analizzato come i parametri catalitici di Michaelis-Menten k_{cat} e K_M varino al crescere della valenza. Sono stati quindi sviluppati dei modelli teorici per simulare un catalizzatore multivalente, e i risultati ottenuti sono stati confrontati con i dati sperimentali.

4.1 DENDRONI E DENDRIMERI: ANALISI DEI DATI SPERIMENTALI

Come già introdotto nel capitolo precedente, i dendrimeri di varia generazione funzionalizzati con triazaciclononano si sono rivelati dei buoni catalizzatori per l'idrolisi dell'HPNPP; essi hanno mostrato la capacità di effettuare turnover catalitici, e di possedere un profilo di saturazione rispetto al substrato simile a quello degli enzimi. Per questo sui grafici di V_{in} vs. concentrazione di HPNPP è stato possibile effettuare un'analisi di Michaelis-Menten, ricavando i parametri catalitici relativi a ciascun dendrone e dendrimero (tabella 4.1).

Tabella 4.1 Parametri di Michaelis-Menten per i dendroni d_2 - d_{16} e per i dendrimeri D_4 - D_{32}

	n° Tacn	$k_{cat,den}$ ($\times 10^3 s^{-1}$)	$k_{cat,unit}$ ($\times 10^4 s^{-1}$)	K_M ($\times 10^3 M$)	$k_{cat,den}/K_M$ ($l.mol^{-1}.s^{-1}$)	$k_{cat,den}/k_{uncat}^a$
d_2	2	0.6	3.2	2.8	0.2	3190
D_4	4	1.3	3.4	4.0	0.3	6710
d_4	4	1.6	4.1	1.0	1.6	8120
D_8	8	4.8	6.0	1.9	2.5	24000
d_8	8	3.3	4.1	0.9	3.8	16600
D_{16}	16	9.6	6.0	1.2	8.4	48000
d_{16}	16	6.7	4.2	0.7	9.5	33400
D_{32}	32	15.6	4.9	0.8	19.0	78200

a: $k_{uncat} = 2 \cdot 10^{-7} s^{-1}$ [43].

Di questi parametri, la k_{cat} può essere ricavata in due modi diversi, a seconda della specie considerata come catalizzatore: se il dendrimero nel suo complesso ($k_{cat,den}$) o il singolo gruppo funzionale ($k_{cat,unit}$). Le due costanti sono ovviamente legate tra loro dalla formula $k_{cat,den} = k_{cat,unit} \cdot n^{\circ}unità$, dove k_{cat} rappresenta la costante catalitica del primo ordine, ossia la costante di velocità in condizioni di saturazione. K_M invece quantifica l'affinità per il substrato, da parte del catalizzatore, essa infatti è una costante di dissociazione e quindi è tanto più bassa maggiore è il binding del substrato.

I due parametri possono essere ambedue considerati per determinare l'efficacia catalitica del sistema, k_{cat}/K_M , che rappresenta, dal punto di vista formale, costante catalitica del secondo ordine e permette di confrontare il catalizzatore con altri che operano con meccanismo bimolecolare senza precomplessazione.

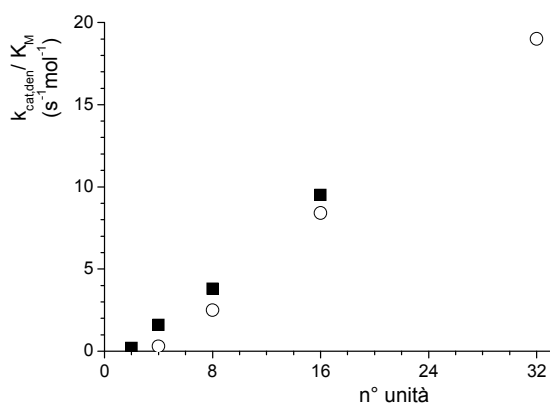


Figura 4.1 Grafico dell'efficacia catalitica (k_{cat} / K_M) in funzione della valenza del catalizzatore per ■ dendroni, ○ dendrimeri.

L'andamento dell'efficacia catalitica in funzione della valenza (figura 4.1) presenta un aumento di tipo esponenziale, indicando la presenza di un effetto dendrimerico positivo. Per comprendere però la vera origine di questi risultati è necessario andare ad analizzare singolarmente i parametri.

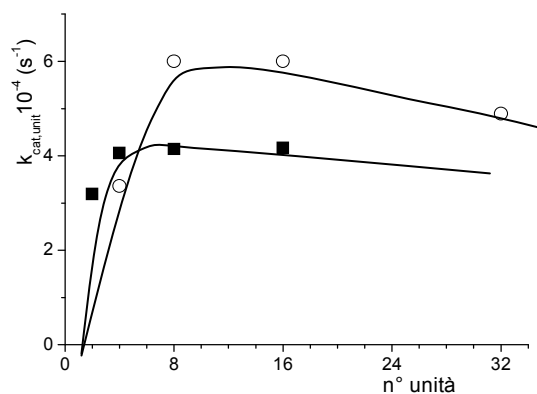


Figura 4.2 Grafico di $k_{cat,unit}$ in funzione della valenza del catalizzatore per ■ dendroni, ○ dendrimeri.

Prendendo in considerazione la $k_{cat,unit}$ (figura 4.2), si vede come, dopo un aumento iniziale (da d2 a d4 per i dendroni, da D4 a D8 per i dendrimeri), essa rimane costante, e anzi diminuisce per D32. A parità di valenza essa appare inoltre maggiore per i dendrimeri rispetto ai dendroni. Da un certo punto quindi l'attività catalitica intrinseca del singolo sito rimane uguale. L'aumento della $k_{cat,den}$ complessiva è dovuto solo ad un effetto numerico per l'aumento della valenza, mentre la capacità di creare nuovi siti catalitici raggiunge presto il valore massimo per il sistema.

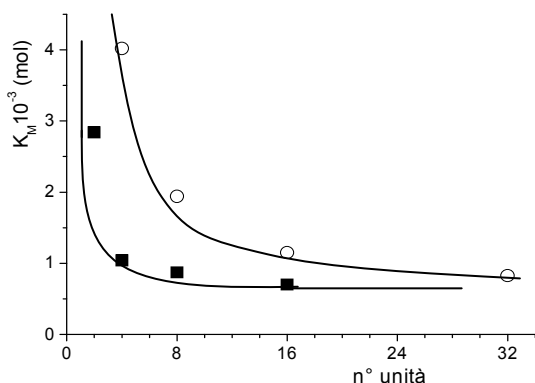


Figura 4.3 Grafico K_M in funzione della valenza del catalizzatore per ■ dendroni, ○ dendrimeri.

Per quanto riguarda la K_M essa invece diminuisce in modo continuo e asintotico (figura 4.3), in modo maggiore per i dendroni rispetto ai dendrimeri. Apparentemente, l'aumento della valenza provoca un binding più forte con il substrato. Questo fatto può essere spiegato con l'aumento del numero di possibili siti di legame bimetallici che si vengono a creare aumentando la valenza, il che in pratica aumenta la concentrazione apparente di siti catalitici. Proprio questa diminuzione della K_M risulta essere il fattore che porta ad avere un effetto dendrimerico positivo.

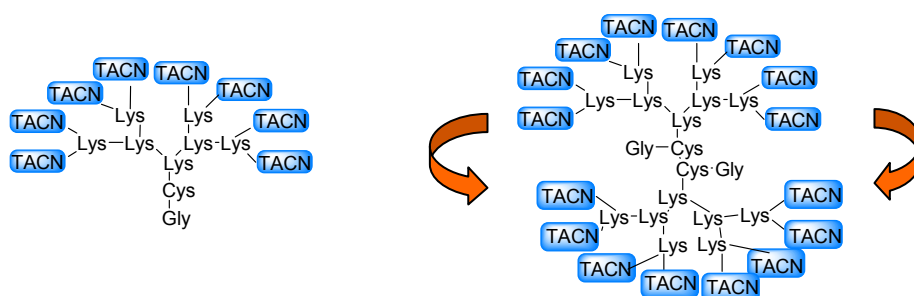
Andando a confrontare tra loro le due serie di dendroni e dendrimeri, si osserva che se nel complesso i loro andamenti sono simili, questi ultimi possiedono una k_{cat} più elevata, ma un minore binding per il substrato (maggiore K_M). Dal momento che la struttura dei composti è la stessa, le differenze non sembrano risiedere nei singoli siti catalitici, ma nella differente capacità di formare i siti da parte del catalizzatore multivalente.

Utili per analizzare queste differenze sono gli esperimenti di Michaelis-Menten "inversi", in cui fissata la concentrazione di substrato viene variata quella di catalizzatore (tabella 4.2).

Tabella 4.2 Parametri di Michaelis-Menten “inversa” per i dendroni d₂-d₁₆ e per i dendrimeri D₄-D₃₂

	n° Tacn	$k_{cat,site}$ ($\times 10^4 s^{-1}$)	$K_{M,site}$ ($\times 10^4 M$)	$k_{cat,site}/K_{M,site}$ ($l.mol^{-1}.s^{-1}$)	$k_{cat,den}/k_{cat,site}$
d ₂	2	1.34	10.2	0.13	2.4
D ₄	4	1.06	9.46	0.11	3.2
d ₄	4	0.82	2.80	0.29	5.0
D ₈	8	1.32	3.74	0.35	4.6
d ₈	8	1.18	2.21	0.53	3.5
D ₁₆	16	0.84	1.38	0.60	7.1
d ₁₆	16	0.86	1.28	0.72	4.9
D ₃₂	32	0.77	1.05	0.73	6.4

Confrontando i valori ottenuti tra dendroni e dendrimeri si vede come essi risultino simili (es. per d₁₆ $k_{cat} = 8.6 \cdot 10^{-5}$, per D₁₆ $k_{cat} = 8.4 \cdot 10^{-5}$), il che indica che l'attività dei siti catalitici è uguale. Quello che cambia è il numero di siti che si possono venire a creare: questo numero può essere stimato dividendo i valori di $k_{cat,unit}$ ottenuti in eccesso di substrato per quelli ottenuti in eccesso di catalizzatore [57, 61]: $n^{\circ} siti = k_{cat,unit} / k_{cat,site}$. Questo valore rappresenta infatti il numero di molecole di substrato legate in condizione di saturazione (in eccesso di substrato). Si vede ad esempio che per d₁₆ vi sono 5 siti, mentre per D₁₆ questi sono 7 (di fronte ad un massimo di 8 siti bimetallici possibili). La dimerizzazione permette quindi la formazione di interazioni tra unità che portano alla formazione di nuovi siti catalitici, nella zona di contatto tra le due metà (figura 4.4).

**Figura 4.4** Creazione di nuove interazioni e quindi di nuovi siti catalitici in seguito alla dimerizzazione.

L'entità di questo effetto dipende tuttavia dalla generazione del dendrone. Il passaggio da d₂ a D₄ ha, ad esempio, solo un piccolo effetto su $k_{cat,unit}$, probabilmente perché la parte ramificata è ancora piccola rispetto al linker Gly-Cys, per cui le due metà non riescono a venire bene in contatto. Anche per i dendrimeri di maggiore dimensione, come D₃₂, questo effetto non si presenta. In questo caso il motivo sembra risiedere in un impedimento sterico che fa sì che molti siti catalitici siano nascosti

4 - ANALISI DATI E MODELLI TEORICI

e inaccessibili al substrato, per questo la $k_{\text{cat,unit}}$ di D32 è più bassa di quella di D8 e di D16, in cui i siti sono meglio esposti al substrato.

Proseguendo nel ragionamento seguito finora ci si potrebbe attendere che, aumentando il numero di siti attivi, anche il binding aumenti passando dai dendroni ai dendrimeri. In realtà i dati sperimentali indicano che invece la K_M cresce. Questo ha origine da un diverso livello di saturazione delle due serie, e una spiegazione del fenomeno sarà fatta con un'analisi più approfondita di questo tipo di sistemi. Infatti, il modello di Michaelis-Menten, relativo a catalizzatori con un solo sito attivo, nel momento in cui viene applicato a sistemi multivalenti presenta dei limiti, in quanto i valori che fornisce sono dei parametri "complessivi" del sistema. Per una migliore comprensione dei catalizzatori multivalenti è stato utile sviluppare dei nuovi modelli che tenessero conto della presenza di più possibili siti catalitici nello stesso catalizzatore. Lo studio di questi modelli teorici sarà quindi trattato nel paragrafo successivo.

4.2 MODELLI SIMULATI DI CATALIZZATORI MULTIVALENTI

4.2.1 MODELLI E SIMULAZIONI

I dendrimeri da noi sintetizzati e studiati presentano un certo numero di siti attivi per la catalisi sulla stessa molecola, il loro meccanismo d'azione prevede quindi più eventi di binding e di conversione nel prodotto. L'applicazione a sistemi di questo tipo del modello di Michaelis-Menten non è del tutto corretta. Questo modello è basato, infatti, su un meccanismo a singolo sito attivo. I parametri k_{cat} e K_M ottenuti per dendroni e dendrimeri (e per qualsiasi specie multivalente in generale) sono valori "complessivi" che tengono conto di tutti i processi di trasformazione catalitica e di complessazione che avvengono per ciascun catalizzatore. E' stato quindi sviluppato un modello teorico per un catalizzatore multivalente in cui si tiene conto dei singoli eventi di catalisi e di binding in modo distinto. Lo scopo dello studio è stato quello di avere una migliore comprensione di sistemi di questo tipo, che permettesse di descrivere e spiegare l'influenza della valenza sulla catalisi e quindi di poter capire l'origine dell'effetto dendrimerico [54].

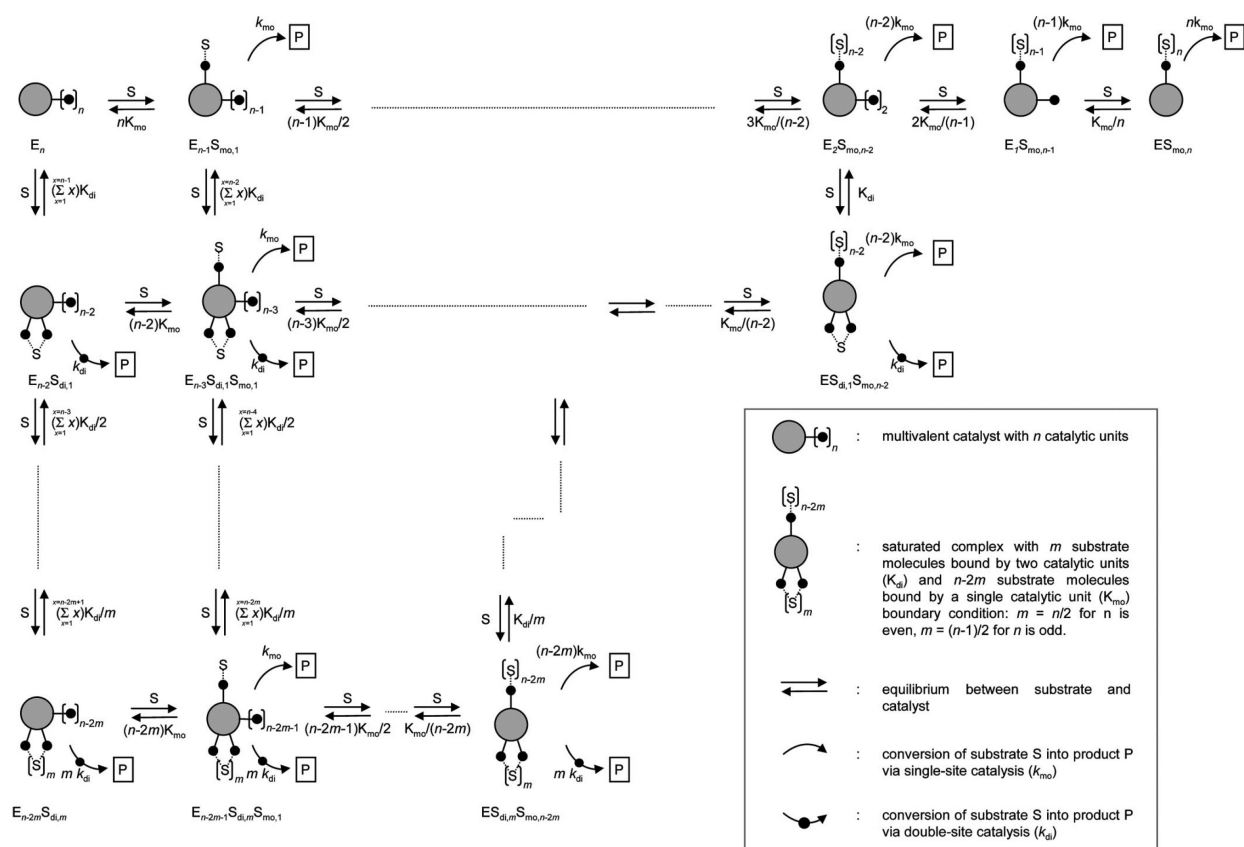
Nel modello (schema 4.1) è stato preso in considerazione un catalizzatore E_n , dove n è il numero di unità catalitiche presenti. I possibili meccanismi di catalisi presi in considerazione sono stati due: uno di una singola unità catalitica (catalisi a singolo sito), e uno dovuto all'azione simultanea di due

unità (catalisi cooperativa). Ognuno di questi due meccanismi presenta dei propri parametri catalitici (k_{mo} e K_{mo} , k_{di} e K_{di}), che sono rispettivamente la costante catalitica e la costante di associazione con il substrato. Le equazioni relative al meccanismo complessivo sono state ottenute applicando alcune assunzioni.

- Il massimo numero di molecole di substrato che si possono legare è pari a n , nel caso di catalisi a singolo sito, o ad $n/2$ nel caso di catalisi cooperativa.

- I singoli eventi catalitici sono indipendenti e non sono influenzati dal binding di altre molecole di substrato. Come conseguenza i parametri k_{mo} , K_{mo} , k_{di} e K_{di} sono costanti e non variano al variare della valenza o del grado di saturazione del substrato.

- Le costanti sono state moltiplicate per dei parametri statistici, per tenere conto dei molteplici modi di binding possibili, e del numero di possibili siti catalitici che si possono formare per interazione tra le unità catalitiche. Tali coefficienti, ottenuti per mezzo del calcolo combinatorio, rappresentano una situazione ideale; nei sistemi reali il numero di interazioni possibili è minore in quanto le unità funzionali si possono trovare troppo distanti tra loro. Per tenere conto di questo saranno in seguito applicate delle correzioni al modello.



Schema 4.1 Schema del modello teorico di un catalizzatore multivalente da [54].

4 - ANALISI DATI E MODELLI TEORICI

Questo modello è stato utilizzato per simulare sistemi multivalenti a diverso numero di unità catalitiche ($n = 2-8$). Per ciascuno di essi sono state scritte le equazioni che descrivono la catalisi. In tal modo, una volta fissati i valori dei parametri k_{mo} , K_{mo} , k_{di} e K_{di} , si può calcolare la velocità di reazione a partire dalle concentrazioni di catalizzatore e substrato. Analogamente a quanto fatto negli esperimenti reali, tenendo costante la concentrazione dell'unità catalitica è stata variata la concentrazione del substrato, in modo da ottenere i grafici di saturazione per ciascun diverso catalizzatore.

Le simulazioni sono state effettuate per tre diverse situazioni.

1) Solo catalisi a singolo sito

$$(K_{mo} = 500 \text{ M}^{-1}, k_{mo} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1})$$

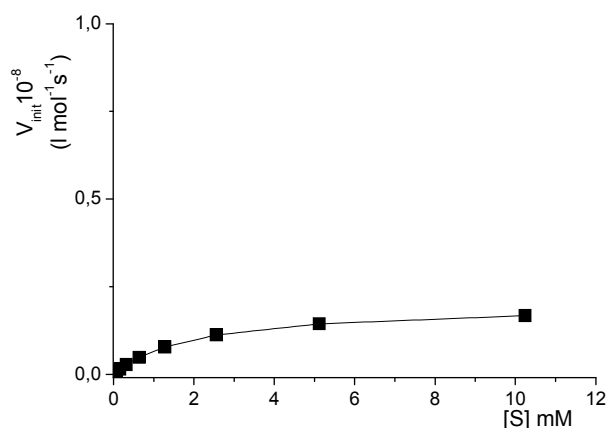


Figura 4.5 Curve di saturazione calcolate per catalizzatori multivalenti E_2-E_8 con solo catalisi da sito singolo.

In questo caso non si ha catalisi da sito doppio, e le curve di saturazione ottenute per i vari catalizzatori sono uguali tra loro e indipendenti dalla valenza (figura 4.5). Infatti la curva è uguale a quella dell'unità monomerică, e mancando la cooperatività tra i gruppi funzionali non si ha nessun effetto nell'unire le unità in una struttura multivalente.

2) Catalisi a sito singolo e cooperativa

$$(K_{mo} = 500 \text{ M}^{-1}, k_{mo} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}, K_{di} = 750 \text{ M}^{-1}, k_{mo} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1})$$

I parametri sono stati fissati in modo che la catalisi di tipo cooperativo avesse un binding e una costante catalitica maggiore.

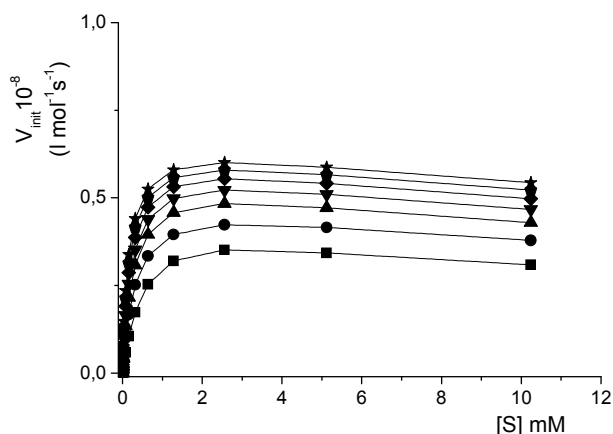


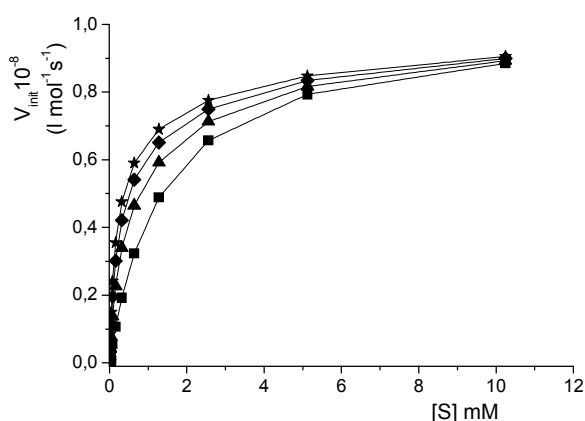
Figura 4.6 Curve di saturazione calcolate per catalizzatori multivalenti E_2 (■), E_3 (●), E_4 (▲), E_5 (▼), E_6 (◆), E_7 (◆), E_8 (★), con catalisi da sito singolo e doppio.

In questo caso si ha invece un'attività catalitica diversa al variare della valenza: la velocità aumenta al crescere del numero di unità catalitiche presenti (figura 4.6). Si nota che per concentrazioni alte di substrato si ha un calo dell'attività, in quanto la catalisi passa da prevalentemente a sito doppio, ad un meccanismo a singolo sito che è meno efficace.

3) Catalisi cooperativa

$$(K_{di} = 750 \text{ M}^{-1}, k_{mo} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1})$$

a



b

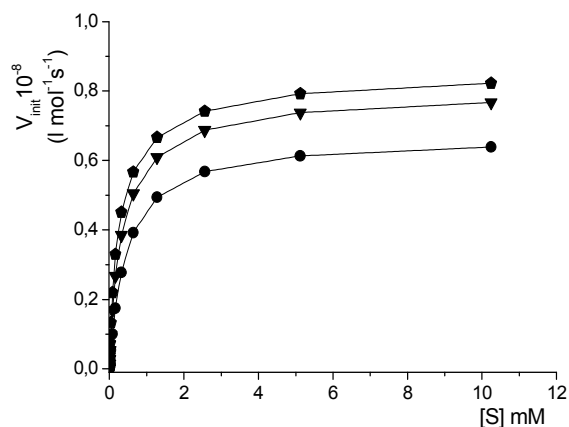


Figura 4.7 Curve di saturazione calcolate per catalizzatori multivalenti a) pari E_2 (■), E_4 (▲), E_6 (◆), E_8 (★), b) dispari E_3 (●), E_5 (▼), E_7 (◆) con catalisi solo da sito doppio.

In questa situazione si è considerato trascurabile l'apporto della catalisi mononucleare.

I sistemi a valenza pari hanno in saturazione la medesima attività catalitica massima, quello che varia è che maggiore è la valenza, prima questo livello viene raggiunto (figura 4.7a).

Per i sistemi a valenza dispari è necessaria un'analisi a parte (figura 4.7b), in quanto essi in saturazione si trovano a possedere un'unità catalitica spaiata. Per questo il loro livello di saturazione è inferiore a quello ottenuto dai sistemi pari e dipende dalla valenza. Tuttavia, all'aumentare della dimensione questa differenza diventa via via minore.

4.2.2 PARAMETRI DI MICHAELIS-MENTEN

I grafici di saturazione ricavati dalle simulazioni sono stati quindi analizzati in modo analogo a quanto fatto con i dati sperimentali. I punti ottenuti dal modello matematico sono stati interpolati utilizzando l'equazione di Michaelis-Menten classica (figura 4.8), ricavando, per ogni catalizzatore multivalente modello, i parametri catalitici "complessivi". Delle tre situazioni l'analisi è stata effettuata sull'ultima, in cui è presente solo catalisi cooperativa. Questa è infatti quella che rispecchia meglio il sistema reale, in cui il sito bimetallico risulta avere una k_{cat} e un binding molto maggiore rispetto al sito monometallico, per cui il contributo di quest'ultimo è solitamente trascurabile. In questo modo è stato possibile valutare come i parametri catalitici "complessivi" varino al variare della valenza.

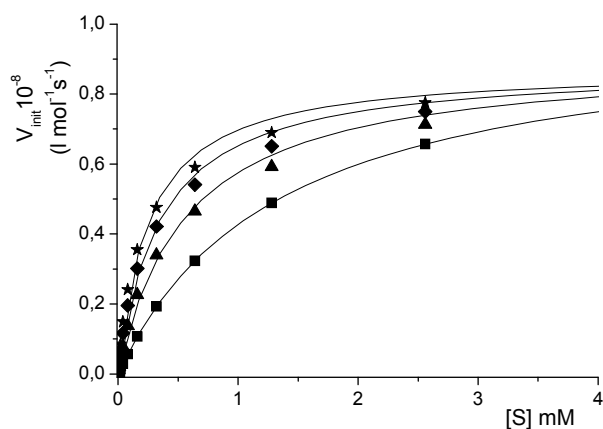


Figura 4.8 Fitting mediante equazione di Michaelis-Menten dei grafici di saturazione calcolati per catalizzatori multivalenti pari E₂ (■), E₄ (▲), E₆ (◆), E₈ (★).

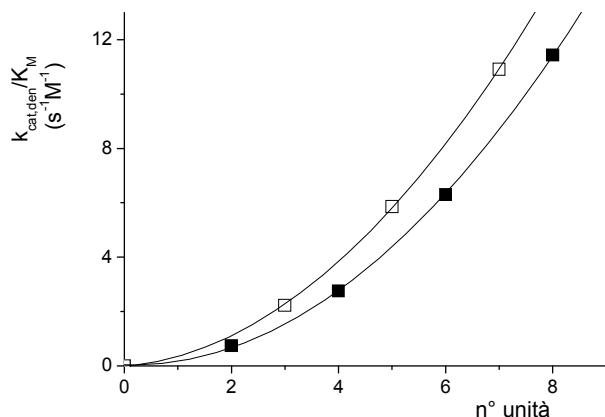
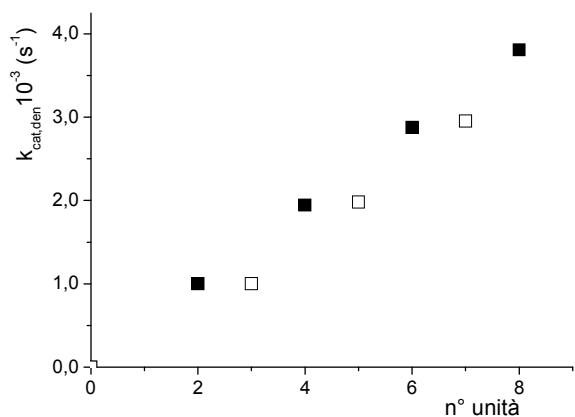


Figura 4.9 $k_{cat,den}/K_M$ per i catalizzatori modello a valenza pari (■) e dispari (□).

Il primo risultato che appare evidente è che l'efficacia catalitica $k_{cat,den}/K_M$ aumenta in modo esponenziale con la valenza, evidenziando quindi un "effetto dendrimerico positivo" [62, 63, 35] (figura 4.9). È importante puntualizzare che questo effetto si riferisce ai parametri "complessivi" del catalizzatore, e non ai parametri k_{di} e K_{di} del singolo sito attivo, che sono stati mantenuti costanti. L'effetto dendrimerico è quindi una caratteristica intrinseca della multivalenza, nel caso in cui il meccanismo preveda l'interazione cooperativa tra più unità funzionali. L'aumento dell'attività catalitica si deve ad una migliore capacità di formare siti attivi, più che ad una diversa attività del sito attivo stesso.

a)



b)

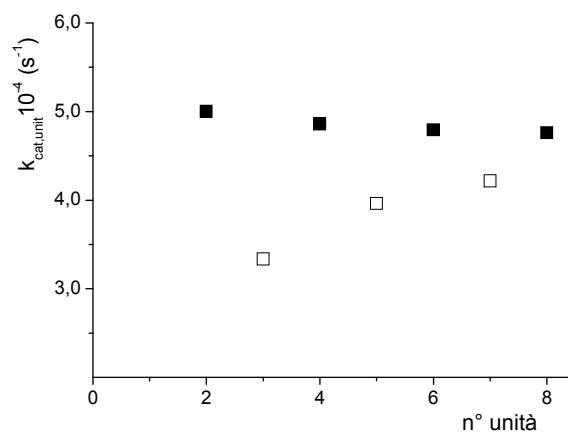


Figura 4.10 a) $k_{cat,den}$ e b) $k_{cat,unit}$ per i catalizzatori modello a valenza pari (■) e dispari (□).

La costante catalitica $k_{cat,den}$ aumenta in maniera lineare (figura 4.10a): se si divide per il numero di unità catalitiche per ottenere $k_{cat,unit}$, si ha che tale parametro è costante (almeno per i casi pari, i

4 - ANALISI DATI E MODELLI TEORICI

dispari saranno trattati in seguito) (figura 4.10b). Questo risultato è la diretta conseguenza del fatto che la costante catalitica k_{di} nel modello era stata posta come costante.

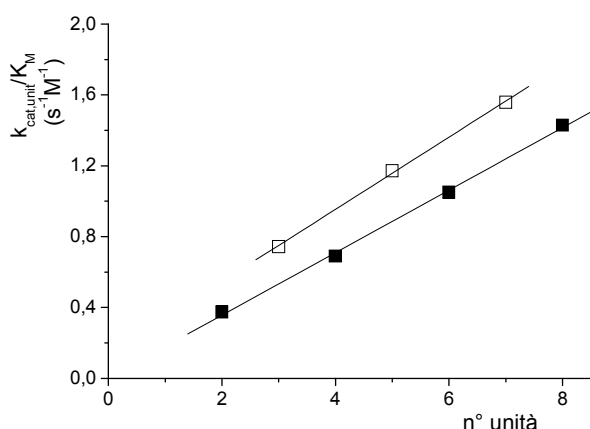


Figura 4.11 $k_{cat,unit}/K_M$ per i catalizzatori modello a valenza pari (■) e dispari (□).

Se i valori dell'efficacia catalitica vengono corretti per la valenza, ponendo quindi in grafico $k_{cat,unit}/K_M$, si vede che l'aumento da esponenziale diventa lineare (figura 4.11). Questo aumento è da imputarsi alla K_M e quindi ad un effetto del binding del substrato.

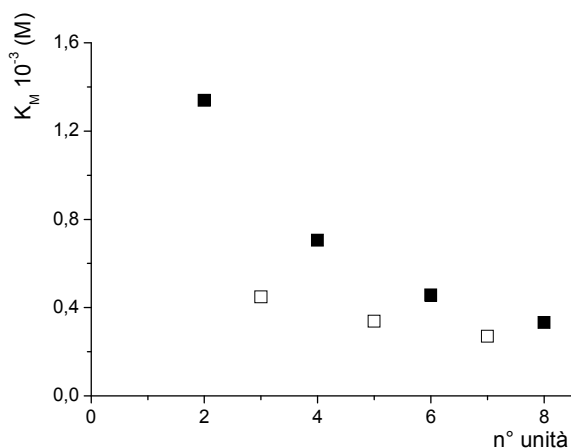


Figura 4.12 K_M per i catalizzatori modello a valenza pari (■) e dispari (□).

La K_M per i catalizzatori pari cala in maniera asintotica all'aumentare della valenza, questo nonostante la costante di binding del singolo sito sia stata imposta costante (figura 4.12). L'origine dell'effetto sta nel clustering delle unità funzionali, che aumenta il numero di possibili siti attivi che si possono creare, per interazione tra le singole unità. Questo aumenta la concentrazione "apparente" dei siti attivi, e quindi si ha una costante di binding "apparente" più alta. Questo effetto risulta quindi essere la causa principale dell'effetto dendrimerico.

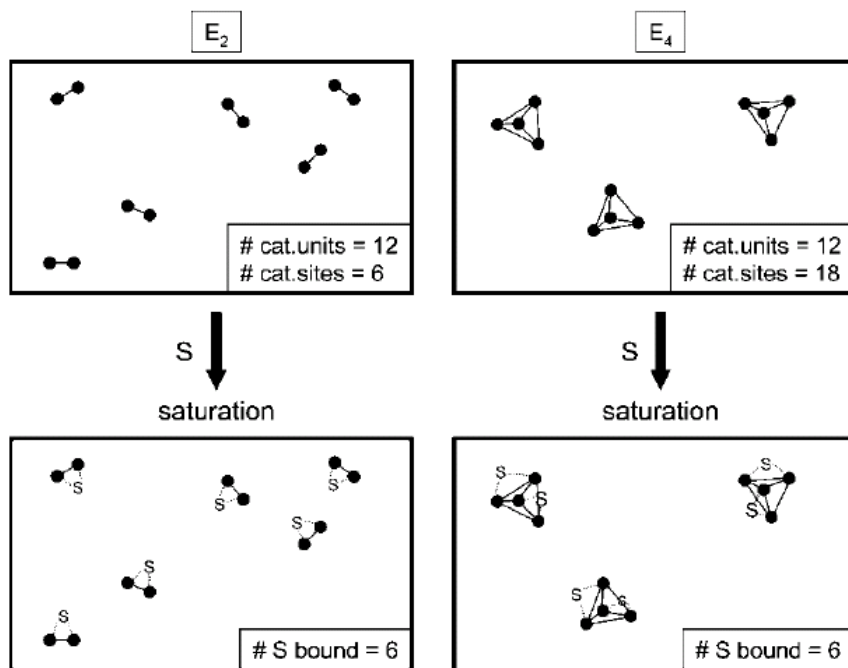


Figura 4.13 Effetto del clustering nella creazione di siti catalitici.

Il ragionamento può essere spiegato dallo schema in figura 4.13. Un uguale numero di unità catalitiche (12) viene unito in un caso a coppie, in un altro a gruppi di 4. Il numero di possibili siti catalitici composti da due unità nel primo caso è di 6, nel secondo è di 18, in quanto le combinazioni possibili sono più numerose; la concentrazione apparente di siti sarà quindi maggiore per il cluster a valenza maggiore. Tuttavia in condizioni di saturazione i due sistemi potranno legare lo stesso numero di molecole di substrato (6), per cui la loro attività catalitica sarà identica (portando ad una k_{cat} uguale).

Nel nostro modello ideale il numero di possibili siti che si possono creare è il massimo possibile, fornito dal calcolo combinatorio, in cui ogni unità può interagire con tutte le altre. Nei sistemi reali però tale numero è minore, in quanto le unità, specie quando la valenza è elevata, sono spesso troppo lontane tra loro per formare un sito catalitico.

Per tenere conto di questo ai fattori statistici utilizzati nel modello è stato applicato un fattore correttivo: si è ipotizzato che, a partire da E_3 , ogni aumento di valenza portasse alla perdita del 10% del numero di potenziali siti, fino a giungere al dendrimero E_8 in cui il valore è il 50% di quello teorico (figura 4.14).

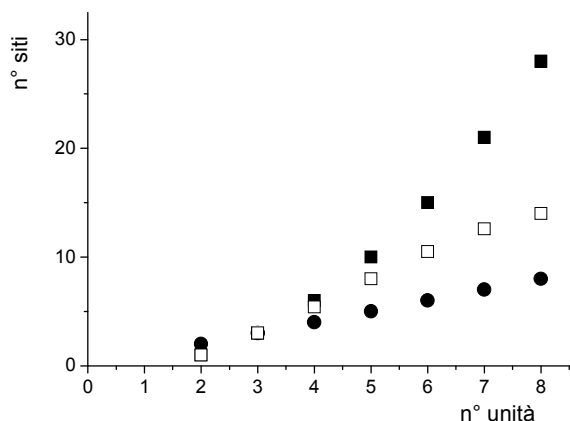


Figura 4.14 Numero di potenziali siti per i binding della prima molecola di substrato per binding mononucleare (●), binding dinucleare (■) e dinucleare corretto (□).

La simulazione è stata ripetuta e i valori dei parametri complessivi sono stati ricalcolati. Le k_{cat} non presentano variazioni, in quanto in saturazione non vi sono differenze rispetto a prima. Per K_M si hanno invece, come atteso, dei valori più alti, che si rispecchiano in una minore entità dell'aumento dell'efficacia catalitica (figura 4.15a). Tuttavia l'entità delle variazioni sull'effetto dendrimerico è molto piccola (figura 4.15b), anche di fronte ad una diminuzione di metà del numero di siti come nel caso di E_8 . Possiamo quindi affermare che il modello presenta una validità anche per sistemi reali che si comportano in modo meno ideale.

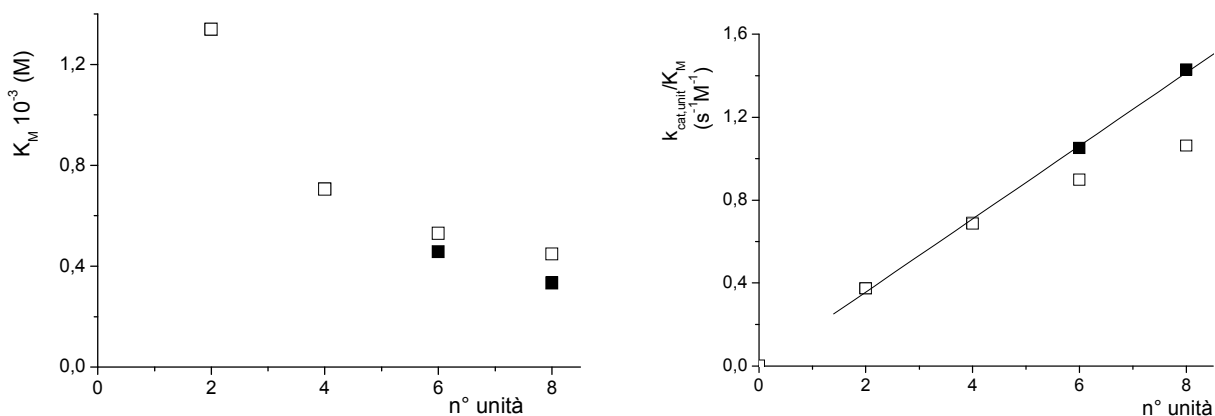


Figura 4.15 a) K_M e b) $k_{cat,unit}/K_M$ per modelli pari ideali (■) e corretti (□).

Dai grafici ottenuti si può osservare che i catalizzatori a valenza pari e quelli a valenza dispari appaiono come due serie distinte, con andamenti diversi. In particolare i sistemi dispari possiedono una $k_{\text{cat,unit}}$ inferiore e che non è costante (vedi figura 4.10b). Questo è dovuto al fatto che non possono raggiungere lo stesso livello di saturazione dei sistemi pari, in quanto si trovano con un'unità catalitica spaiata. L'effetto diviene comunque meno importante all'aumentare della valenza, per cui quelli di grandi dimensioni tendono ai valori dei corrispondenti sistemi pari. L'osservazione evidenzia comunque, in relazione ai catalizzatori reali, come il valore di $k_{\text{cat,unit}}$ dipenda dal grado di saturazione che il sistema può raggiungere, e non solo dall'efficienza del singolo sito catalitico.

Riguardo la K_M i valori sono inferiori per i sistemi dispari, che sembrano quindi avere un binding più forte per il substrato (vedi figura 4.11). La causa dell'effetto è di tipo combinatoriale-statistico: la presenza di unità spaiate fa sì che il legame del substrato con i sistemi dispari possa avvenire in un numero di modi maggiore.

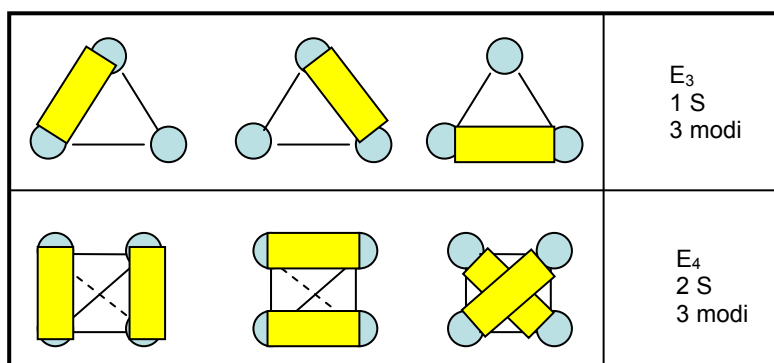


Figura 4.16 Diversi possibili isomeri per il complesso catalizzatore-substrato in saturazione.

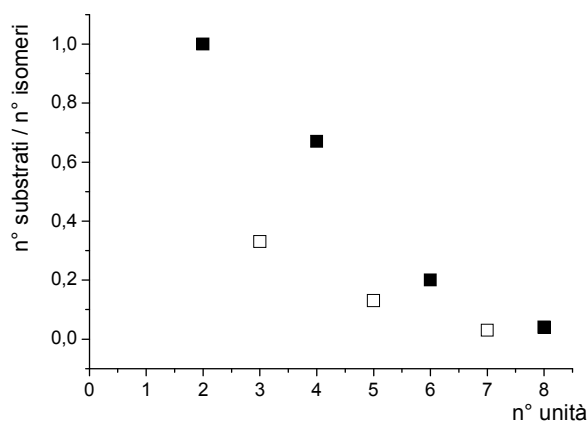


Figura 4.17 Rapporto tra il n° di molecole di substrato legate in saturazione e il numero di isomeri del complesso saturo.

4 - ANALISI DATI E MODELLI TEORICI

Ad esempio il sistema a 3 unità può legare solo un substrato, ma il legame può avvenire in tre modi diversi, il sistema a 4 unità invece ne può legare due, ma i modi possibili sono sempre tre (figura 4.16).

Se si pone in grafico il valore che si ottiene dividendo il numero di molecole di substrato legate al catalizzatore in condizioni di saturazione per il numero di isomeri possibili per il complesso saturo, si ottengono due serie il cui andamento rispecchia quello che si riscontra per la K_M (figura 4.17).

4.2.3 CONFRONTO CON I DATI SPERIMENTALI

Al termine di questa trattazione teorica, è interessante tornare ad analizzare i risultati sperimentali ottenuti per i dendrimeri e confrontarli a quelli ottenuti per i modelli.

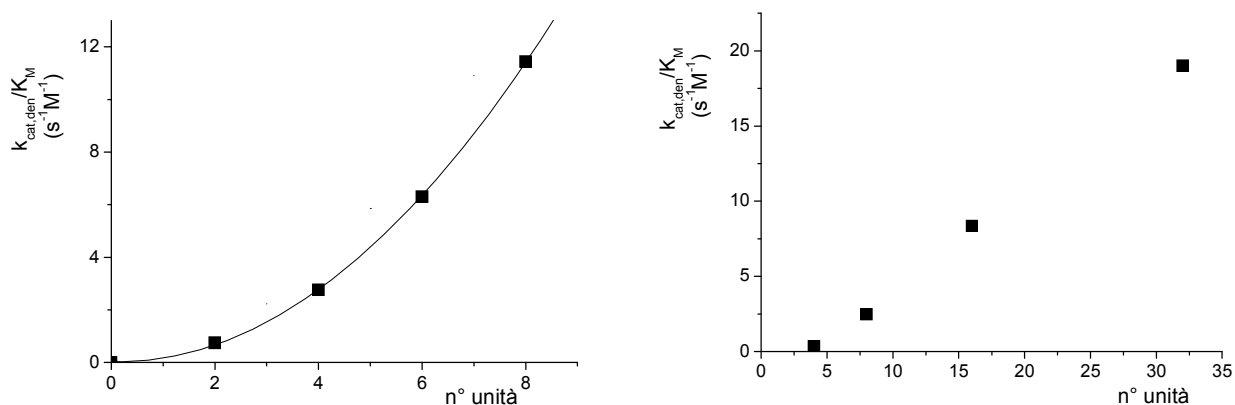


Figura 4.18 Confronto di $k_{cat,den}/K_M$ tra a) modelli e b) dati sperimentali.

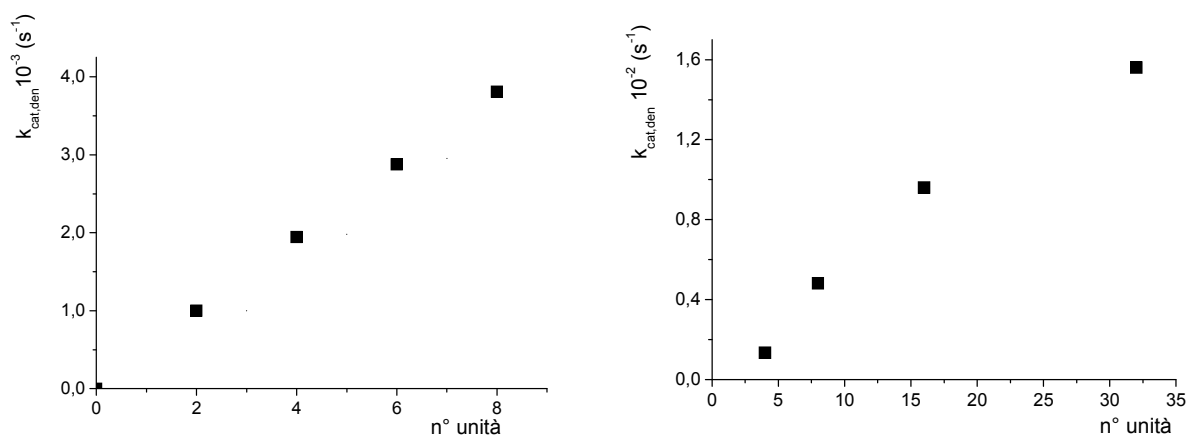


Figura 4.19 Confronto di $k_{cat,den}$ tra a) modelli e b) dati sperimentali.

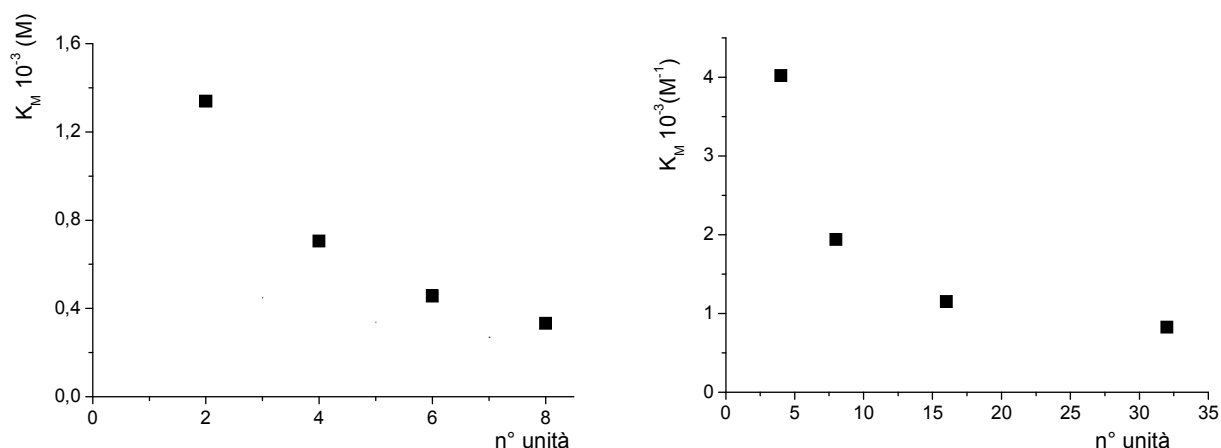


Figura 4.20 Confronto di K_M tra a) modelli e b) dati sperimentali.

Si vede dai grafici che gli andamenti dei parametri di Michaelis-Menten rispecchiano quelli previsti dal modello. La differenza risiede in una minore entità dell'aumento di efficacia catalitica al crescere della valenza, specie per i dendrimeri di maggiori dimensioni (figura 4.18). Questo è ben visibile dal grafico di $k_{\text{cat,unit}}/K_M$, che mostra come l'efficacia dei dendrimeri nel creare nuovi siti catalitici è limitata (figura 4.21).

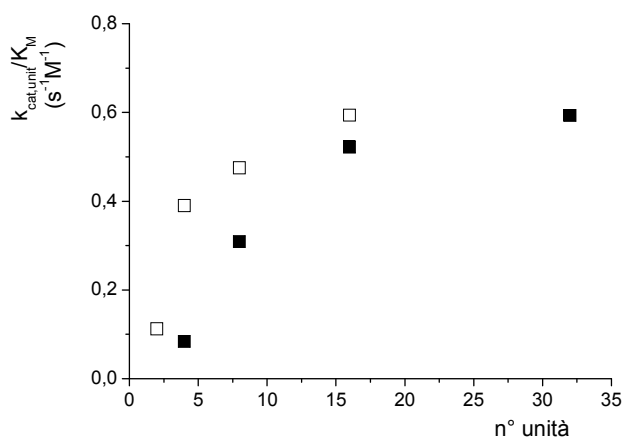


Figura 4.21 Grafico di $k_{\text{cat,unit}}/K_M$ sperimentali per i dendroni (□) e per i dendrimeri (■).

La causa sembra essere la struttura del dendrimero, che impedisce ai gruppi Tacn legati di interagire in maniera efficace tra loro, specie per le generazioni superiori dove il guadagno in termini di numero di siti attivi è molto poco. Probabilmente l'uso della lisina, in cui i due gruppi amminici sono disposti in modo asimmetrico e distanti tra loro, fa sì che la distribuzione dei gruppi funzionali nello spazio sia disomogenea e troppo dispersa.

Strutture più compatte potrebbero quindi dare guadagni catalitici maggiori. Un esempio è fornito dalla serie di dendrimeri studiata dal gruppo di Reymond [35], in cui si ha un marcato effetto

dendrimerico: in questo caso la struttura è più simmetrica e la densità di unità catalitiche è maggiore per la presenza di gruppi attivi anche all'interno dei dendrimeri.

I modelli teorici ci permettono anche di fornire un'interpretazione alla differenza che si riscontra tra le serie di dendroni e dendrimeri, in particolare in relazione al fatto che questi ultimi hanno una K_M superiore. L'andamento delle due serie è infatti simile a quello riscontrato per i catalizzatori pari e dispari. Come visto, i dendrimeri possiedono un livello di saturazione diverso da quello dei corrispondenti dendroni. La stechiometria del complesso catalizzatore-substrato in condizioni di saturazione è diversa nei due casi, per cui si hanno diversi valori dei parametri catalitici.

4.3 CONCLUSIONI

I dati sperimentali da noi ricavati, uniti ad una trattazione di tipo teorico, hanno permesso di elaborare un modello che fornisce una spiegazione all'origine dell'effetto dendrimerico.

I risultati indicano che l'origine dell'aumento di efficienza catalitica non risiede in un aumento della k_{cat} del singolo sito, quanto in una diminuzione di K_M . Questo aumento di binding apparente è una conseguenza del clustering delle unità, l'effetto dendrimerico risulta quindi una caratteristica intrinseca di un sistema multivalente, qualora il meccanismo catalitico preveda l'interazione cooperativa tra due o più unità. Altri effetti come variazione di pH, cambi conformazionali o formazione di intorni idrofobici possono avere un loro ruolo, ma non sono necessari per spiegare l'effetto dendrimerico.

Dall'analisi si può ricavare che l'efficacia di un catalizzatore multivalente dipende da due fattori principali:

- la capacità di creare siti catalitici composti da due o più unità
(in funzione dell'efficienza dei contributi catalitici di ordine superiore per il processo considerato)
- il grado di saturazione che può essere raggiunto, ossia il numero di unità che agiscono effettivamente in condizioni di saturazione.

Per ottimizzare le proprietà catalitiche è quindi importante che la struttura favorisca queste proprietà.

4.4 PARTE SPERIMENTALE

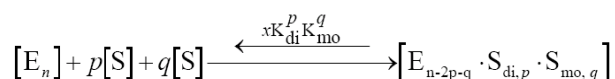
Per una trattazione più approfondita si consiglia al lettore interessato le supporting informations dell'articolo: Zaupa, G.; Scrimin, P.; Prins, L.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5699-5709.

Implementazione del modello

Il modello si basa su di un catalizzatore multivalente E_n , dove n è il numero di unità catalitiche ($2 < n < 8$), a cui si lega il substrato S . il sito catalitico può essere sia a singola unità (con costanti k_{mo} e K_{mo}) che cooperativo tra due unità (k_{di} e K_{di}).

Le simulazioni sono state effettuate mediante il software Micromath Scientist per Windows, versione 2.01.

In figura 4.x il modello è descritto usando una complessazione sequenziale delle molecole di substrato, per l'implementazione si è preferito descrivere la concentrazione di ogni complesso separatamente come un equilibrio con i componenti liberi E_n e S .



Dove p è il numero di molecole di substrato legate a due unità catalitiche, ($0 \leq p \leq m$, con $m = n/2$ nel caso n sia pari, $m = (n-1)/2$ nel caso n sia dispari), q è il numero di molecole di substrato legate ad una singola unità ($0 \leq q \leq n$), con la condizione generale $2p + q \leq n$.

Tutti i fattori statistici per la formazione di uno specifico complesso $E_{n-2p-q}S_{di,p}S_{mo,q}$ sono riuniti in un singolo fattore.

La notazione generale ESD_pM_q indica che p molecole di substrato sono legate a due unità catalitiche e q molecole a singole unità.

In seguito sono riportati a titolo di esempio i programmi per E_5 e E_6 , per la lista completa si rimanda al riferimento citato ad inizio paragrafo.

4 - ANALISI DATI E MODELLI TEORICI

// MicroMath Scientist Model File E5

IndVars: S0

DepVars: vinit, vinitm, vinitd, S, E, ESM1, ESM2, ESM3, ESM4, ESM5, ESD1, ESD1M1, ESD1M2, ESD1M3, ESD2, ESD2M1, STOT, ETOT

Params: E0, kcatm, Km, kcatd, Kd

ESM1=5*Km*E*S

ESM2=10*Km^2*E*S^2

ESM3=10*Km^3*E*S^3

ESM4=5*Km^4*E*S^4

ESM5=Km^5*E*S^5

ESD1=10*Kd*E*S

ESD1M1=30*Kd*Km*E*S^2

ESD1M2=30*Kd*Km^2*E*S^3

ESD1M3=10*Kd*Km^3*E*S^4

ESD2=15*Kd^2*E*S^2

ESD2M1=15*Kd^2*Km*E*S^3

S=S0-ESM1-2*ESM2-3*ESM3-4*ESM4-5*ESM5-ESD1-2*ESD1M1-3*ESD1M2-4*ESD1M3-2*ESD2-3*ESD2M1

E=E0-ESM1-ESM2-ESM3-ESM4-ESM5-ESD1-ESD1M1-ESD1M2-ESD1M3-ESD2-ESD2M1

vinitm=kcatm*(ESM1+2*ESM2+3*ESM3+4*ESM4+5*ESM5+ESD1M1+2*ESD1M2+3*ESD1M3+ESD2M1)

vinitd=kcatd*(ESD1+ESD1M1+ESD1M2+ESD1M3+2*ESD2+2*ESD2M1)

vinit=vinitm+vinitd

STOT=S+ESM1+2*ESM2+3*ESM3+4*ESM4+5*ESM5+ESD1+2*ESD1M1+3*ESD1M2+4*ESD1M3+2*ESD2+3*ESD2M1

ETOT=E+ESM1+ESM2+ESM3+ESM4+ESM5+ESD1+ESD1M1+ESD1M2+ESD1M3+ESD2+ESD2M1

//boundaries

0<E<E0

0<S<S0

0<ESM1<E0

0<ESM2<E0

0<ESM3<E0

0<ESM4<E0

0<ESM5<E0

0<ESD1<E0

0<ESD1M1<E0

0<ESD1M2<E0

0<ESD1M3<E0

0<ESD2<E0

0<ESD2M1<E0

// MicroMath Scientist Model File E6

IndVars: S0

DepVars: vinit, vinitm, vinitd, S, E, ESM1, ESM2, ESM3, ESM4, ESM5, ESM6, ESD1, ESD1M1, ESD1M2, ESD1M3, ESD1M4, ESD2, ESD2M1, ESD2M2, ESD3, STOT, ETOT

Params: E0, kcatm, Km, kcatd, Kd

ESM1=6*Km*E*S

ESM2=15*Km^2*E*S^2

ESM3=20*Km^3*E*S^3

ESM4=15*Km^4*E*S^4

ESM5=6*Km^5*E*S^5

ESM6=Km^6*E*S^6

ESD1=15*Kd*E*S

ESD1M1=60*Kd*Km*E*S^2

ESD1M2=90*Kd*Km^2*E*S^3

ESD1M3=60*Kd*Km^3*E*S^4

ESD1M4=15*Kd*Km^4*E*S^5

ESD2=45*Kd^2*E*S^2

ESD2M1=90*Kd^2*Km*E*S^3

ESD2M2=45*Kd^2*Km^2*E*S^4

ESD3=15*Kd^3*E*S^3

S=S0-ESM1-2*ESM2-3*ESM3-4*ESM4-5*ESM5-6*ESM6-ESD1-2*ESD1M1-3*ESD1M2-4*ESD1M3-5*ESD1M4-2*ESD2-3*ESD2M1-4*ESD2M2-3*ESD3

E=E0-ESM1-ESM2-ESM3-ESM4-ESM5-ESM6-ESD1-ESD1M1-ESD1M2-ESD1M3-ESD1M4-ESD2-ESD2M1-ESD2M2-ESD3

vinitm=kcatm*(ESM1+2*ESM2+3*ESM3+4*ESM4+5*ESM5+6*ESM6+ESD1+2*ESD1M1+3*ESD1M2+4*ESD1M3+5*ESD1M4+ESD2M1+2*ESD2M2)

vinitd=kcatd*(ESD1+ESD1M1+ESD1M2+ESD1M3+ESD1M4+2*ESD2+2*ESD2M1+2*ESD2M2+3*ESD3)

vinit=vinitm+vinitd

STOT=S+ESM1+2*ESM2+3*ESM3+4*ESM4+5*ESM5+6*ESM6+ESD1+2*ESD1M1+3*ESD1M2+4*ESD1M3+5*ESD1M4+2*ESD2+3*ESD2M1+4*ESD2M2+3*ESD3

ETOT=E+ESM1+ESM2+ESM3+ESM4+ESM5+ESM6+ESD1+ESD1M1+ESD1M2+ESD1M3+ESD1M4+ESD2+EESD2M1+ESD2M2+ESD3

//boundaries

0<E<E0

0<S<S0

0<ESM1<E0

0<ESM2<E0

0<ESM3<E0

0<ESM4<E0

0<ESM5<E0

0<ESM6<E0

0<ESD1<E0

0<ESD1M1<E0

0<ESD1M2<E0

0<ESD1M3<E0

0<ESD1M4<E0

0<ESD2<E0

0<ESD2M1<E0

0<ESD2M2<E0

0<ESD3<E0

5 DENDRIMERI ETEROFUNZIONALIZZATI

I dendrimeri catalitici da noi studiati nei capitoli precedenti, sono funzionalizzati con un numero variabile di unità formate dallo stesso gruppo funzionale (nel nostro caso il Tacn). Se però si analizza il meccanismo d'azione degli enzimi, si vede che nella maggior parte dei casi all'interno del sito attivo si ha l'azione cooperativa di diversi gruppi funzionali con caratteristiche chimiche diverse, che hanno ruoli differenti nel binding del substrato e nel catalizzare la reazione. Un esempio classico è quello della triade catalitica nell'idrolisi degli esteri Asp, Ser, His, che si rivela efficace anche in sistemi artificiali biomimetici [34]. Anche nel campo della catalisi organica, si sono rivelati molto efficaci catalizzatori in cui gruppi chimici diversi legati assieme agiscono di concerto nel meccanismo catalitico. Per la scoperta e lo sviluppo di questi catalizzatori si è rivelato spesso utile un approccio di tipo combinatoriale, un esempio è quello relativo al tripeptide Pro-Pro-Asp, attivo verso la condensazione aldolica enantioselettiva (figura 5.1) [64]. Il peptide è stato selezionato tra una libreria di 3375 membri e deve la sua efficacia alla presenza oltre alla prolina di un'ammina secondaria e di un gruppo carbossilico.

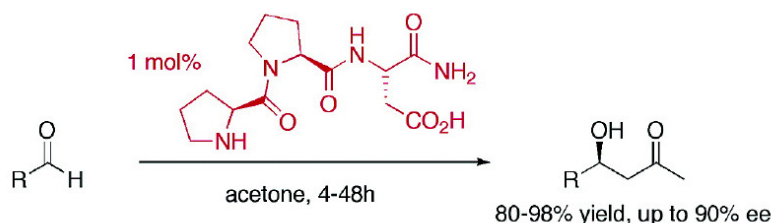


Figura 5.1 Condensazione aldolica enantioselettiva catalizzata da ProProAsp [64].

Anche nel nostro caso è stata quindi esplorata la possibilità di avere dei vantaggi al fine della catalisi nell'unire al complesso Tacn-Zn(II) un altro gruppo funzionale.

5.1 DENDRIMERI MISTI TACN – VARI AMMINOACIDI

5.1.1 SINTESI

Per valutare quali gruppi funzionali potessero avere un ruolo positivo nella catalisi dell'idrolisi di diesteri fosforici, è stata eseguito uno studio di tipo combinatoriale, sintetizzando una piccola libreria di dendrimeri di tipo poli-lisina, funzionalizzata con Tacn in combinazione con una serie di amminoacidi diversi. La scelta degli amminoacidi utilizzati è stata effettuata scegliendo gruppi funzionali che potessero aver un ruolo di ausilio allo ione metallico nel meccanismo di catalisi (figura 5.2). Oltre alla glicina sono stati utilizzati quindi l'arginina, l'omoarginina, la guaninifenilalanina e la citrullina che portano gruppi guanidinici o ureidici, che possono formare un'interazione con il gruppo fosfato, favorendo in tal modo il binding del substrato. Inoltre sono stati inseriti la serina, l'istidina e l'acido glutammico, che possono entrare in un meccanismo acido-base, e infine l'acido ammino ottanoico, che con la sua catena alchilica può aumentare l'idrofobicità dell'intorno chimico.

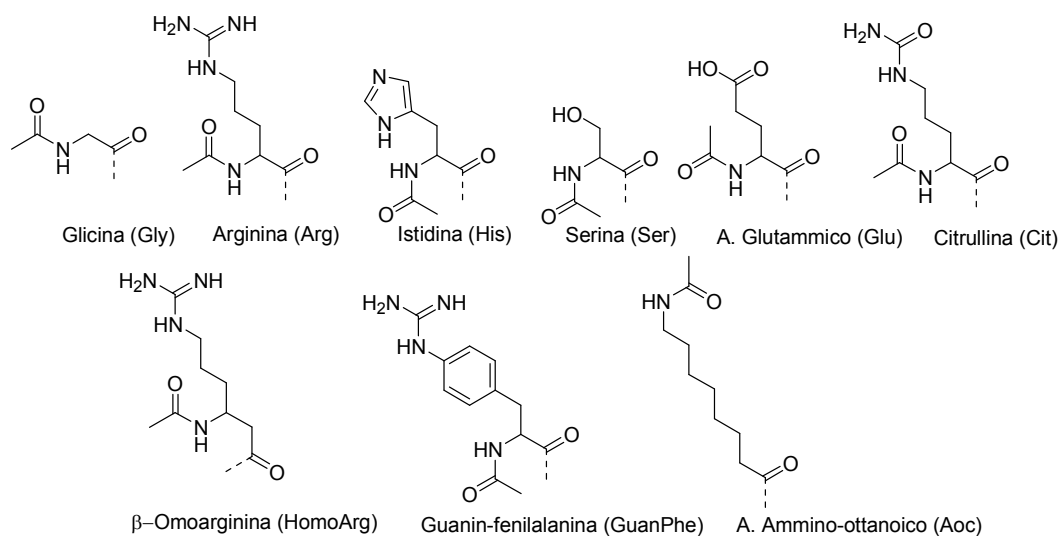
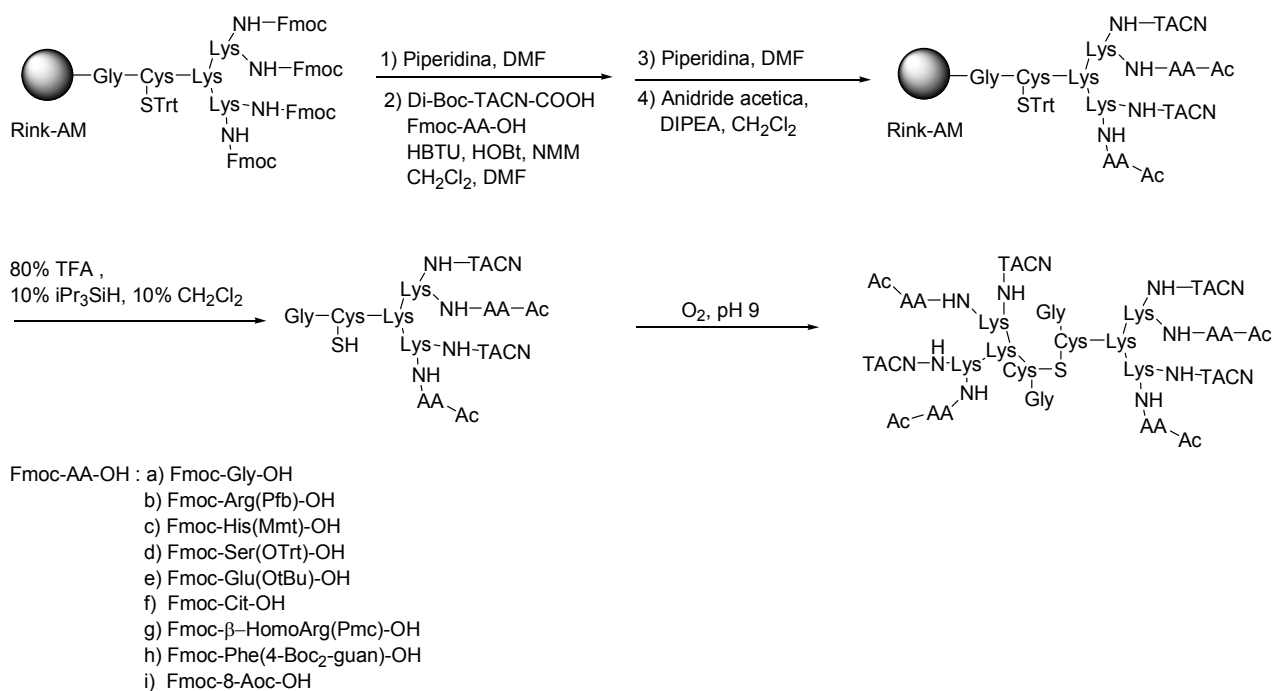


Figura 5.2 Amminoacidi utilizzati per la libreria in combinazione con Tacn

La sintesi è stata realizzata funzionalizzando un dendrone di valenza 4, utilizzando il peptide Gly-Cys(STrt)-Lys-(Lys)₂ legato alla resina Tentagel RAM, già sintetizzato come visto nel capitolo 3.1. I quattro gruppi amminici sono stati funzionalizzati eseguendo un coupling con una miscela 50:50 di (di-Boc)Tacn-CH₂COOH e ciascuno dei 9 amminoacidi, ottenendo in tal modo 9 diversi batch con diverse combinazioni di gruppi funzionali (schema 5.1). Gli amminoacidi utilizzati avevano i

5 - DENDRIMERI ETEROFUNZIONALIZZATI

gruppi in catena laterale derivatizzati con gruppi protettori acido labili, in modo da venire sbloccati al momento dello sblocco dalla resina.



Schema 5.1 Procedura di sintesi per dendrimeri eterofunzionali

Le ammine in α degli aminoacidi sono state quindi deprotette dal gruppo Fmoc con trattamento con piperidina, e quindi acetilate per reazione con anidride acetica. L'acetilazione ha lo scopo di evitare la presenza di ammine libere nel dendrimero finale, per non avere interferenze e complicazioni nella catalisi; inoltre evita la formazione di sottoprodotti in seguito allo sblocco acido, come visto nel capitolo 2.3. Il dendrone è stato quindi sbloccato mediante trattamento acido, e isolato. Con la stessa procedura vista per i dendrimeri con solo Tacn i dendroni sono stati analizzati e quindi è stata effettuata la dimerizzazione per ossidazione con aria in soluzione basica, ottenendo i rispettivi dendrimeri eterofunzionali.

Bisogna precisare che in questo caso il prodotto della reazione non è una singola specie, ma una miscela di diversi dendroni: dal coupling del dendrone d4 con la miscela di Tacn (T) e aminoacido (A) si possono ottenere infatti 5 diversi dendroni (TTTT, TTTA, TTAA, TAAA, AAAA), che a loro volta possono essere presenti sotto forma di diversi isomeri, in quanto i 4 gruppi amminici non sono uguali tra loro. In seguito alla dimerizzazione inoltre il numero di specie presenti aumenta in quanto ciascuna si può accoppiare con tutte le altre. I valori di attività catalitica che saranno ottenuti si riferiranno quindi non ad una singola specie, ma ad una media complessiva delle varie attività.

I dendroni sono anche stati analizzati mediante HPLC in seguito a derivatizzazione con un Dye maleimmidico (la diazo-difenilmaleimmide, come già fatto in precedenza), per molte combinazioni non si è riusciti a separare bene tra loro i diversi componenti della miscela. Anche se quindi non è stata fatta un'analisi quantitativa, si è appurato che la distribuzione dei prodotti è chiaramente simmetrica, il che indica che il coupling dei due diversi componenti è avvenuto in modo statistico e che non vi è stato un evidente deviazione a favore di uno dei due (figura 5.3).

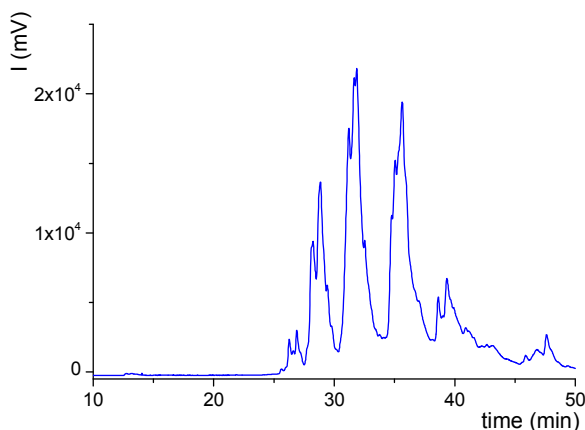


Figura 5.3 HPLC dendrone d4 funzionalizzato con Tacn/Glu.

Anche se quindi sono state introdotte delle approssimazioni, la procedura è stata messa a punto per uno screening rapido e flessibile, ma nello stesso tempo ragionevolmente attendibile, della libreria; nel caso si trovi una combinazione particolarmente attiva lo studio potrà essere focalizzato su di essa in modo più preciso e approfondito.

5.1.2 STUDI CINETICI

Lo screening della libreria di dendrimeri è stato eseguito mediante esperimenti analoghi a quelli svolti in precedenza con i dendrimeri funzionalizzate esclusivamente con Tacn (cap. 3.2), in primo luogo è stata quindi testata l'attività catalitica nei confronti dell'idrolisi dell'HPNPP. Per ogni dendrimero sono state quindi ottenute le curve di saturazione, mantenendo fissa la concentrazione di catalizzatore e variando quella dell'HPNPP, operando in condizione di eccesso di substrato. La concentrazione di dendrimero D8 utilizzata è stata di $2.5 \cdot 10^{-6}$ mol/l, quindi con una concentrazione totale di gruppi funzionali pari a $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l, sono quindi stati utilizzati $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l di Zn(II), pari ad un equivalente rispetto ai gruppi Tacn presenti.

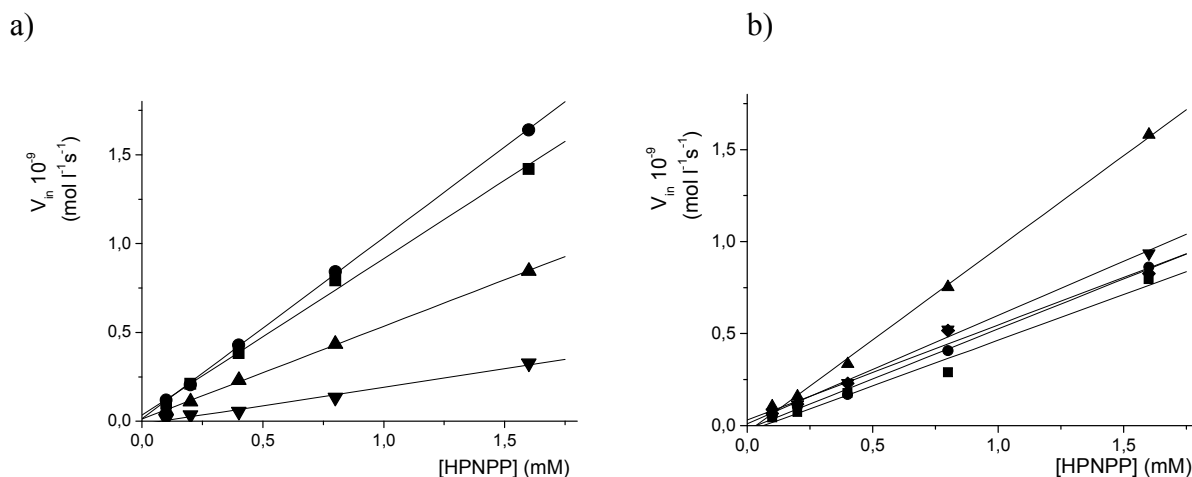


Figura 5.4 Velocità iniziali di idrolisi di HPNPP catalizzate da dendrimeri D8 misti Tacn e : a) Gly (■), Arg (●), His (▲), Ser (▼); b) Glu (■), Citr (●), Harg (▲), PheGuan (▼), Aoc (◆) in funzione di [HPNPP]. Condizioni: [D8]= $2.5 \cdot 10^{-6}$ M, $[Zn^{II}] = 1 \cdot 10^{-5}$ M, [HEPES]= $1 \cdot 10^{-2}$ M, pH = 7.5, T = 40°C, H₂O:CH₃CN=7:3.

Come si può vedere l'andamento dei grafici è rettilineo per tutti i composti (figura 5.4), l'assenza di una curvatura significativa impedisce il calcolo delle costanti k_{cat} e K_M , evidentemente il binding del catalizzatore con il substrato è troppo debole. Non potendo effettuare un confronto dei parametri di Michaelis-Menten, l'attività dei vari dendrimeri è stata valutata basandosi sulla velocità iniziale di idrolisi ad una data concentrazione di substrato. In pratica, dal momento che ci troviamo in regime del secondo ordine quella che abbiamo valutato è la differenza in k_{obs} , ossia in k_{cat}/K_M .

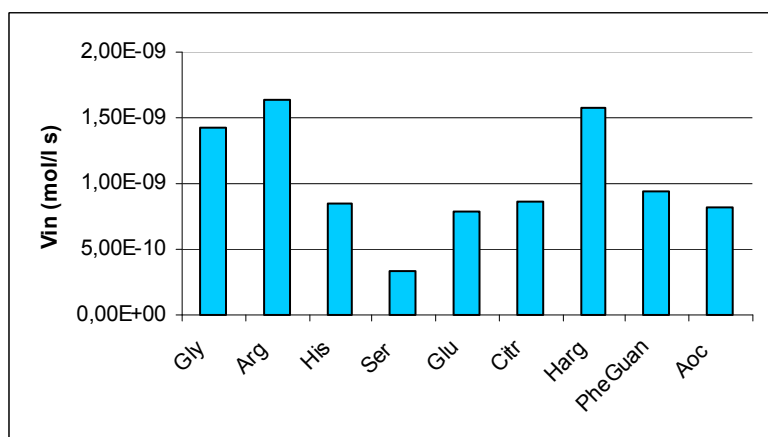


Figura 5.5 Screening della libreria [dendrimer] = 2.5 μ M, $[Zn^{II}] = 10 \mu$ M, [HPNPP] = 1.6 mM, pH = 7.5, [HEPES] = 25 mM, T = 40 °C.

Lo screening mostra come vi siano delle differenze ben visibili tra i diversi amminoacidi (figura 5.5), quelli che danno la maggiore reattività sono l'arginina e l'omoarginina, che portano un gruppo guanidinico, seguiti dalla glicina; la serina invece sembra inibire la catalisi, probabilmente perché complessa lo ione Zn(II) bloccandone l'attività catalitica. Comunque le velocità di reazione ottenute

sono piuttosto basse, e ben inferiori rispetto a quelle dei dendrimeri omofunzionali con Tacn. Questo è dovuto alla concentrazione di siti catalitici, che per questi dendrimeri è molto inferiore rispetto ai precedenti.

Lo screening catalitico è stato eseguito anche utilizzando come ione metallico il rame al posto dello zinco. Da studi precedenti si era visto che in genere la reattività dei complessi di rame è inferiore a quella dei corrispondenti complessi di zinco, l'interesse era quindi vedere se la presenza di qualche gruppo funzionale ausiliario potesse fornire qualche miglioramento alla catalisi.

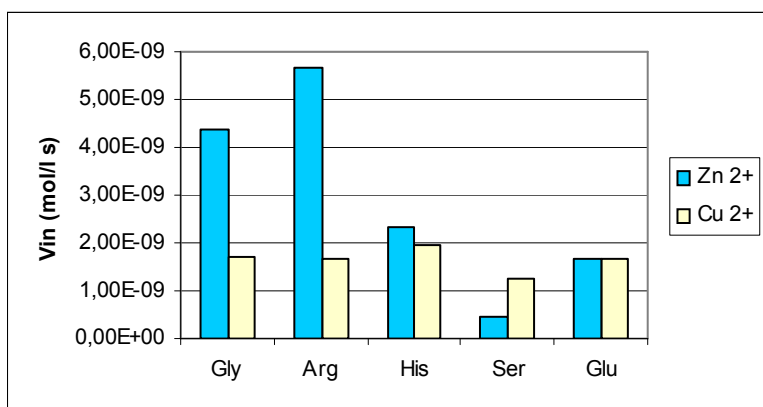


Figura 5.6 Confronto Zn(II) / Cu(II) [dendrimer] = 12.5 μ M, [M^{II}] = 50 μ M, [HPNPP] = 1 mM, pH = 7.5, [HEPES] = 25 mM, T=40 °C

I dati ottenuti indicano che lo ione Cu²⁺ complessato al Tacn non sembra molto influenzato nella sua reattività dalla presenza di altri gruppi funzionali, le velocità misurate sono piuttosto uniformi, e nell'ordine di quella dello ione libero in soluzione acquosa (figura 5.6).

Gli esperimenti sono inoltre stati svolti (con Zn²⁺ come ione metallico) utilizzando come substrato il bis-nitrofenilfosfato (BNPP), l'idrolisi di questo diestere fosforico è più difficile di quella dell'HPNPP, in quanto non presenta un idrossile che permetta un meccanismo intramolecolare, questo substrato può quindi considerarsi un sistema modello del DNA (figura 5.7).

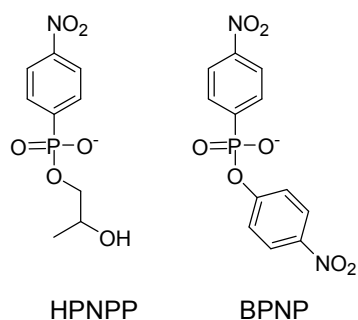


Figura 5.7

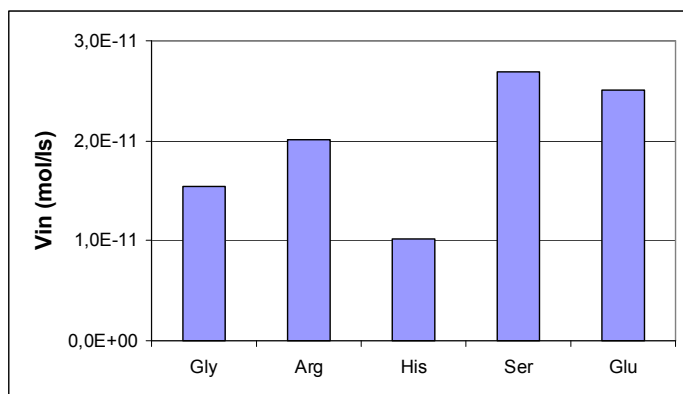


Figura 5.8 Idrolisi del BNPP. [dendrimer] = 12.5 μ M, [Zn^{II}] = 50 μ M, [BNPP] = 1.0 mM, pH = 7.5, [HEPES] = 25 mM, T = 40 °C.

Le velocità di idrolisi sono in effetti molto inferiori alle precedenti, e non si riscontrano accelerazioni notevoli (figura 5.8). Tuttavia è interessante notare come il profilo di reattività sia diverso da quello ottenuto per l'HPNPP, in questo caso infatti i più attivi sono la serina e il glutammato; questo indica che probabilmente il meccanismo di catalisi è diverso e quindi i gruppi funzionali interagiscono in modo diverso.

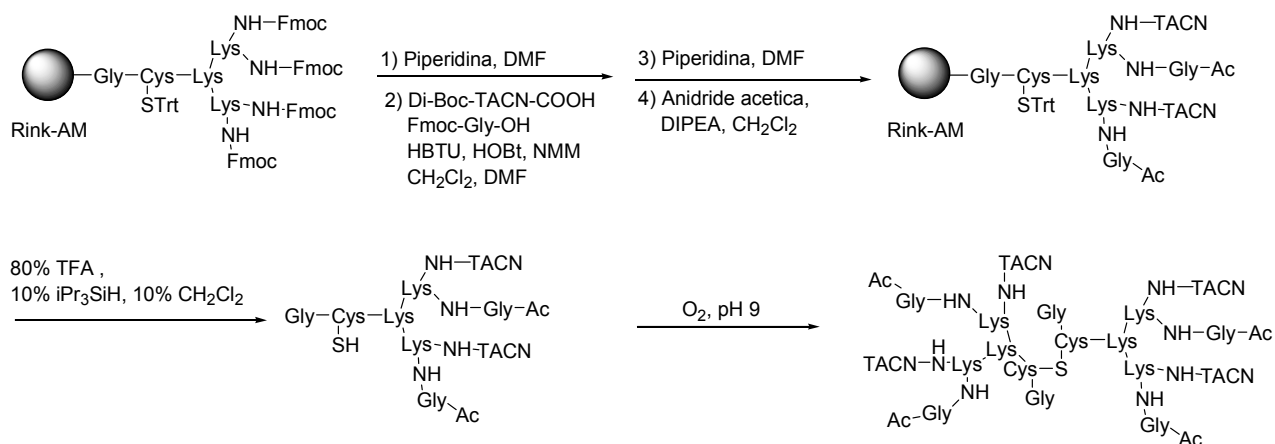
In conclusione la procedura utilizzata per la sintesi di dendrimeri eterofunZIONALIZZATI, si è rivelata efficace, in quanto ci ha permesso di introdurre una discreta varietà di gruppi funzionali diversi con la medesima semplice procedura sintetica. In tal modo si può effettuare in poco tempo uno screening preliminare di reattività che permette di individuare quali interazioni tra gruppi siano favorevoli. I risultati da noi ottenuti per la nostra libreria non hanno evidenziato grandi effetti sulla catalisi, anche se comunque sono stati riscontrati degli interessanti profili di reattività. Ad esempio tra i dendrimeri con arginina e quelli con serina vi è un aumento di reattività di più di sei volte, una differenza ben evidente.

Probabilmente nel nostro caso l'effetto cooperativo tra i due ioni metallici è molto forte, per cui gli effetti positivi di altri gruppi funzionali non emergono a sufficienza. Inoltre spesso queste interazioni richiedono una ben definita disposizione spaziale dei gruppi, mentre la struttura dei dendrimeri è piuttosto flessibile e aperta. Questa metodologia potrebbe comunque rivelarsi molto utile per lo studio della catalisi di altri tipi di reazioni, ad esempio nel campo dell'organo catalisi (addizioni aldoliche e di Michael), o nella catalisi stereoselettiva studiando l'effetto dell'inserimento di gruppi chirali.

5.2 DENDRIMERI MISTI TACN – GLICINA A VARI RAPPORTI

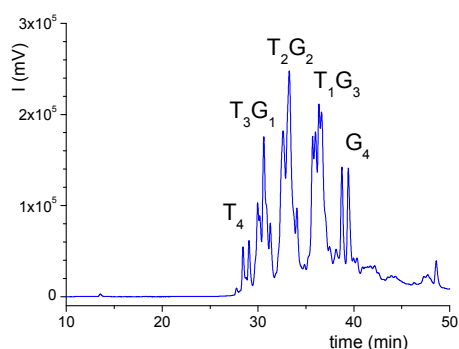
5.2.1 SINTESI

Negli studi compiuti in precedenza sui dendrimeri eterofunzionali il rapporto tra i due gruppi funzionali presenti sulla superficie era stato mantenuto fisso e pari a un rapporto 1:1. Nello studio seguente invece si è andati a variare tale rapporto, utilizzando diverse percentuali relative di Tacn e glicina. Quindi in seguito si è andati a vedere come varia l'attività catalitica dei dendrimeri in funzione della diversa composizione.



Schema 5.2 Procedura di sintesi per dendrimeri eterofunzionali Tacn-Gly a vari rapporti.

La metodica di sintesi è stata identica a quella utilizzata nello studio precedente: in questo caso il dendrone d4 legato alla resina è stato funzionalizzato utilizzando una miscela di coupling formata da 3x equivalenti di (di-Boc)Tacn-CH₂COOH e 3(1-x) equivalenti di Fmoc-Gly-OH (con 0<x<1) (schema 5.2). Sono stati derivatizzati vari batch utilizzando diversi rapporti tra i due amminoacidi, ottenendo così dendroni con diverse composizioni di gruppi funzionali. Dopo l'acetilazione i dendroni sono stati staccati dalla resina e quindi analizzati per HPLC dopo essere stati derivatizzati con diazo-difenilmaleimide.



% Tacn coupling	% Tacn dendrone
20	7,8
40	29,6
50	38,7
60	44,4
80	65,3
100	100

Figura 5.9 HPLC del dendrone d-4 al 60% in Tacn e tabella delle % calcolate (la molteplicità dei picchi è dovuta alla presenza di diversi isomeri).

Con l'analisi HPLC si sono potuti separare i 5 diversi dendroni che si possono formare in seguito al coupling, e quantificare la percentuale relativa tra di essi in ciascun batch (figura 5.9). I risultati ottenuti mostrano che la composizione dei prodotti rispecchia quella della miscela di coupling, tuttavia si ha una percentuale di Tacn inferiore a quella attesa. Questo è dovuto ad un coupling preferenziale da parte della glicina, forse per ragioni steriche, grazie alle sue minori dimensioni.

Con la procedura già vista in precedenza i dendroni sono stati dimerizzati ottenendo i dendrimeri D8 che sono stati utilizzati per gli studi di catalisi.

5.2.2 STUDI CINETICI

1) A concentrazione costante di dendrimero

Come primo studio sono state misurate le attività catalitiche dei diversi dendrimeri nei confronti dell'idrolisi dell'HPNPP. Nei vari esperimenti relativi a ciascun batch, è stata utilizzata la medesima concentrazione di dendrimero D8, pari a 40 μM ; questo significa che la quantità di Tacn presente in soluzione varia al variare della sua percentuale sui dendrimeri. La quantità di ione zinco aggiunto è stata pari ad un equivalente rispetto alla quantità di Tacn.

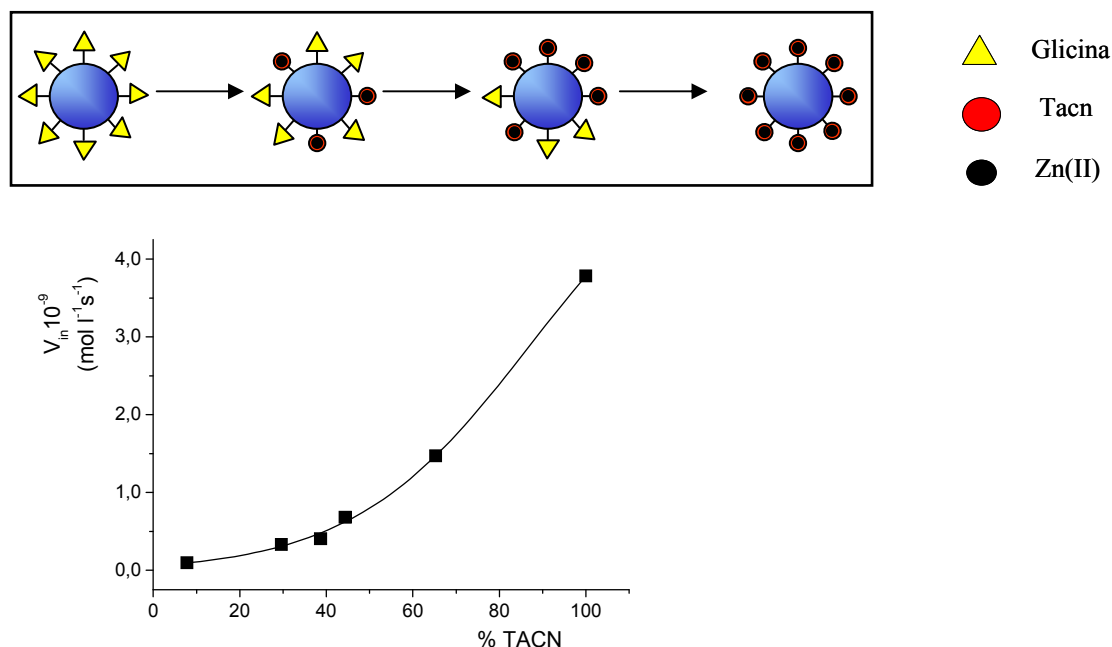


Figura 5.10 Velocità iniziale di idrolisi dell'HPNPP al variare della funzionalizzazione del dendrimero D8 [dendrimero] = 40 μM , $[\text{Zn}^{\text{II}}]$ = 1 equiv. vs Tacn, [HPNPP] = 0.8 mM, pH = 7.5, [HEPES] = 25 mM, T=40 °C, H₂O 30 % ACN.

Il grafico della velocità iniziale di idrolisi presenta un aumento non lineare al crescere della percentuale di Tacn, con un'attività che si fa significativa a partire dal 50 % (figura 5.10). Tale

andamento è spiegabile con l'aumento del numero di possibili interazioni cooperative tra complessi metallici: a basse percentuali di Tacn è difficile che due gruppi attivi si trovino vicini tra loro, mentre oltre il 50 % tale probabilità inizia ad essere elevata.

2) A concentrazione costante di dendrimero D8-100% Tacn variando la quantità di Zn(II)

Per confronto con il precedente, è stato effettuato un esperimento analogo, utilizzando il dendrimero funzionalizzato unicamente con Tacn. La concentrazione del dendrimero è stata mantenuta costante, mentre è stata variata la concentrazione di ione metallico (in pratica si tratta di una "titolazione cinetica" come già visto nel cap. 3).

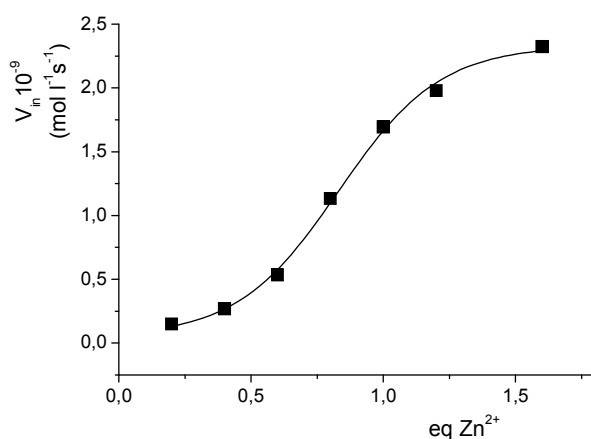
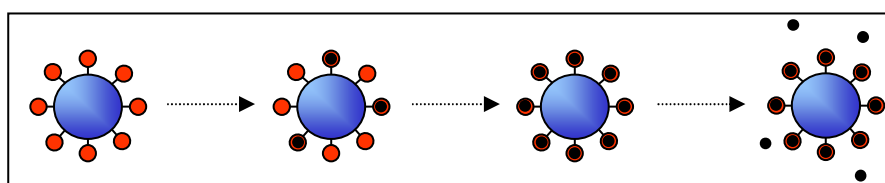


Figura 5.11 [Tacn] = 20 μ M, [Zn²⁺] = 2-32 μ M, [HPNPP] = 0.8 mM, pH = 7.5, [HEPES] = 25 mM, T=40 °C, H₂O 30 % ACN.

Anche in questo caso si ha un aumento di tipo esponenziale della velocità di idrolisi fino ad un equivalente di Zn(II), in seguito l'attività aumenta in modo minore in quanto dovuta allo ione libero in soluzione (figura 5.11). L'andamento complessivo è quindi di tipo sigmoideale, e anche in questo caso si spiega con l'aumento del numero di coppie bimetalliche che si possono formare. I due esperimenti sono quindi equivalenti, come si può vedere dalla sovrapposizione dei due grafici (figura 5.12).

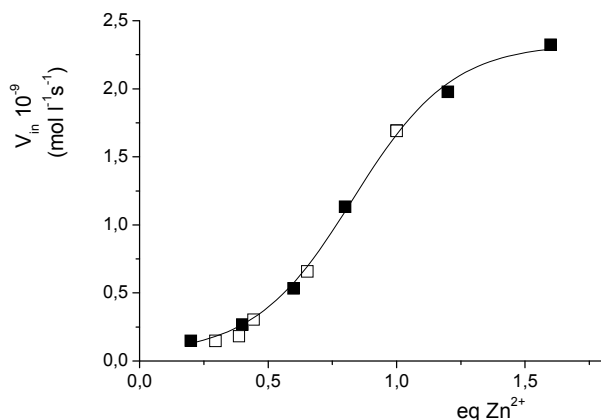


Figura 5.12 Confronto tra gli esperimenti variando il rapporto Tacn*Zn/Gly (□) e variando Tacn/Zn (■).

3) A concentrazione costante di Tacn variando Tacn*Zn/Gly

Negli esperimenti precedenti l'aumento dell'attività catalitica era dovuto non solo alla maggiore cooperatività, ma anche al semplice aumento della concentrazione di gruppo attivo presente. Per riuscire ad evidenziare l'effetto dovuto alla cooperatività "pulito", privo degli effetti puramente numerici gli esperimenti sono stati eseguiti in condizioni differenti. Utilizzando i vari batch a diversa composizione sono stati eseguite le cinetiche di idrolisi mantenendo costante la concentrazione di Tacn, per cui minore è la % di Tacn nel dendrimero, maggiore è la quantità di dendrimero da aggiungere.

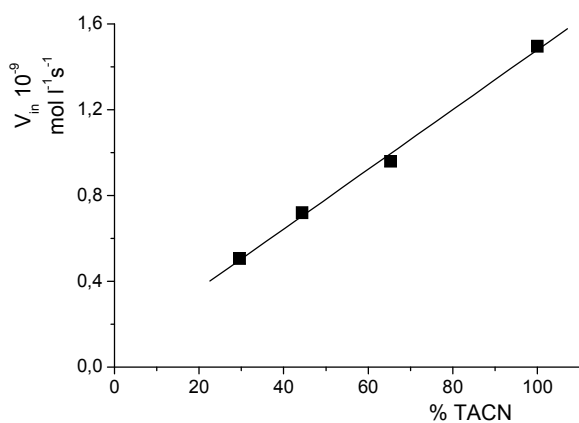
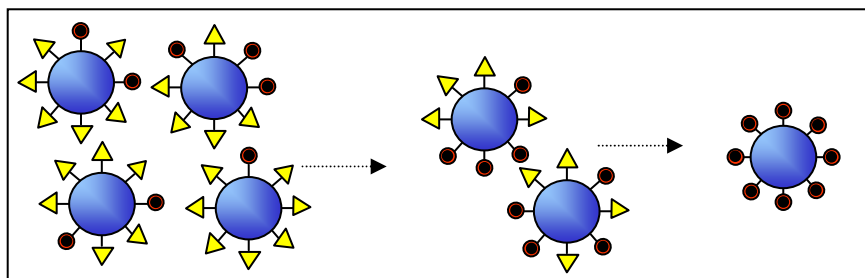


Figura 5.13 [Tacn] = 20 μM, [Zn^{II}] = 20 μM, [HPNPP] = 0.8 mM, pH = 7.5; [HEPES] = 25 mM, T=40 °C, H₂O 30 % ACN.

La relazione tra la velocità di idrolisi e la composizione dei dendrimeri è lineare: l'aumento di attività in questo caso è dovuto all'effetto cooperativo tra i gruppi (figura 5.13). Infatti nei dendrimeri a bassa percentuale di Tacn, le unità attive sono distribuite su un maggior numero di dendrimeri, mentre quando sono riunite sul medesimo dendrimero possono interagire tra loro dando un'attività superiore, pur a parità di concentrazione complessiva. L'estrapolazione a zero della retta, rappresenta il valore per il Tacn isolato in presenza di una concentrazione molto alta (ipoteticamente infinita) di glicina. Tale valore è prossimo a zero, e il fatto indica che la glicina non presenta alcuna attività catalitica.

4) A concentrazione costante di Zn variando Tacn/Zn

Per confronto con il precedente, è stato eseguito uno studio cinetico usando una quantità costante di ione Zn(II), e variando la quantità di dendrimero al 100 % di Tacn presente. In tal modo lo ione metallico si distribuisce su un numero via via maggiore di dendrimero, per cui la percentuale di complesso metallico presente sul dendrimero diminuisce.

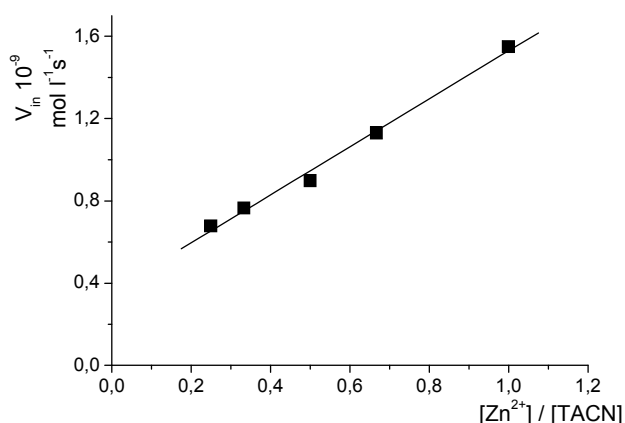
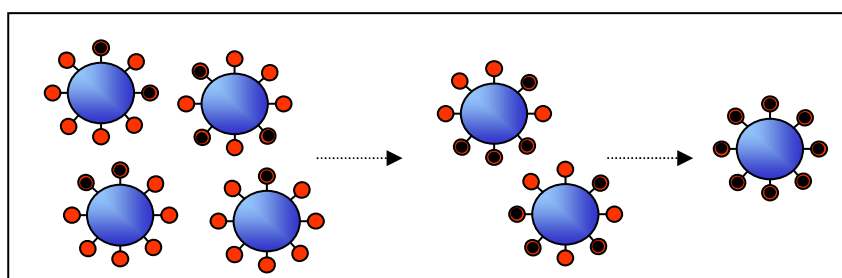


Figura 5.14 [Zn^{II}] = 20 μM, [Tacn] = 20-80 μM, [HPNPP] = 0.8 mM, pH = 7.5; [HEPES] = 25 mM, T=40 °C, H₂O 30 % ACN.

L'esperimento risulta analogo al precedente, e infatti anche in questo caso l'aumento della velocità della reazione è lineare (figura 5.14) e dovuto agli effetti di cooperazione: lo zinco quando si trova riunito in cluster può formare un maggior numero di coppie bimetalliche che sono attive

cataliticamente. Se si estrapola la retta fino allo zero, si ottiene un valore che si riferisce ad una situazione in cui il complesso $Tacn^*Zn$ è completamente circondato da Tacn non legato al metallo. Al contrario del caso precedente, il valore non è nullo, il che indica che anche il Tacn non complessato può avere un ruolo nella catalisi, come ammina protonata. La sua carica positiva potrebbe infatti interagire con la carica negativa del fosfato, in modo analogo a quanto avviene per l'arginina.

In entrambi i casi la relazione tra attività e composizione percentuale della superficie del dendrimero è di tipo lineare, il che è coerente con una distribuzione di tipo casuale e statistico dei gruppi attivi. In questo caso, infatti il numero di siti attivi che si possono formare aumenta linearmente all'aumento della percentuale di unità catalitiche. Nel caso, per ipotesi, che la distribuzione non fosse casuale, ma i gruppi attivi tendessero a trovarsi vicini tra loro, l'attività a basse percentuali aumenterebbe più velocemente, per la formazione di cluster già all'inizio. Nel caso opposto, invece, in cui vi fosse una repulsione tra i gruppi, l'effetto sarebbe opposto, con un aumento della reattività solo a rapporti più alti (figura 5.15).

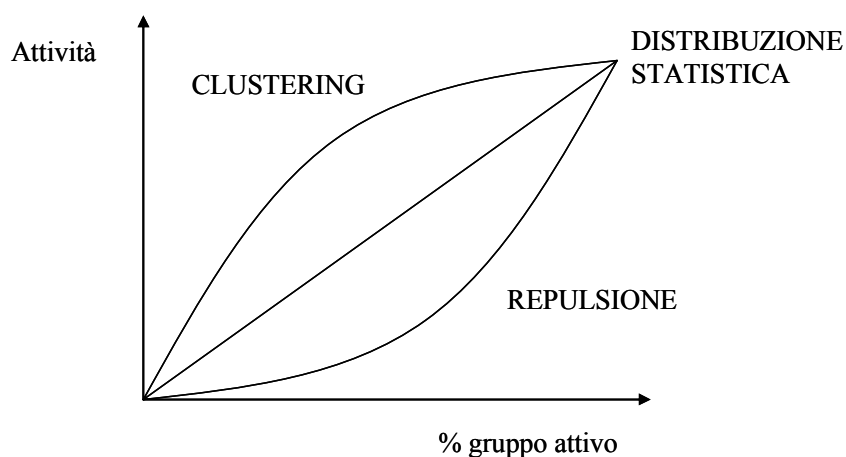


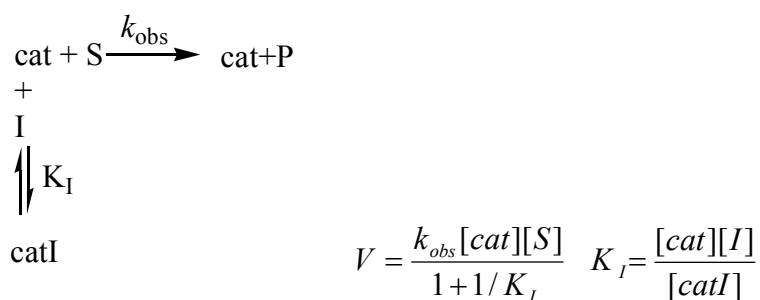
Figura 5.15 Variazione dell'attività catalitica al variare della % di gruppo attivo in un catalizzatore multivalente, nei vari tipi di distribuzione.

Uno studio di attività catalitica di questo tipo può quindi dare informazioni sulla distribuzione dei gruppi funzionali in catalizzatori di tipo multivalente. Gli esperimenti eseguiti possono quindi essere presi come riferimento per il confronto con altri catalizzatori, per capire quale sia la loro strutturazione; in particolare questo risulta di interesse per sistemi di tipo self-assembly, come le nanoparticelle d'oro funzionalizzate, che saranno trattate nel prossimo capitolo.

5) D8-Tacn/Gly, inibizione con dimetilfosfato

Per la serie di dendrimeri a varie composizioni non è stato possibile, come era stato fatto per i dendrimeri a diversa valenza nel cap. 3, ottenere dei grafici di saturazione, e quindi valutare le differenze in k_{cat} e K_M . Questo perchè la K_M risulta troppo elevata e i grafici risultano delle rette, come visto nel cap. 5.2. Per potere ricavare una stima dell'andamento della costante di binding K_M in maniera indiretta sono stati quindi effettuati degli studi di inibizione dell'attività catalitica. Operando a concentrazione di Tacn costante, in presenza di una quantità costante di HPNPP, sono stati svolti degli esperimenti cinetici aggiungendo quantità via via crescenti di un inibitore competitivo, il dimetil fosfato (DMP).

La velocità iniziale di idrolisi diminuisce per effetto dell'inibizione, e il suo andamento è stato analizzato secondo un modello dello schema 5.3, ottenuto considerando una cinetica del secondo ordine.



Schema 5.3 Inibizione competitiva del DMP.

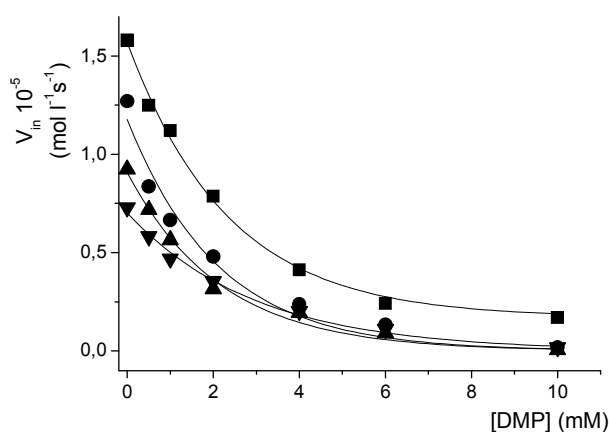


Figura 5.16 Inibizione dell'idrolisi dell'HPNPP da parte del DMP per D8-(Tacn/Gly): ■ D8(100 % Tacn); ● D8(80 % Tacn); ▲ D8(60 % Tacn); ▼ D8(40 % Tacn). [Tacn] = 20 μ M, [Zn^{II}] = 20 μ M, [HPNPP] = 1.0 mM, [DMP] = 0 – 10 mM, pH = 7.5; [HEPES] = 25 mM, T=40 °C, H₂O 30 % ACN.

Dal fitting dei dati secondo l'equazione in schema 5.3 sono stati ricavati, per ogni dendrimero, i valori di K_I , che rappresenta la costante di dissociazione del complesso inibitore – catalizzatore.

Tabella 5.1 Valori di K_I del dimetilfosfato.

% Tacn	K_I (10^{-3} mol/l)
29	1.5
44	1.0
65	0.9
100	1.1

Il valore della costante di inibizione all'aumentare della percentuale di Tacn inizialmente diminuisce, ma poi torna a crescere. In effetti il modello applicato non si adatta bene ad un sistema multivalente come il nostro, in quanto non tiene conto di due fattori:

- la concentrazione di Tacn è costante, ma non lo è quella dei siti catalitici bimetallici, che aumenta con la % di Tacn
- l'inibitore può legarsi sia ad un singolo complesso metallico, sia ad un sito bimetallico.

Per questo i valori di K_I ottenuti per il DMP non possono in realtà essere direttamente correlati ai valori di K_M per l'HPNPP.

5.3 PARTE SPERIMENTALE

Per i reagenti e la strumentazione utilizzata si rimanda al capitolo 2.5

5.3.1 SINTESI DENDRIMERI ETEROFUNZIONALIZZATI

Per la sintesi è stato utilizzato il dendrone Gly-Cys(STrt)-Lys-(Lys-(NHfmoc)₂)₂ supportato su resina Tentagel RAM sintetizzato con la procedura vista nel cap. 3 (loading in gruppi NH₂ 1.36 mmol/g, misurato da sblocco Fmoc).

Per i dendrimeri misti Tacn - vari amminoacidi si sono utilizzati 9 batch da 16 mg di resina, per i dendrimeri a vari rapporti Tacn/Gly sono stati utilizzati 4 batch da 15 mg di resina, i dendrimeri funzionalizzati con solo Tacn e con solo Gly sono stati sintetizzati su 20 mg di resina.

Deprotezione Fmoc

La resina è stata fatta reagire con 800 µl di piperidina 20 % in DMF per 15', quindi è stata lavata 2xDMF, 2xDCM. Il trattamento è stato ripetuto per 15'.

Coupling dendrone d4 con Tacn/Vari amminoacidi

Gli amminoacidi utilizzati sono stati i seguenti:

- Fmoc-Gly- OH
- Fmoc-Arg(Pbf)-OH Pbf = 2,2,4,6,7-pentametildiidrobenzofuran-5-sulfonile
- Fmoc-His(Mmt)-OH Mmt = 4-metossitritile
- Fmoc-Ser(OTrt)-OH
- Fmoc-Glu(OtBu)-OH
- Fmoc-Cit-OH
- Fmoc-β-Homoarg(Pmc)-OH Pmc = 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonile
- Fmoc-Phe(4-Boc₂-guan)-OH
- Fmoc-8-Aoc-OH

In 400 µl di CH₂Cl₂ sono stati sciolti 12.8 mg di Di-Boc-Tacn-OH (7) (1.5 eq), e quindi sono stati aggiunti 1.5 eq dell'amminoacido, 33 mg di HBTU (4 eq), 12 mg di HOBt (4 eq), 400 µl di DMF, 50 µl di N-metilmorfolina (20 eq). Dopo 10' la miscela di coupling è stata aggiunta alla resina (16 mg), e la reazione è proseguita una notte. La resina è stata lavata 3xDMF, 3xDCM e la completezza del coupling è stata verificata mediante Kaiser test.

Coupling dendrone d4 con Tacn/Gly vari rapporti

Sono state realizzate due soluzioni madre: una sciogliendo 54 mg di Di-Boc-Tacn-OH (7) in 1.1 ml di CH₂Cl₂, e una sciogliendo 41 mg di Fmoc-Gly-OH in 1.1 ml di DMF.

Sono state quindi realizzate le seguenti soluzioni di coupling:

% Tacn	Soluzione Tacn (μ l)	Soluzione Gly (μ l)	CH ₂ Cl ₂ (μ l)	DMF (μ l)
20	100	400	300	0
40	200	300	200	100
60	300	200	100	200
80	400	100	0	300

A ciascuna sono stati aggiunti 33 mg di HBTU (4 eq), 12 mg di HOBt (4 eq), 50 μ l di N-metilmorfolina (20 eq). Dopo 10' la miscela di coupling è stata aggiunta alla resina (16 mg), e la reazione è proseguita una notte. La resina è stata lavata 3xDMF, 3xDCM e la completezza del coupling è stata verificata mediante Kaiser test.

Coupling dendrone d4 con Tacn

In 400 μ l di CH₂Cl₂ sono stati sciolti 33 mg di Di-Boc-Tacn-OH (7) (3 eq), e quindi sono stati aggiunti 42 mg di HBTU (4 eq), 15 mg di HOBt (4 eq), 400 μ l di DMF, 60 μ l di N-metilmorfolina (20 eq). Dopo 10' la miscela di coupling è stata aggiunta alla resina (20 mg), e la reazione è proseguita una notte. La resina è stata lavata 3xDMF, 3xDCM e la completezza del coupling è stata verificata mediante Kaiser test.

Coupling dendrone d4 con Gly

In 400 μ l di DMF sono stati sciolti 19 mg di Fmoc-Gly-OH (3 eq), e quindi sono stati aggiunti 42 mg di HBTU (4 eq), 15 mg di HOBt (4 eq), 400 μ l di CH₂Cl₂, 60 μ l di N-metilmorfolina (20 eq). Dopo 10' la miscela di coupling è stata aggiunta alla resina (20 mg), e la reazione è proseguita una notte. La resina è stata lavata 3xDMF, 3xDCM e la completezza del coupling è stata verificata mediante Kaiser test.

Acetilazione

La resina è stata trattata per 3 ore con 400 μ l di CH₂Cl₂, 200 μ l di DIPEA, 200 μ l di anidride acetica, quindi è stata lavata 3xDMF, 3xDCM.

Sblocco dalla resina

La resina è stata trattata con 100 µl di DCM, 100 µl di iPr_3SiH , 700 µl di TFA e 1 goccia di H_2O per 1 h e 30'. La soluzione è stata filtrata e recuperata, e poi evaporata con centrifuga a vuoto. Il residuo è stato sciolto con una goccia di ACN ed è stato precipitato con etere etilico, eliminando il surnatante. Il prodotto ottenuto è stato sciolto in 400 µl di H_2O + 400 µl ACN.

Analisi

Le soluzioni dei dendroni sono state titolate mediante test di Ellmann (vedi cap. 3).

I dendroni sono stati derivatizzati con dye maleimmidico (vedi cap. 4) e analizzati mediante HPLC.

Dimerizzazione dendroni

I dendroni sono stati ossidati con aria a pH basico per ottenere i corrispondenti dendrimeri, seguendo la metodica riportata nel cap. 3.

Analisi HPLC dei dendroni

Colonna: Phenomenex Jupiter 4u Proteo 90A

Eluenti: A: H_2O , 0,1 % TFA; B: Acetonitrile 0,1 % TFA

Gradiente: t = 0, B = 10 %; t = 50', B = 50 %; t = 60', B = 90 %; t = 65', B = 90 %; t = 75', B = 10%.

Flusso: 0,8 ml/min

Rivelatore: UV-VIS $\lambda = 328$ nm.

Per i dendroni omofunionalizzati si hanno due picchi per la presenza di due diastereoisomeri in seguito al coupling tiolo-maleimmide. Per i dendroni misti si hanno molteplici picchi per la presenza di isomeri. Il dye in eccesso non reagito esce a 62,6 min.

Dendrimeri misti Tacn/Gly

d4-(Tacn)₄: 28.7 min

d4-(Tacn)₃(Gly): 30.7 min

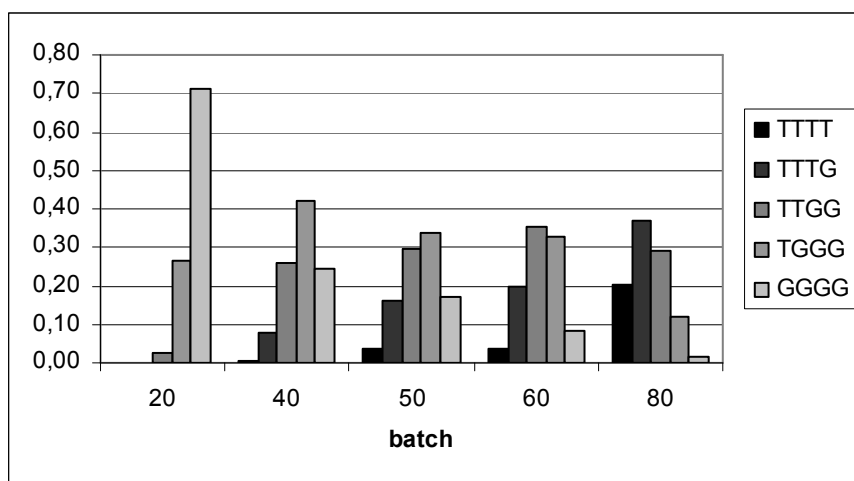
d4-(Tacn)₂(Gly)₂: 33.1 min

d4-(Tacn)(Gly)₃: 36.2 min

d4-(Gly)₄: 39.0 min

Tabella 5.2 Rapporto tra i componenti per i dendroni a diversi rapporti Tacn/Gly e percentuale di Tacn presente ottenuti dall'analisi HPLC

	20	40	50	60	80
TTTT	0,00	0,01	0,04	0,04	0,20
TTTG	0,00	0,08	0,16	0,20	0,37
TTGG	0,02	0,26	0,29	0,35	0,29
TGGG	0,27	0,42	0,34	0,33	0,12
GGGG	0,71	0,24	0,17	0,08	0,02
Tacn	0,08	0,29	0,39	0,44	0,65

**Figura 5.16** Distribuzione dei prodotti nei dendroni d4-Tacn/Gly a vari rapporti.

5.3.2 STUDI CINETICI

Gli esperimenti cinetici di attività catalitica sono state seguiti utilizzando un lettore a micropiastre a 96 pozzetti, misurando ad intervalli regolari di tempo l'assorbanza a 401 nm relativa alla forma deprotonata del p-nitrofenolo liberatosi. Le cinetiche sono state svolte a pH 7.5 tamponato con HEPES, a 40°C, ponendo nel pozzetto per prima la soluzione del dendrimero, quindi il tampone e Zn(II), per formare in situ il complesso Zn-Tacn attivo. Solo alla fine è stato aggiunto il substrato, la soluzione è stata portata a volume (250 μ l) con H₂O milliq e ACN (30 %). Le velocità iniziali sono state calcolate dal fitting lineare della parte iniziale delle curve cinetiche (conversione < 10 %), i valori in assorbanza sono stati convertiti in valori in concentrazione utilizzando una retta di taratura per il p-nitrofenolo.

Soluzioni madre: Dendrimeri: $1.25 \cdot 10^{-4}$ M ($1 \cdot 10^{-3}$ M in gruppi) in H₂O/ACN 1:1
Zn(NO₃)₂: $1 \cdot 10^{-3}$ M in H₂O
Cu(NO₃)₂: $1 \cdot 10^{-3}$ M in H₂O
Tampone: HEPES 0.1 M in H₂O pH 7.5
HPNPP: 0.01 M in H₂O
BNPP: 0.01 M in H₂O
DMP: 0.05 M in MeOH

Screening libreria: idrolisi HPNPP con Zn.

Condizioni utilizzate: [dendrimero] = $2.5 \cdot 10^{-6}$ M ($2 \cdot 10^{-5}$ M in gruppi)
[Zn²⁺] = $1 \cdot 10^{-5}$ M
[HPNPP] = 0.1 – $1.6 \cdot 10^{-3}$ M
[HEPES] = 0.01 M pH 7.5

Screening libreria: idrolisi HPNPP con Cu.

Condizioni utilizzate: [dendrimero] = $1.25 \cdot 10^{-5}$ M ($1 \cdot 10^{-4}$ M in gruppi)
[Cu²⁺] = $5 \cdot 10^{-5}$ M
[HPNPP] = $1 \cdot 10^{-3}$ M
[HEPES] = 0.01 M pH 7.5

Screening libreria: idrolisi BNPP con Zn.

Condizioni utilizzate: [dendrimero] = $1.25 \cdot 10^{-5}$ M ($1 \cdot 10^{-4}$ M in gruppi)
[Zn²⁺] = $5 \cdot 10^{-5}$ M
[HPNPP] = $1 \cdot 10^{-3}$ M
[HEPES] = 0.01 M pH 7.5

D8-Tacn/Gly: concentrazione di dendrimero costante.

Condizioni utilizzate: [dendrimero] = $5 \cdot 10^{-6}$ M ($4 \cdot 10^{-5}$ M in gruppi)
[Zn²⁺] = 1 eq rispetto a [Tacn]
[HPNPP] = $8 \cdot 10^{-4}$ M
[HEPES] = 0.025 M pH 7.5

D8-Tacn: concentrazione di dendrimero costante, variando [Zn²⁺].

Condizioni utilizzate: [dendrimero] = $2.5 \cdot 10^{-6}$ M ([Tacn] = $2 \cdot 10^{-5}$ M)
[Zn²⁺] = 0.2 – $3.2 \cdot 10^{-5}$ M
[HPNPP] = $8 \cdot 10^{-4}$ M
[HEPES] = 0.025 M pH 7.5

D8-Tacn/Gly: concentrazione di Tacn costante.

Condizioni utilizzate: [Tacn] = $2 \cdot 10^{-5}$ M
[Zn²⁺] = $2 \cdot 10^{-5}$ M
[HPNPP] = $8 \cdot 10^{-4}$ M
[HEPES] = 0.025 M pH 7.5

5 - DENDRIMERI ETEROFUNZIONALIZZATI

D8-Tacn: concentrazione di Zn^{2+} costante, variando [Tacn].

Condizioni utilizzate: [Tacn] = $2 - 8 \cdot 10^{-5}$ M
[Zn^{2+}] = $2 \cdot 10^{-5}$ M
[HPNPP] = $8 \cdot 10^{-4}$ M
[HEPES] = 0.025 M pH 7.5

D8-Tacn/Gly: inibizione con dimetilfosfato.

Condizioni utilizzate: [Tacn] = $2 \cdot 10^{-5}$ M
[Zn^{2+}] = $2 \cdot 10^{-5}$ M
[HPNPP] = $1 \cdot 10^{-3}$ M
[DMP] = 0 – $1 \cdot 10^{-2}$ M
[HEPES] = 0.025 M pH 7.5

6 NANOPARTICELLE D'ORO FUNZIONALIZZATE CON MISCELE DI TIOLI

6.1 INTRODUZIONE

6.1.1 Au-MPC COME SISTEMI BIOMIMETICI

Tra i sistemi multivalenti particolarmente interessanti sono quelli ottenibili per self-assembly, in cui la struttura si viene a creare per l'unione spontanea dei componenti una volta posti insieme. In questo campo molto studiate sono le nanoparticelle d'oro ricoperte da un monolayer organico (Au-MPC), costituite da un cluster di atomi di oro di dimensioni nanometriche passivato con uno strato di tioli organici. Intorno al nucleo metallico, grazie alla stabilità del legame S-Au, si forma uno strato di molecole organiche disposte in maniera impaccata, con i gruppi funzionali terminali esposti sulla superficie (figura 6.1). In questo modo, derivatizzando in maniera opportuna i tioli, si possono formare dei sistemi multivalenti che portano un gran numero di gruppi funzionali all'esterno.

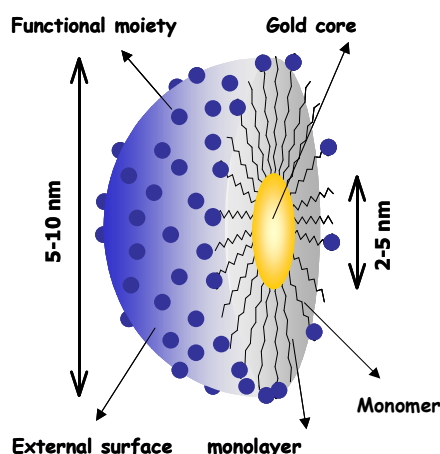


Figura 6.1 Schema di un Au-MPC

I campi d'applicazione di queste strutture sono molteplici, e sfruttano sia le particolari proprietà ottiche ed elettroniche del cluster metallico, sia le caratteristiche del layer organico [65].

Studi recenti hanno dimostrato come tali sistemi possano fungere da catalizzatori biomimetici molto efficaci: l'inserimento di opportuni peptidi ha creato dei catalizzatori attivi per l'idrolisi di esteri carbossilici (figura 6.2a) [66], mentre la ricopertura con leganti per ioni Zn^{2+} ha permesso di ottenere degli ottimi catalizzatori per l'idrolisi di diesteri fosforici (figura 6.2b)[44]. Questi sistemi sono simili a delle proteine per dimensioni e funzionalità, e il loro comportamento catalitico ricalca quello degli enzimi, per cui possono essere definiti dei "nanozimi".

Le caratteristiche che li rendono così efficaci sono in primo luogo la vicinanza tra i gruppi funzionali presenti sulla superficie che favorisce la cooperatività tra essi, permettendo meccanismi catalitici assenti nei rispettivi monomeri. La prossimità tra gruppi funzionali è causata dalla curvatura sferica della superficie metallica, che porta ad un impaccamento stretto le molecole adsorbite, costringendo in uno spazio ristretto i loro gruppi funzionali; la loro mobilità per lo stesso motivo è bassa, per cui la loro disposizione è fissata e stabile. Inoltre il monolayer metallico crea un ambiente apolare che favorisce la catalisi, come avviene nel sito attivo degli enzimi.

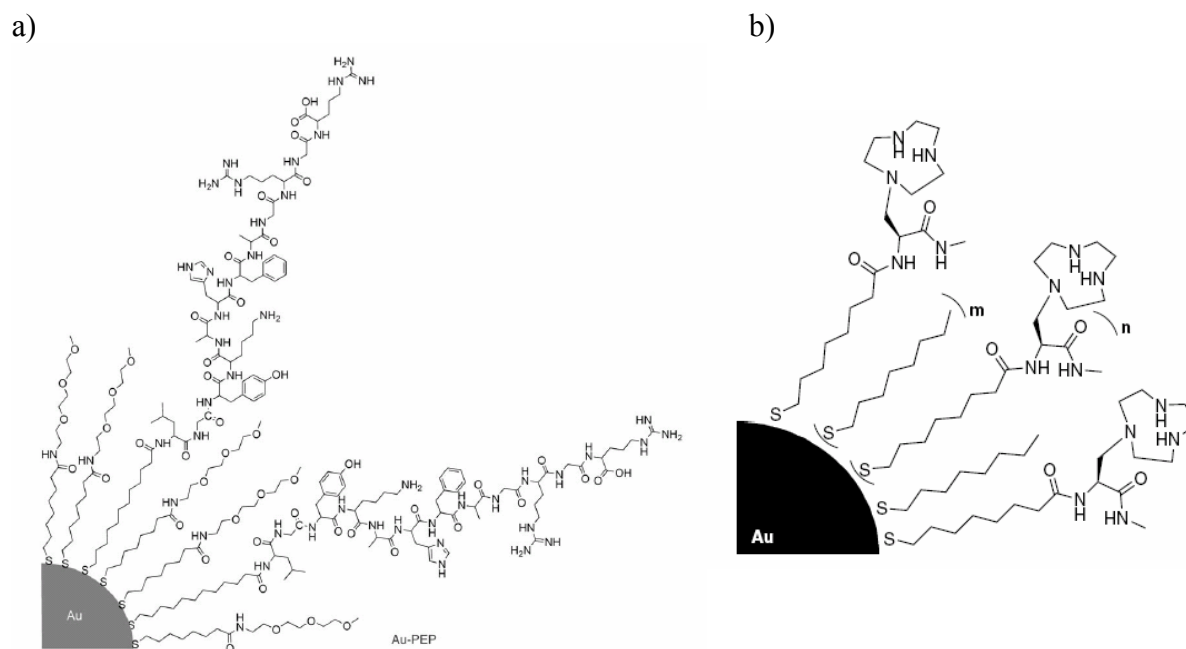


Figura 6.2 Nanoparticelle d'oro funzionalizzate per la catalisi a) dell'idrolisi di esteri carbossilici [66] b) di fosfodiesteri [44].

6.1.2 ORGANIZZAZIONE DEI TIOLI IN Au-MPC MISTI

Le nanoparticelle d'oro possono anche essere funzionalizzate in maniera mista, utilizzando miscele di diversi tioli, allo scopo di ottenere strutture dalle proprietà nuove e di potere modulare le caratteristiche del sistema. Diventa quindi di interesse comprendere quale sia l'organizzazione dei diversi tioli sulla superficie dei nanocluster, se avviene una distribuzione casuale o una formazione di domini separati. Anche riguardo alla modalità di adsorbimento dei tioli sulla superficie vi sono diversi modelli possibili:

- Controllo cinetico: le molecole presenti in soluzione in fase di sintesi raggiungono in modo casuale la superficie metallica e si legano in modo irreversibile ad essa. Il risultato di questo processo porta alla formazione di una matrice organica al cui interno i due componenti sono disposti casualmente, in proporzione tale da riflettere la composizione della soluzione di partenza.

- Meccanismo diffusivo: l'adsorbimento irreversibile, descritto in precedenza, viene seguito da una diffusione in superficie che comporta una redistribuzione totale dei tioli, a dare una situazione finale in cui essi si dispongono nel modo più favorevole.
- Meccanismo di scambio: l'adsorbimento non è un processo irreversibile, ma dinamico: dopo una prima disposizione statistica, i continui processi di adsorbimento e desorbimento comportano il raggiungimento di una situazione finale di equilibrio termodinamico, generalmente rappresentata dalla formazione di domini di molecole dello stesso tipo.

L'argomento è attualmente oggetto di studio e dibattito, e diversi risultati sono presenti in letteratura. Numerosi esempi riportano la formazione di domini separati tra tioli di diverso tipo, le origini e il meccanismo di questo fenomeno non sono del tutto chiarite: la separazione in fasi sembra essere un processo a controllo termodinamico, e le strutture formate sono stabili nel tempo [67]. Già studi su mixed-SAM planari su superfici di Au avevano dimostrato la formazione di domini per separazione di fase, in modo analogo a quanto avviene nelle membrane miste nei sistemi biologici [68]. Studi effettuati su nanoparticelle mediante molecular cross-linking dal gruppo di Lèvy hanno dimostrato che peptidi uguali tendono a porsi vicini tra loro, anche se sono presenti in bassa percentuale ($> 1\%$, figura 6.3) [69].

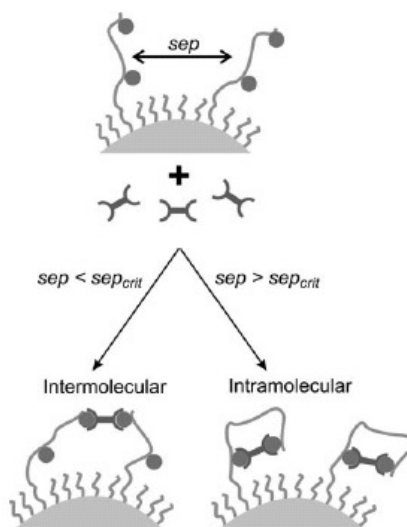


Figura 6.3 Test di prossimità sulla superficie di NP basato su cross-linking intra o intermolecolare (da [69]).

Da studi del gruppo di Rotello i tioli sembrano possedere una certa mobilità sulla superficie: si è visto, infatti, che l'aggiunta di un template può indurre la formazione di domini (figura 6.4) [70].

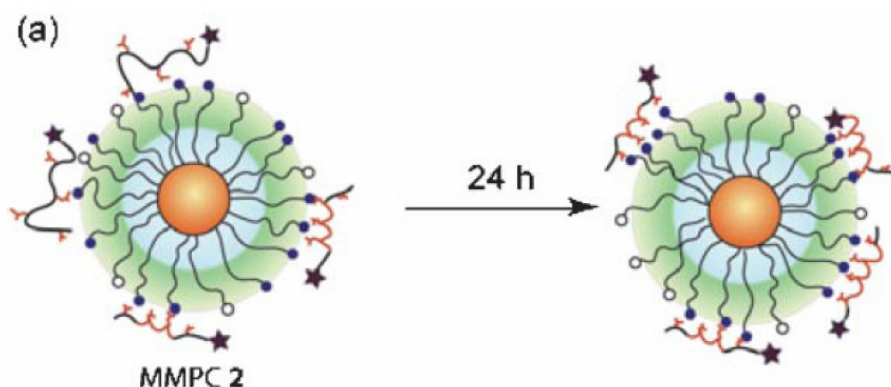


Figura 6.4 Formazione di domini di tioli: nel tempo si ha redistribuzione delle molecole adsorbite, per conferire alla nanoparticella maggiore attività. I tioli attivi sono maggiormente efficaci ad indurre una conformazione ad α -elica in un peptide se sono prossimi gli uni gli altri (da [70]).

A confermare la particolarità di questi sistemi il gruppo di Stellaci ha riportato esempi di formazione di strutture ordinate in Au-MPC miste, rivelate mediante immagini STM e diffrazione ai raggi X [71]. Ad esempio miscele di ottantiolo e $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{SH}$ si dispongono in righe ordinate attorno alla nanoparticella, dando luogo ad un'alternanza di 5 Å di regioni polari ed apolari (figura 6.5). Queste particolari strutture sono stabili e non sembrano essere confinate a specifiche miscele o essere causate da determinate forze intermolecolari. La presenza di disposizioni così ordinate conferisce al sistema nuove caratteristiche per quanto riguarda la solubilità e le interazioni molecolari: ad esempio impedisce l'adsorbimento aspecifico di proteine. L'origine di questi domini ordinati è tuttora oggetto di studio, sembra che essa sia causata dalla curvatura della superficie metallica nelle nanoparticelle, nelle superfici planari infatti tali strutture non sono presenti [72].

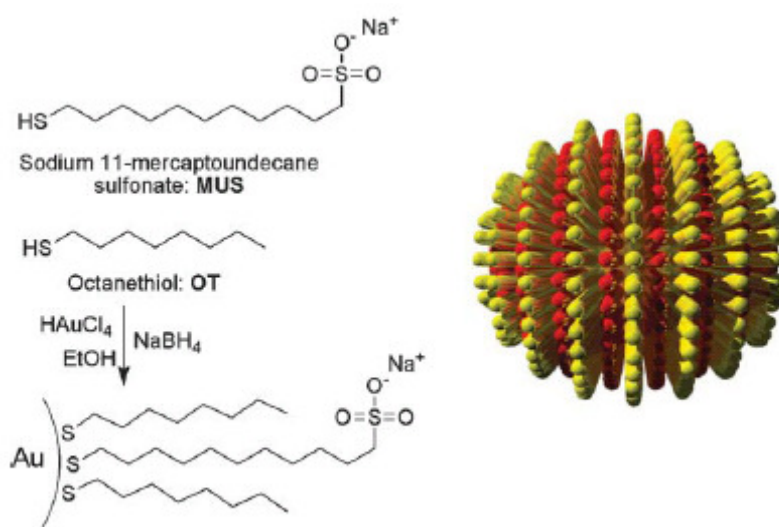


Figura 6.5 Formazione di strutture ordinate su Au-MPC (da [73]).

Come visto nei capitoli precedenti, la catalisi del complesso Tacn-Zn avviene in modo cooperativo tra due unità vicine, quindi l'efficacia del catalizzatore è sensibile alla disposizione spaziale delle unità catalitiche. Studi di catalisi possono quindi anche servire ad avere informazioni sull'organizzazione delle nanoparticelle.

La nostra ricerca ha avuto come obiettivo lo studio delle caratteristiche e dell'efficacia dei Au-MPC come catalizzatori multivalenti. Sono state quindi sintetizzate delle nanoparticelle funzionalizzate con gruppi Tacn, per lo studio della catalisi nell'idrolisi di diesteri fosforici, facendo un confronto con i dendrimeri precedentemente utilizzati. Sono state inoltre sintetizzate delle nanoparticelle a ricopertura mista, utilizzando due tioli diversi, uno con un ruolo catalitico (Tacn) e uno privo (TEG). Variando la percentuale relativa dei due tioli sulla nanoparticella, e misurando l'effetto sulle capacità catalitiche, si possono ottenere informazioni sulla strutturazione del monolayer organico. Dal confronto con l'analogo studio effettuato con i dendrimeri eterofunzionalizzati Tacn/Gly è possibile infatti capire se la distribuzione è di tipo casuale e dettata dalla statistica, o se vi sono dei fenomeni di aggregazione tra tioli dello stesso tipo

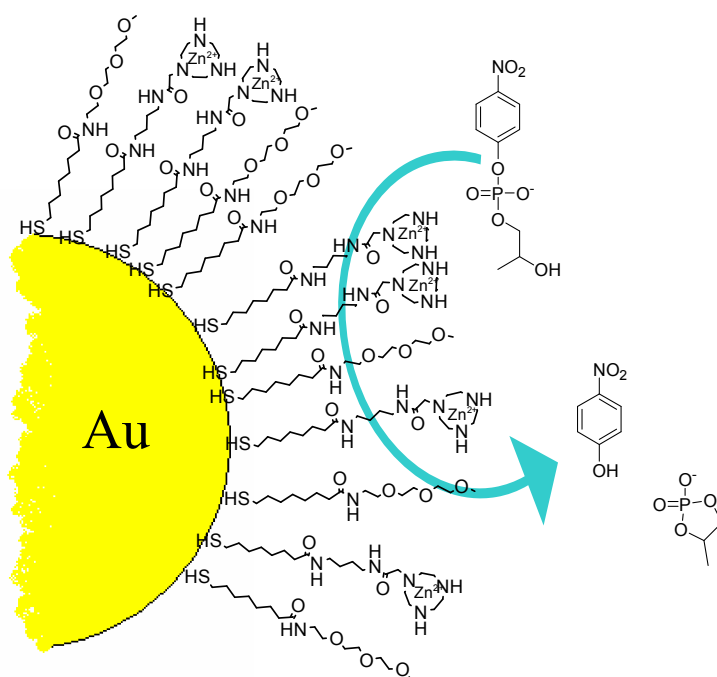


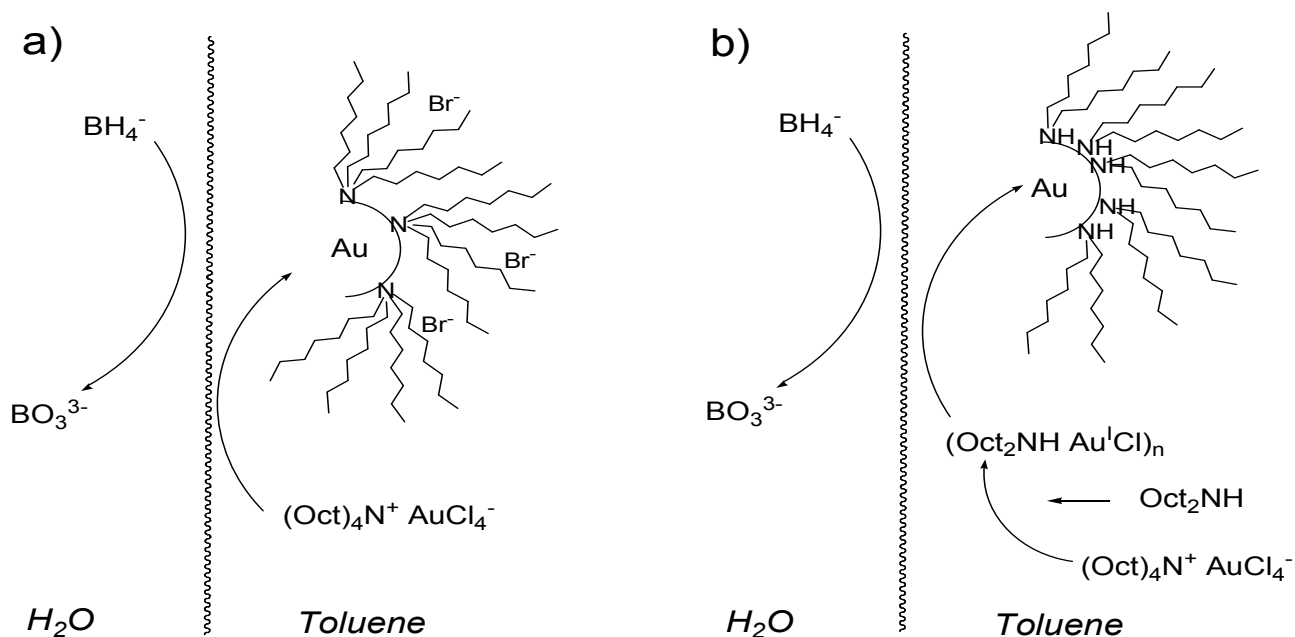
Figura 6.6 Nanoparticella mista Tacn/TEG per l'idrolisi di HPNPP

6.2 SINTESI NANOPARTICELLE D'ORO FUNZIONALIZZATE CON MISCELE DI TIOLI

Gli obiettivi delle nostre ricerche hanno reso necessario lo studio e l'utilizzo di una metodologia per la sintesi e la ricopertura delle nanoparticelle d'oro che rispondesse a precise esigenze. La sintesi doveva permettere di ottenere colloidali di oro di piccole dimensioni, intorno ai 2 nm, in modo da avere un elevato rapporto tra frazione organica e parte inorganica nei nostri sistemi. Questo fa sì che le caratteristiche chimiche siano quelle determinate dai gruppi organici, che inoltre si vengono a trovare confinati in uno spazio ristretto e possono interagire tra loro. La passivazione delle nanoparticelle deve poi permettere l'introduzione di un'ampia varietà di gruppi funzionali, anche complessi, in modo da potere anche controllare le proporzioni quando si utilizzano miscele di tioli. Le strutture sintetizzate devono alla fine essere solubili in ambiente acquoso, per poter essere utilizzate negli studi catalitici in condizioni simili a quelle dei sistemi biologici.

Molti metodi di sintesi normalmente utilizzati risultano quindi non adatti, ad esempio la sintesi diretta di nanocluster d'oro in presenza dei tioli organici [74] non è applicabile in quanto molti gruppi funzionali non sono stabili nelle condizioni riducenti necessarie alla formazione dei colloidali di Au(0). Anche la funzionalizzazione per scambio chimico tra tioli nei confronti di nanoparticelle funzionalizzate con alcantioli [75] non è adatta: la reazione è molto lenta e i prodotti sono difficilmente controllabili. Per una completa sostituzione sarebbe necessario un grande eccesso dei tioli da inserire, il che risulta poco pratico per la disponibilità dei tioli stessi. Per la sintesi e la derivatizzazione è stata quindi utilizzata una metodologia studiata e messa a punto dal nostro gruppo di ricerca che, a partire dal metodo riportato da Brust e Schiffrin [76], ha introdotto alcune importanti modifiche [77]. La sintesi originaria prevedeva la reazione di HAuCl_4 con sodio boridruro in presenza di tetraottilammonio bromuro in toluene, con la formazione di nanocluster di Au(0) stabilizzati dall'ammonio quaternario (schema 6.1a). Nel nostro caso prima del riducente viene aggiunta una diammina alifatica, la diottilammina, che ha il ruolo di ridurre l'Au(III) a Au(I) e di stabilizzare il cluster nella sua crescita all'aggiunta di NABH_4 : al termine si ottengono delle nanoparticelle d'oro metastabili passivate dalla diottilammina (schema 6.1b). La quantità di diottilammina introdotta consente di controllare la dimensione dei cluster metallici: maggiore è il rapporto diottilammina/Au, minore sarà il diametro delle nanoparticelle (figura 6.7), inoltre anche la dispersione dimensionale risulta positivamente ridotta. Il meccanismo del processo non è ancora noto nei dettagli, si ipotizza un equilibrio dinamico di adsorbimento della diammina nei confronti dell'oro, che determina il numero di centri di nucleazione e quindi delle dimensioni; è importante

che l'aggiunta del riducente avvenga rapidamente per garantire una veloce nucleazione, seguita da una crescita più lenta.



Schema 6.1 a) formazione di nanocluster di Au con metodo di Burst-Schiffirin, b) metodo con diottilammina

La stabilità delle nanoparticelle passivate dalla diottilammina è dovuta in primo luogo alla barriera fisica per l'ingombro sterico dell'ammina che impedisce il contatto tra le superfici metalliche; inoltre l'ammina contribuisce a variare la carica superficiale del cluster e ad abbassare la sua energia libera stabilizzandolo. In ogni caso questi nanocluster non sono stabili per tempi lunghi, per cui si procede entro 24 ore alla loro passivazione con i tioli. Questa avviene velocemente per semplice aggiunta dei tioli organici alla soluzione, le nanoparticelle funzionalizzate sono solubili in acqua e possono essere separate facilmente dalla fase organica (schema 6.2).

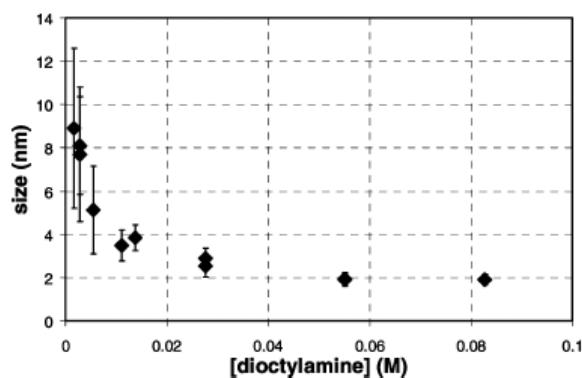
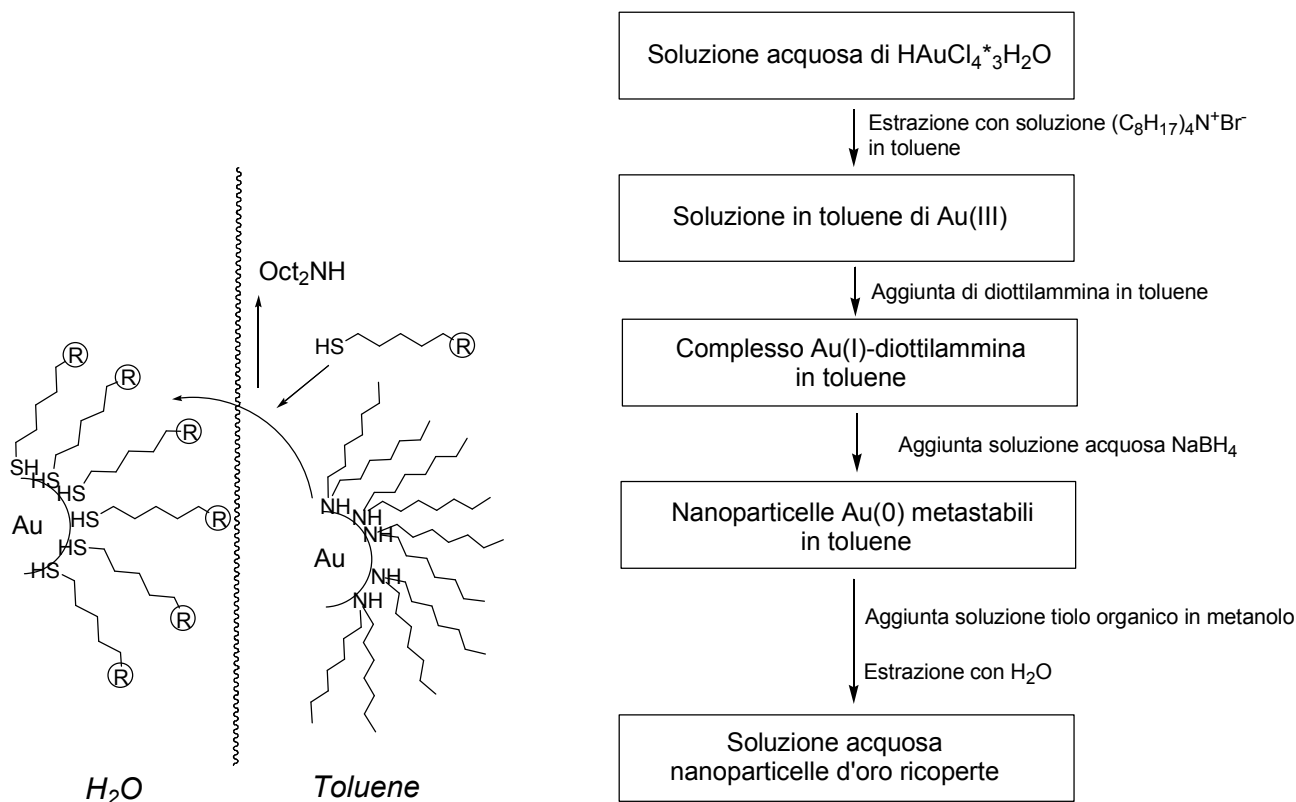


Figura 6.7 Dipendenza delle dimensioni dei Au-MPC in funzione della quantità di diottilammina aggiunta ($[\text{Au(III)}] = 2\text{mM}$) (da [77]).



Schema 6.2 Ricopertura dei nanocluster di Au con tioli organici. Procedura complessiva per la sintesi di Au-MPC.

Utilizzando miscele di diversi tioli si è visto, come verrà analizzato in seguito, che il rapporto dei componenti sulla nanoparticella rispecchia la composizione della miscela iniziale di reazione.

Per quanto riguarda i tioli organici per effettuare gli studi riguardo alla variazione della composizione sono stati scelti due diverse molecole con differenti ruoli: un tiolo (Tactn-tiolo, **35**) con un gruppo attivo dal punto di vista catalitico, e un tiolo (TEG-tiolo, **28**) che non interviene nella catalisi, ma che comunque fornisce solubilità in ambiente acquoso. Per il primo, dovendo studiare l'idrolisi di diesteri fosforici, è stato utilizzato il gruppo triazaciclononano, per il secondo è stato legato ad un tiolo organico un residuo di trietilenglicole (TEG). Il TEG, oltre a conferire la solubilità in acqua, ha la proprietà di rendere le nanoparticelle biocompatibili, prevenendo interazioni non specifiche con le biomolecole [70]. I due tioli devono possedere una struttura ed una lunghezza della catena simile, in modo da avere la medesima affinità per il nanocluster metallico e per formare un monolayer organico compatto ed uniforme. La lunghezza dei tioli deve essere tale da avvicinare spazialmente i gruppi funzionali, e sufficientemente lunga da allontanarli dal core metallico ed esporli al solvente, inoltre deve stabilizzare adeguatamente le nanoparticelle

impedendo la loro aggregazione. Sulla base anche dell'esperienza di precedenti studi [44] i due tioli scelti sono quelli riportati in figura 6.8.

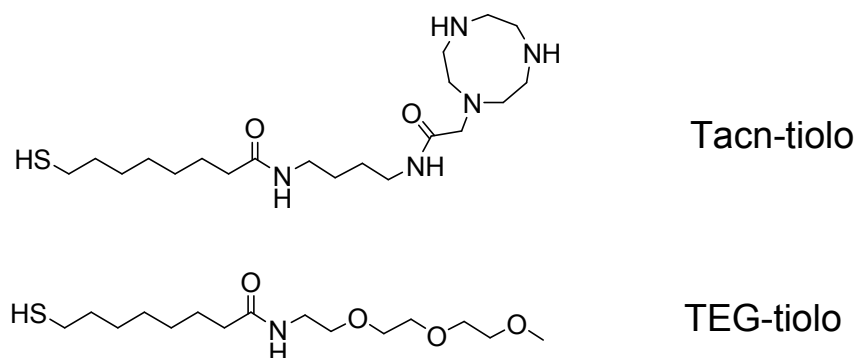
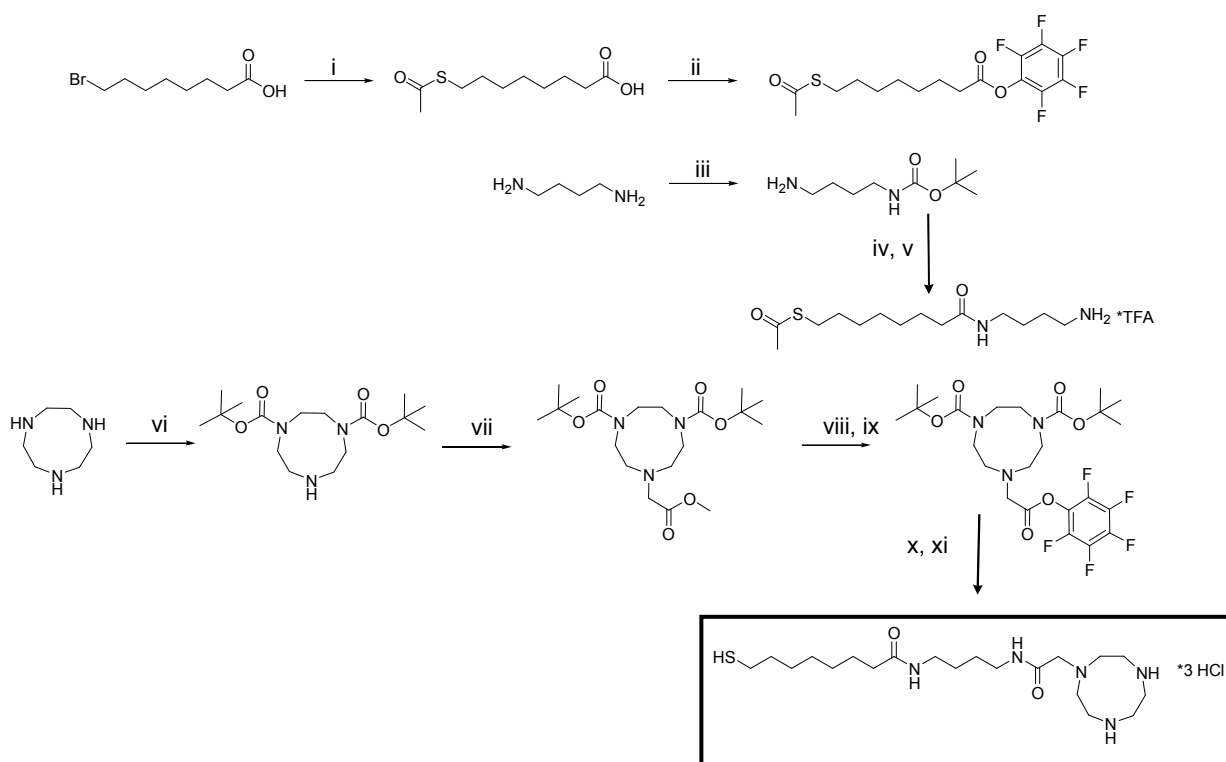


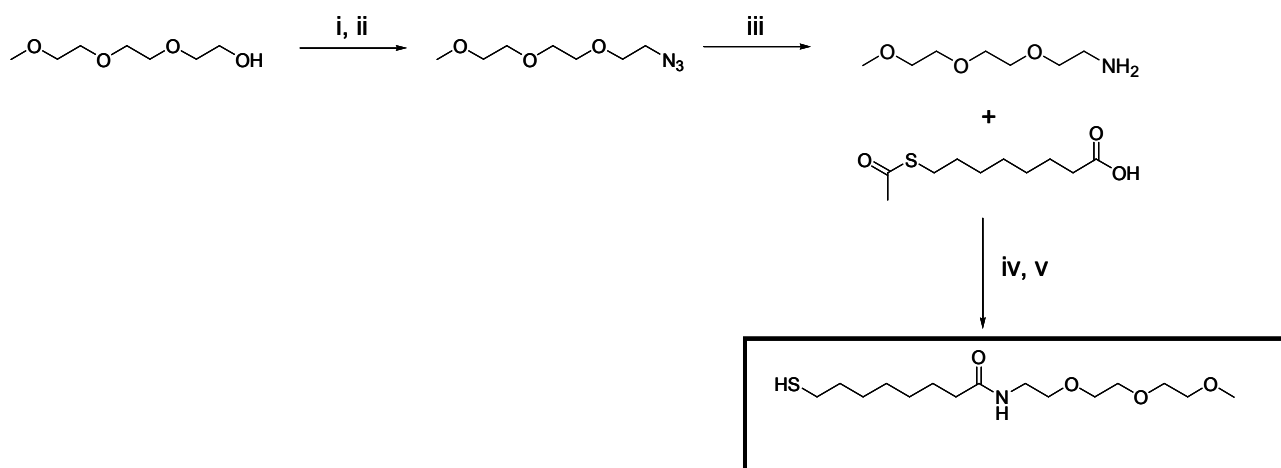
Figura 6.8 Tioli utilizzati per mixed Au-MPC



Schema 6.3 Sintesi Tacn-tiolo

i) CH_3COSH , Na, MeOH; ii) pentafluorofenolo, EDC, CH_2Cl_2 ; iii) Boc-anidride, K_2CO_3 , MeOH; iv) K_2CO_3 , CH_2Cl_2 ; v) CF_3COOH , CH_2Cl_2 ; vi) Boc-anidride, DBU, CHCl_3 ; vii) metil-Br-Acetato, K_2CO_3 , ACN; viii) LiOH, MeOH, H_2O ; ix) pentafluorofenolo, EDC, CH_2Cl_2 ; x) DMAP, DIPEA, CH_2Cl_2 ; xi) HCl 3M in MeOH

6 - NANOPARTICELLE D'ORO



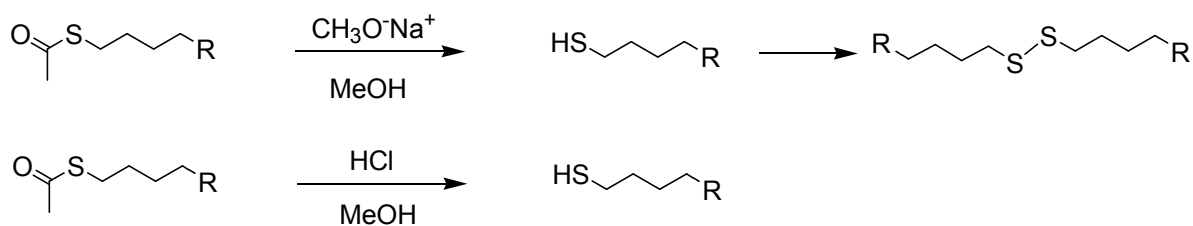
Schema 6.4 Sintesi TEG-tiolo

i) Tosil-Cl, trietilammina, CH₂Cl₂; ii) NaN₃, MeOH, H₂O; iii) PPh₃, THF; iv) HOBt, EDC, DIPEA, CH₂Cl₂; v) HCl 3M in MeOH.

Entrambe le molecole hanno in comune la parte vicina alla superficie metallica, composta da una catena alchilica di 8 carboni. Il tiolo all'estremità è stato introdotto come gruppo tioestere per reazione dell'acido tioacetico con l'acido 8-Br-ottanoico, la deprotezione a dare il tiolo libero è stata eseguita solo al termine della sintesi. Il Tacn-tiolo è stato sintetizzato per condensazione di tre frammenti: il derivato dell'acido ottanoico, l'1-4 diamminobutano e l'acido (2-diBoc-Tacn)acetico, la cui sintesi è già stata vista in precedenza. L'unione successiva di questi frammenti è avvenuta per coupling ammidico, mediante attivazione dell'acido per formazione dell'estere con il pentafluorofenolo.

Il TEG-tiolo è stato ottenuto per coupling ammidico (per attivazione con HOBt ed EDC) del frammento iniziale con un residuo di trietilenglicole recante un gruppo amminico. L'ammina è stata inserita a partire da un gruppo idrossilico: dopo aver formato il derivato tosilito, è stata effettuata una sostituzione nucleofila con sodio azide e una successiva riduzione con trifenilfosfina (reazione di Staudinger).

La deprotezione finale per idrolisi del tioestere può essere effettuata sia in condizioni basiche (in presenza di metilato di sodio) che in condizioni acide (schema 6.5), nel primo caso tuttavia i tioli si ossidano facilmente a dare i disolfuri, per cui è stata preferita l'idrolisi acida, che permette anche la deprotezione dei gruppi Boc del Tacn. La formazione collaterale dei disolfuri è infatti da evitare, anche perchè questi presentano una minore affinità nei confronti dell'oro, rendendo molto più difficile e lenta la ricopertura delle nanoparticelle metalliche.



Schema 6.5 Deprotezione tioestere.

Utilizzando le metodologie descritte sono state sintetizzate nanoparticelle d'oro dal diametro di circa 2 nm, che sono state funzionalizzate con miscele dei due tioli. Una soluzione dei nanocluster metastabili è stata divisa in vari batch, che sono stati ricoperti con diversi rapporti dei tioli (tabella 6.1), in tal modo ci siamo assicurati che le diverse nanoparticelle avessero le stesse caratteristiche del core metallico e differissero solo per la composizione del layer organico.

Tabella 6.1 Batch di nanoparticelle sintetizzati: rapporti tra i tioli utilizzati.

Batch	%TEG;	%Tacn
TEG	100	0
A ₁	95	5
A ₂	90	10
A	80	20
B	60	40
C	40	60
D	80	20
E	0	100

6.3 ANALISI DELLE NANOPARTICELLE

Le nanoparticelle d'oro protette dal monolayer di tioli sono state oggetto di analisi svolte con varie tecniche, allo scopo di valutare le caratteristiche sia della porzione metallica che di quella organica, in particolare per avere una misura quantitativa della composizione del monolayer.

6.3.1 ANALISI DI MICROSCOPIA TEM

I nanocluster sono stati analizzati mediante la tecnica di microscopia elettronica TEM grazie alla collaborazione del prof. Polizzi dell'Università di Venezia. Con questa metodologia è stato possibile visualizzare la componente inorganica e quindi poter misurare le dimensioni delle nanoparticelle. Dalle immagini ottenute si è visto che queste hanno dimensioni minori di quanto previsto, il loro diametro è, infatti, di circa 1.0– 1.5 nm, e che la loro distribuzione è abbastanza omogenea. A causa delle piccole dimensioni purtroppo le immagini ottenute non possiedono una grande definizione, per cui al momento non è possibile effettuare misurazioni più precise.

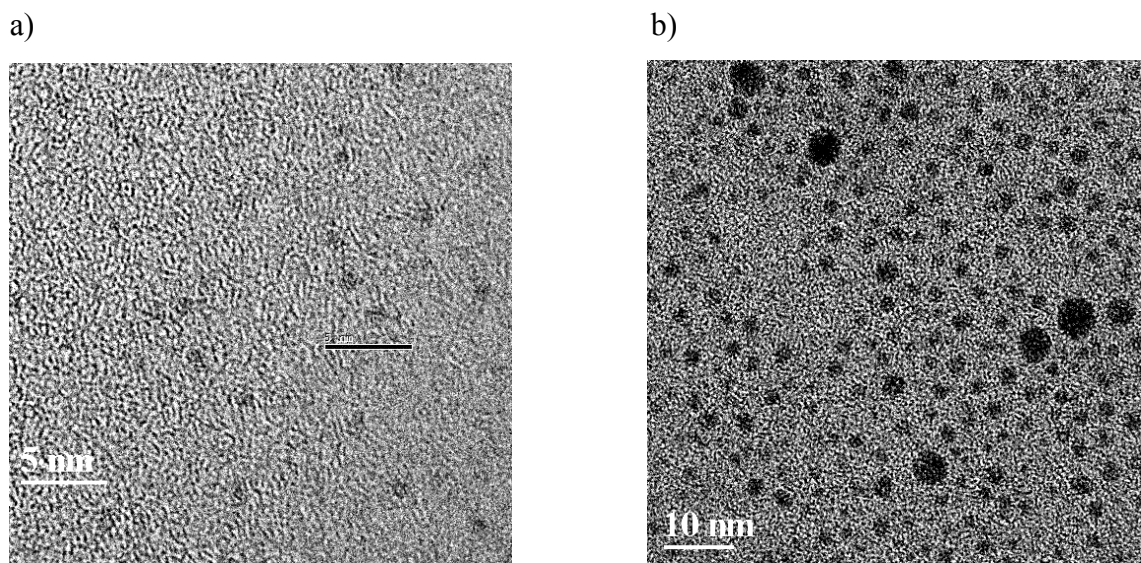


Figura 6.9 Immagine TEM a) del batch E; b) del batch B dopo 5 mesi, si nota la formazione di alcuni aggregati.

6.3.2 ANALISI TERMOGRAVIMETRICA

L'analisi termogravimetrica delle nanoparticelle, effettuata dal dott. V. Causin, ha permesso di misurare la percentuale in peso della frazione organica rispetto a quella del cluster metallico. Misurando la variazione del peso totale all'aumentare della temperatura si è visto una perdita di massa tra i 200 e i 400°C, in tale intervallo di temperatura si ha la decomposizione dei tioli organici,

per cui la massa persa corrisponde alla massa del monolayer (figura 6.10). Inoltre questi dati permettono di ricavare indirettamente il valore del diametro medio delle nanoparticelle. Per i nanocluster d'oro valgono infatti le seguenti formule [65]:

$$n^{\circ}(Au) = 283.7r^3$$

$$n^{\circ}(RSH) = 77.9r^2$$

Queste formule derivano dal fatto che mentre il n° di atomi di Au totale aumenta con il cubo del raggio, gli atomi di Au sulla superficie, ai quali si legano i tioli, aumentano con il quadrato. Questo comporta che diminuendo il diametro della nanoparticelle aumenta il rapporto tra atomi superficiali e atomi totali, e di conseguenza tra frazione organica e frazione metallica. Le frazioni di massa ottenute dalla TGA possono essere convertite in frazioni molari, da cui è possibile ricavare basandosi sulle equazioni precedenti il raggio delle nanoparticelle.

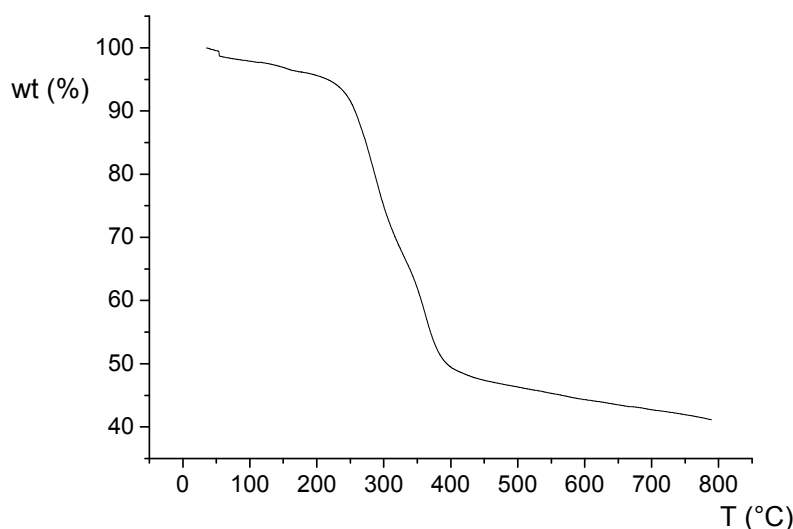


Figura 6.10 Analisi termogravimetrica relativa al batch D

Tabella 6.2 Risultati analisi termogravimetrica.

Batch di NP	PM medio RSH (g/mol)	massa % fr. organica	Ø (nm)
B	354	48	1.2
C	372	49	1.1
E	416	51	1.1

I valori ottenuti confermano le dimensioni ottenute dalle analisi TEM, e che quindi le nanoparticelle risultano particolarmente piccole. Inoltre il diametro risulta uguale per i vari batch a differente composizione, come atteso dal momento che i cluster metallici utilizzati sono gli stessi.

6.3.3 ANALISI NMR

L'analisi NMR delle nanoparticelle è di fondamentale importanza, in primo luogo per provare l'effettivo legame tra i tioli e le nanoparticelle, e poi per quantificare la composizione dei monolayer misti. Date le particolari caratteristiche di questi sistemi nanometrici le analisi sono state effettuate in differenti condizioni sperimentali.

1- ¹H-NMR

Per prima cosa le varie nanoparticelle sono state sciolte in metanolo deuterato e sono stati registrati gli spettri NMR secondo le modalità tradizionali. Il fatto che i tioli organici siano legati alle nanoparticelle provoca un notevole allargamento dei picchi rispetto ai tioli liberi, questo effetto è maggiore per i protoni che si trovano vicino alla superficie metallica (figura 6.12a). Una prima causa del fenomeno sta nella bassa velocità di diffusione delle nanoparticelle, inoltre i tioli all'interno del monolayer sono strettamente impaccati tra loro in modo ordinato, per cui la loro mobilità è bassa. Questo provoca l'accorciamento del tempo di rilassamento spin-spin T₂, con conseguente allargamento della riga spettrale. Un altro fattore ha origine dal fatto che i siti di legame sulla superficie del cluster metallico non sono equivalenti tra loro, per cui i tioli risentono di intorni chimici diversi, si ha quindi una distribuzione di chemical shift che provoca bande allargate anziché righe strette. Gli spettri ottenuti mostrano dei segnali relativi ai tioli allargati, a confermare che essi si sono legati alle nanoparticelle; vi sono inoltre dei segnali stretti relativi ad impurezze di diottilammina e di tetraottilammonio che non sono stati completamente eliminati con i lavaggi.

2- ¹H-NMR con gradiente di campo

Gli spettri sono stati inoltre registrati in seguito all'applicazione di un gradiente di campo, in modo da evidenziare solo i segnali delle molecole a diffusione lenta, e quindi solo di quelle legate alle nanoparticelle. La sequenza di impulsi (figura 6.11) prevede l'applicazione di un gradiente di campo magnetico in direzione longitudinale dapprima in un senso, e poi in quello contrario; nell'intervallo tra questi due impulsi viene inoltre fornito un impulso a 180° che per spin-echo rifocalizza la magnetizzazione trasversale. L'esperimento provoca la rifocalizzazione dei protoni che hanno diffusione lenta, mentre per le molecole più piccole, che tra i due impulsi a gradiente modificano la loro posizione, la magnetizzazione non viene rifocalizzata e quindi non viene registrata.

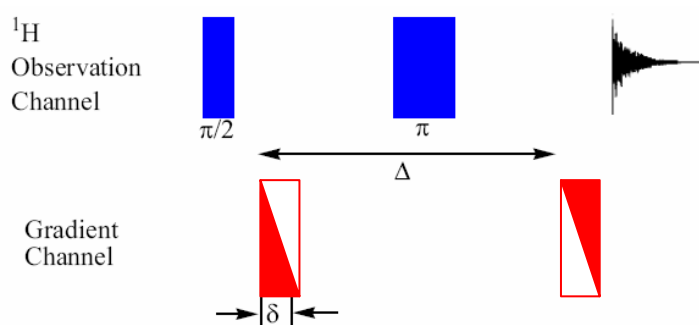


Figura 6.11 Sequenza di impulsi usata per analisi NMR in gradiente di campo.

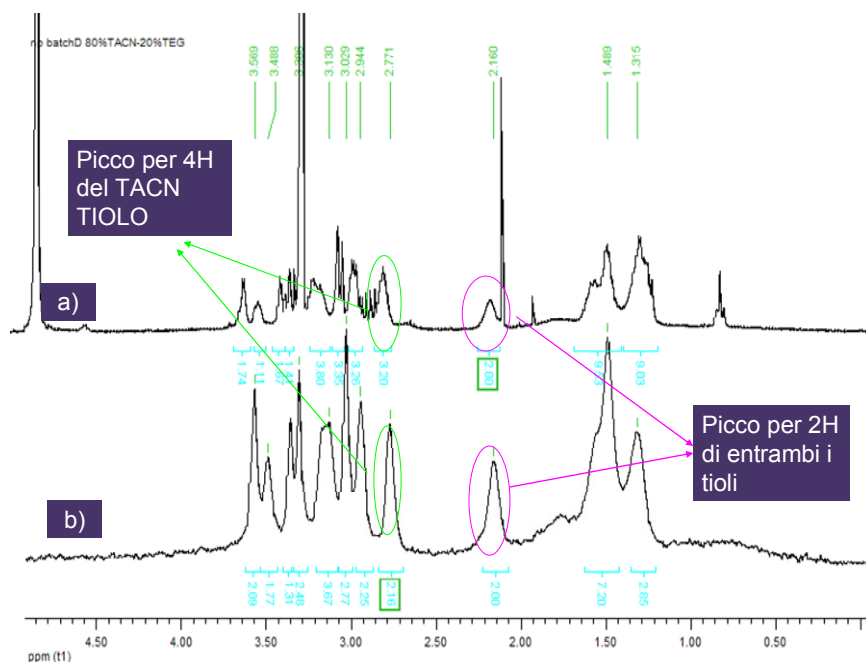
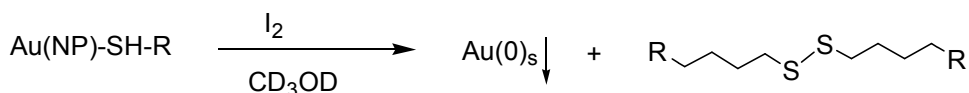


Figura 6.12 Analisi $^1\text{H-NMR}$ a) senza gradiente b) con gradiente di campo effettuate per il batch D (Metanolo- d_6 , 300 MHz, 25°C)

3- $^1\text{H-NMR}$ dopo reazione con I_2

Per ovviare all'allargamento di riga causato dalle nanoparticelle, gli spettri NMR sono stati registrati in seguito alla disgregazione dei cluster. Alle soluzioni nei tubi NMR sono stati aggiunte piccole quantità di iodio, che provoca la rottura del legame Au-S e la precipitazione del metallo come aggregato solido, inoltre si ha l'ossidazione dei tioli con la formazione di disolfuri. Gli spettri mostrano al contrario dei casi precedenti i segnali dei tioli come righe strette (figura 6.13).



Schema 6.6 Reazione nanoparticelle con iodio.

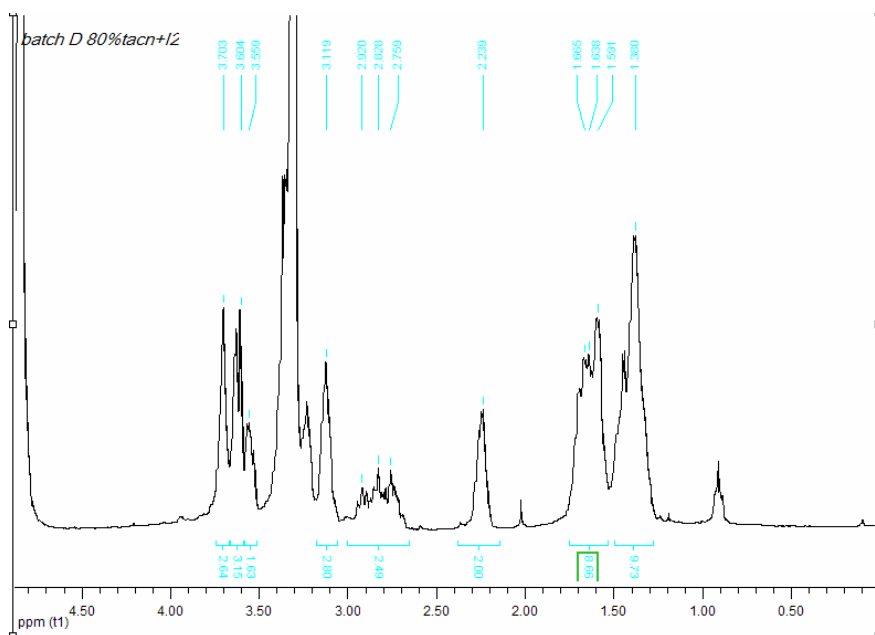


Figura 6.13 Spettro del Batch D a 24 ore dall'aggiunta di iodio. (Metanolo-d₆, 300 MHz, 25°C)

Per l'analisi quantitativa dei due tioli nei monolayer misti, sono stati individuati dei segnali caratteristici per ciascuna specie, che si trovassero in zone prive di interferenze e sovrapposizioni. Dalla misura dei loro integrali è stata ottenuta la composizione percentuale effettiva per ogni batch di nanoparticelle (per maggiori dettagli si veda la parte sperimentale). Il calcolo è stato effettuato sui tre diversi esperimenti effettuati, laddove potesse essere sufficientemente preciso, e dei valori ottenuti è stata fatta una media.

Le composizioni ottenute sono vicine a quelle delle miscele usate in fase di sintesi, questo indica la bontà della procedura per quanto riguarda il controllo della composizione del monolayer. Comunque la % di Tacn è un po' inferiore a quella attesa, il che sembra indicare una certa preferenza per il TEG-tiolo, forse perchè esso permette un migliore impaccamento del monolayer.

Tabella 6.3 Percentuali di ricopertura con Tacn-tiolo calcolate da NMR.

NP	% Tacn attesa	% Tacn (NMR)	% Tacn (NMR grad.)	% Tacn (NMR I ₂)	% Tacn media
A ₁	5	--	4	5	5
A ₂	10	--	9	10	10
A	20	20	15	15	17
B	40	--	40	34	37
C	60	52	60	51	54
D	80	77	79	71	75

6.3.4 ANALISI UV-VIS

Per i successivi esperimenti cinetici per ogni batch di nanoparticelle è stata preparata una soluzione madre in H₂O. Di queste soluzioni è stato misurato lo spettro UV-VIS tra 200 e 650 nm; si vede come vi sia una forte assorbanza tra 200 e 300 nm dovuta ai nanocluster di oro (figura 6.14). Inoltre non compare la banda a 520 nm relativa alla risonanza plasmonica di superficie: questo indica che le nanoparticelle hanno dimensioni inferiori ai 2 nm e che non hanno aggregato a dare colloidali di dimensioni maggiori.

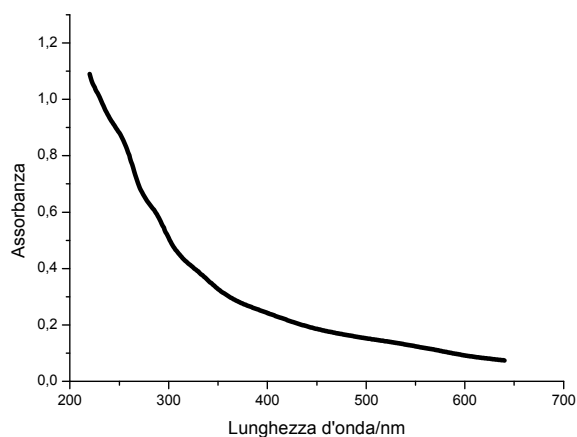


Figura 6.14 Spettro di assorbimento registrato per il campione A₁ (9.2 mg sciolti in 2 ml H₂O, diluito 33 volte).

Per ogni soluzione è stata misurata la concentrazione di gruppi triazaciclononano presenti, mediante titolazione spettrofotometrica con Cu(II). Il rame forma infatti un complesso stabile 1:1 con il Tacn che assorbe a 264 nm ($\epsilon = 7800 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, mentre per in Cu²⁺ non complessato $\epsilon = 800 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Per poter misurare l'assorbanza del complesso, in presenza dell'assorbanza del nanocluster nella stessa regione, la titolazione è stata effettuata usando come bianco la stessa soluzione di NP.

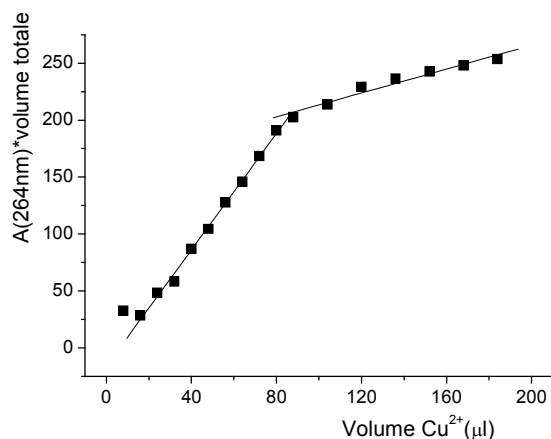
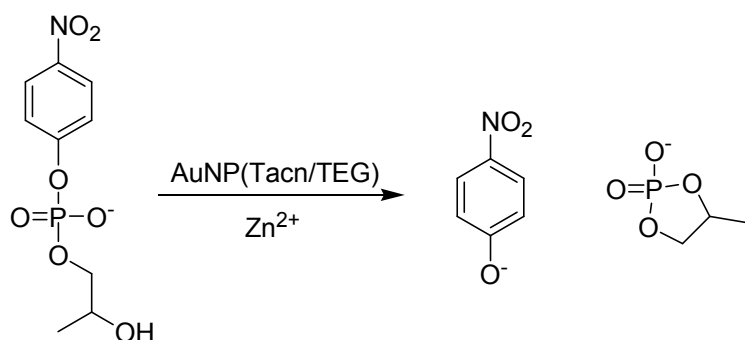


Figura 6.15 Titolazione per il batch E: A(264 nm) all'aggiunta di Cu²⁺.

I valori di concentrazione di Tacn ottenuti per titolazione, corrispondono a quelli attesi sulla base della quantità di nanoparticelle in soluzione (ottenibile dall'assorbanza propria del cluster) e la % di Tacn ricavata dall'analisi NMR; questo è una conferma e una verifica dell'attendibilità delle analisi (vedi tabella 6.8 in cap 6.7).

6.4 STUDI CATALITICI

Una volta caratterizzate le diverse nanoparticelle, sono stati svolti vari esperimenti di catalisi, con l'aggiunta di Zn(II) e utilizzando come substrato l'HPNPP; le condizioni utilizzate sono state uguali a quelle utilizzate in precedenza per i dendrimeri. Questo ha permesso di confrontare direttamente l'efficacia catalitica dei due sistemi multivalenti. Anche in questo caso inoltre gli esperimenti sono stati effettuati mantenendo fissa la concentrazione di gruppo attivo Tacn, in modo da valutare direttamente l'effetto sulla catalisi della variazione della composizione del monolayer. Gli esperimenti sono stati svolti in soluzione acquosa tamponata a pH 7.5, a 40°C, in condizioni di eccesso di substrato ([Tacn] = 20 μM, [HPNPP] = 200 μM).



Schema 6.7 Idrolisi di HPNPP catalizzata da Au-MPC.

6.4.1 CINETICHE AL VARIARE DELLA CONCENTRAZIONE DI Zn(II)

Come primo studio sono state misurate le velocità iniziali di idrolisi al variare della quantità di ioni Zn^{2+} presenti.

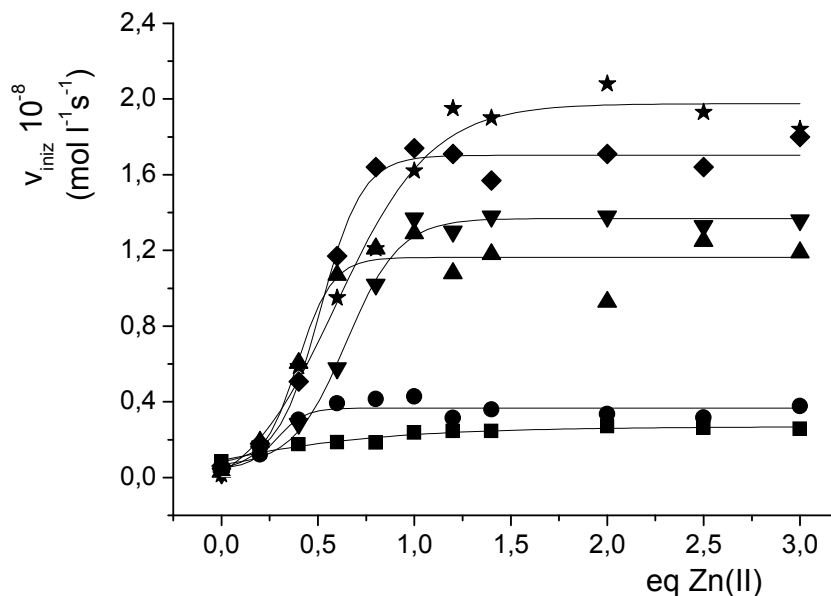


Figura 6.16 Velocità iniziali in funzione degli equivalenti di Zn(II) aggiunti, per i vari batch: ■ Tacn 5%, ● Tacn 20%, ▲ Tacn 40%, ▼ Tacn 60%, ◆ Tacn 80%, ★ Tacn 100%. [Tacn]= $2 \cdot 10^{-5}$ M, [HPNP]= $2 \cdot 10^{-4}$ M, $[Zn^{2+}] = 0 - 6 \cdot 10^{-5}$ M, [HEPES]= $1 \cdot 10^{-2}$ M, pH=7.5, T= 40°C. Le curve rappresentano il fitting con una funzione sigmoide per i dati presentati.

I grafici mostrano un aumento fino ad un equivalente di Zn(II), dopodiché la velocità di idrolisi rimane costante (figura 6.16), questi dati confermano quindi la concentrazione di Tacn ottenuta per titolazione con Cu(II). L'andamento delle curve è di tipo sigmoide, il che indica un comportamento cooperativo tra i complessi metallici. Le diverse composizioni delle nanoparticelle danno origine ad attività catalitiche diverse, al crescere della percentuale di gruppo attivo nel monolayer, la velocità aumenta, anche a parità di concentrazione totale. Questo sembra rispecchiare quanto già osservato per i dendrimeri a funzionalizzazione mista, tuttavia, ponendo in grafico le costanti catalitiche ad 1 eq. di ione metallico in funzione della percentuale di Tacn, si osserva che l'aumento non è uniforme: dopo il 40% di Tacn la capacità catalitica varia infatti di poco (figura 6.17).

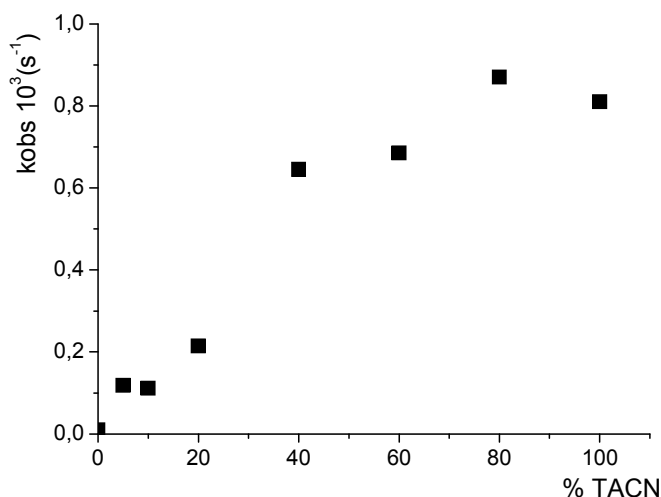


Figura 6.17 Costanti di velocità per 1 equivalente di Zn in funzione della % di Tacn nelle diverse NP.

6.4.2 CINETICHE AL VARIARE DELLA CONCENTRAZIONE DEL SUBSTRATO

Per studiare in maniera più approfondita la variazione dei parametri catalitici, sono stati eseguiti degli esperimenti di catalisi fissando la concentrazione di catalizzatore e aumentando la quantità del substrato, ricavando in tal modo i grafici di saturazione di Michaelis-Menten (figura 6.18).

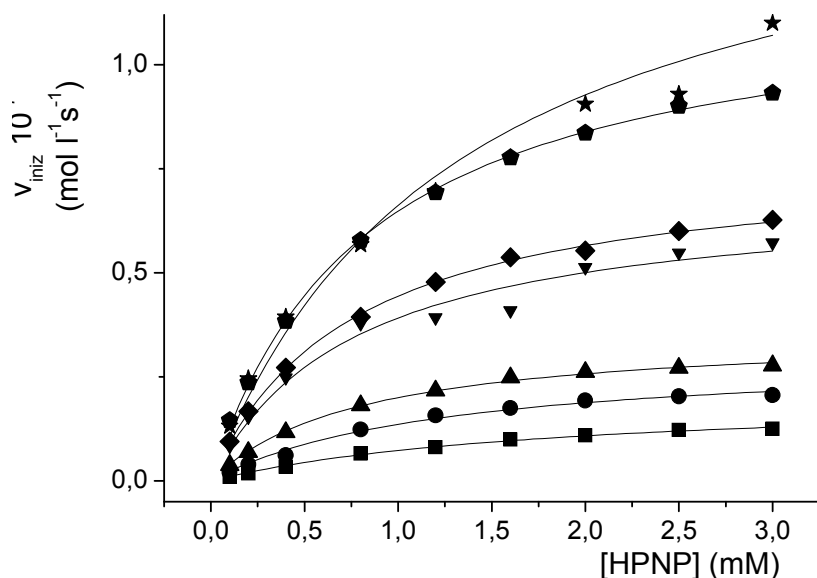


Figura 6.18 Velocità iniziale della reazione catalizzata in funzione della concentrazione di HPNP: ■ Tacn 5%, ● Tacn 10%, ▲ Tacn 20%, ▼ Tacn 40%, ◆ Tacn 60%, ◈ Tacn 80%, ★ Tacn 100%. [Tacn]= $2 \cdot 10^{-5}$ M, [HPNP]= $1 \cdot 10^{-4}$ - $3 \cdot 10^{-3}$ M, $[Zn^{2+}] = 2 \cdot 10^{-5}$ M, [HEPES]= $1 \cdot 10^{-2}$ M, pH=7.5, T= 40°C. Le curve rappresentano il fitting con l'equazione di Michaelis-Menten per i dati presentati.

Le dati ottenuti sono ben interpolati dall'equazione di Michaelis-Menten, le nanoparticelle presentano quindi un andamento a saturazione, in modo simile alla catalisi enzimatica, si può quindi

affermare che sono dei sistemi biomimetici. Dal fitting dei dati sono stati ricavati per ogni batch le costanti k_{cat} e K_M , ed è stata analizzata la loro variazione al variare della composizione (tabella 6.4).

Tabella 6.4 Parametri catalitici di Michaelis-Menten per Au-MPC a diverse % di Tacn-tiolo.

Batch NP	% Tacn	$k_{cat} 10^{-3}$ (s ⁻¹)	$K_M 10^{-3}$ (mol l ⁻¹)	k_{cat}/K_M (l mol ⁻¹ s ⁻¹)	$k_{cat}/k_{unecat}^a 10^3$
A1	5	1.0 ± 0.1	1.8 ± 0.3	0.58 ± 0.17	2.9
A2	10	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.2	6.1
A	17	1.8 ± 0.1	0.80 ± 0.04	2.2 ± 0.1	11.0
B	37	4.2 ± 0.6	0.82 ± 0.31	5.1 ± 2.6	25.7
C	54	5.2 ± 0.3	1.1 ± 0.1	4.8 ± 0.7	24.0
D	75	8.2 ± 0.3	1.2 ± 0.2	6.6 ± 1.1	33.0
E	100	7.0 ± 0.6	0.96 ± 0.16	7.3 ± 1.7	36.2
TEG	0	Non ha attività, per cui non si calcolano i parametri per esso.			

a = tale costante, calcolata eseguendo lo stesso esperimento senza NP, è pari a $2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ [43].

I valori delle costanti catalitiche ottenuti mostrano che le nanoparticelle presentano una notevole attività, esse, infatti, risultano più di un ordine di grandezza più attive rispetto agli analoghi sistemi dendrimerici ($k_{cat}=4.9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ per il dendrimero con maggior grado di funzionalizzazione con Tacn), la loro efficacia catalitica è tra le più alte riportate per tale tipo di reazione [57].

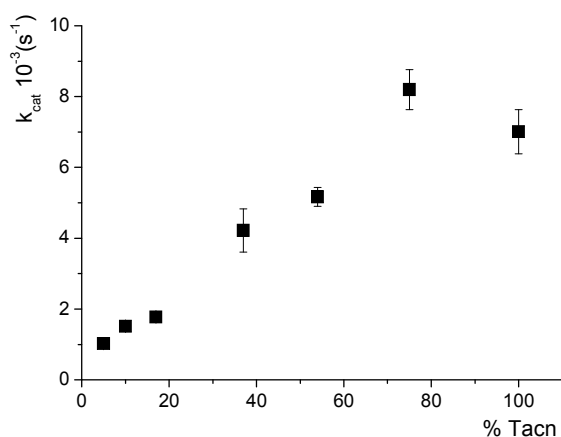


Figura 6.19 k_{cat} in funzione della percentuale di Tacn nel monolayer.

Il grafico (figura 6.19) mette in evidenza come la costante catalitica del primo ordine k_{cat} aumenti in maniera abbastanza lineare all'aumentare della percentuale di Tacn nel SAM, nonostante gli

esperimenti siano condotti ad una concentrazione di Tacn costante. Tuttavia non si osserva come ci si potrebbe attendere un crollo a percentuali basse, ma anche al 10 e 5% si ha una buona attività catalitica.

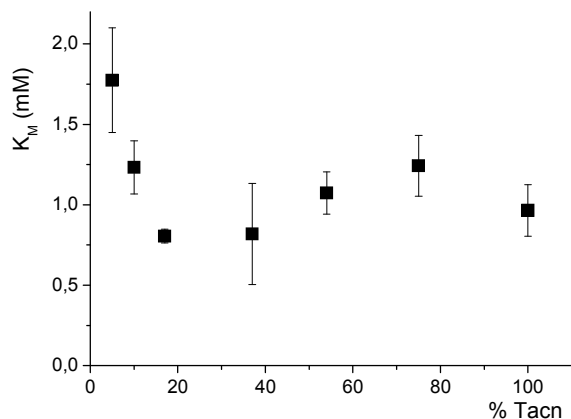


Figura 6.20 K_M in funzione della percentuale di Tacn nel monolayer.

Per quanto riguarda la costante K_M , si osserva un'iniziale diminuzione fino al 20%, in seguito il valore rimane pressoché costante intorno ai 0.8 - 1.0 mmol^{-1} (figura 6.20). Questo indica che già al 20% di Tacn nel monolayer il sistema catalitico raggiunge la sua massima affinità per il substrato e l'ulteriore aumento di Tacn non apporta miglioramenti alla capacità di binding.

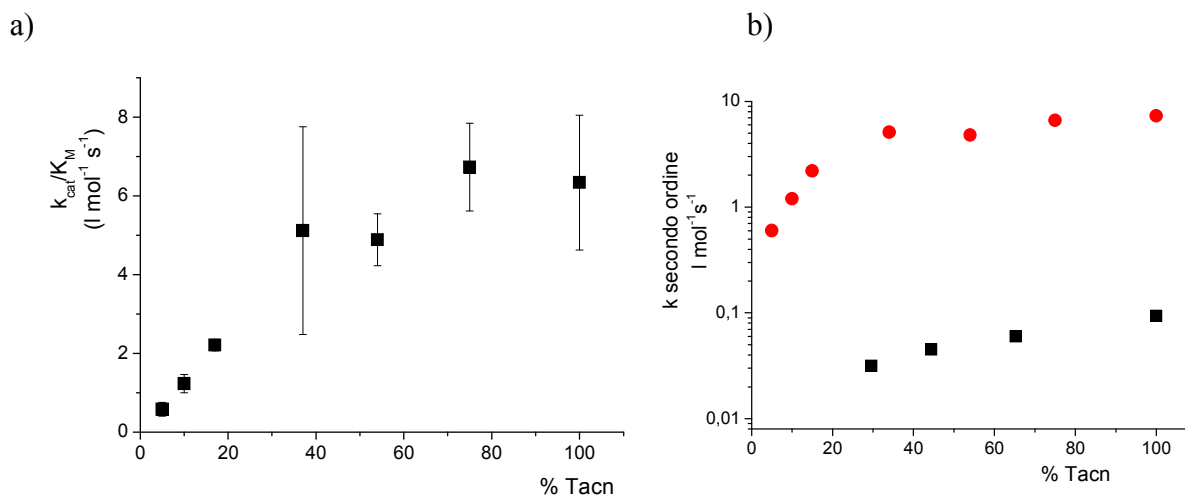


Figura 6.21 a) Efficacia catalitica k_{cat}/K_M in funzione della % di Tacn b) confronto tra le costanti di secondo ordine per nanoparticelle (●) e dendrimeri D-8 (■).

Unendo gli effetti dei due parametri nell'efficacia catalitica k_{cat}/K_M , si vede come, dopo un iniziale aumento di tipo lineare, a partire dal 40% di Tacn il valore rimanga praticamente costante (Figura 6.21a). Il confronto su scala logaritmica con le costanti del secondo ordine misurate per i dendrimeri permette di apprezzare l'elevata capacità catalitica delle nanoparticelle che risultano quasi 100 volte più attive (figura 6.21b). Inoltre si vede come l'andamento dei due sistemi al variare

della composizione sia differente, in particolare le nanoparticelle anche a percentuali di Tacn molto basse mantengono un'elevata efficacia catalitica.

Per verificare la stabilità nel tempo dei sistemi colloidali e la possibilità di riorganizzazioni dei tioli all'interno del monolayer organico gli esperimenti sono stati ripetuti a distanza di 20 giorni. I valori misurati, nel limite degli errori sperimentali, sono uguali ai precedenti, per cui le nanoparticelle possono essere considerate stabili nel lasso di tempo considerato, e si possono escludere modificazioni della loro struttura.

I dati ricavati sembrano indicare che la distribuzione dei tioli nei self-assembly monolayer misti non sia di tipo casuale, la formazione di cluster di tioli dello stesso tipo spiegherebbe infatti la costanza di K_M al di sopra del 20% di Tacn; questo significa che la concentrazione di siti di binding rimane costante, il che è in disaccordo con una distribuzione di tipo statistico. Inoltre la formazione di domini permette, a parità di unità di Tacn presenti, la formazione di un maggior numero di siti attivi bimetallici; questo spiegherebbe l'elevata attività delle nanoparticelle già a basse % di Tacn. Il modello a domini tuttavia prevedrebbe una k_{cat} costante, a causare le differenze tra i vari batch potrebbe essere un effetto di confine: domini piccoli hanno un maggior numero di tioli di confine, che danno meno interazioni catalitiche, rispetto ai domini di maggiori dimensioni (figura 6.22).

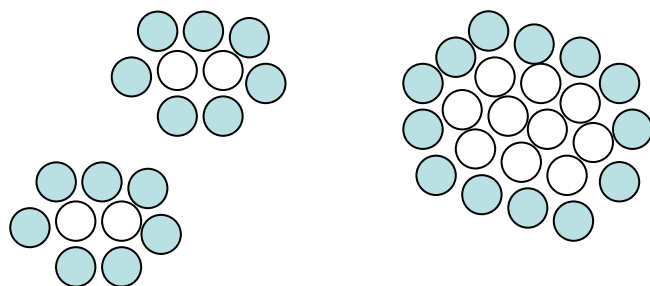


Figura 6.22 Effetto di confine al variare della dimensione dei domini.

Il comportamento delle nanoparticelle potrebbe però anche essere dovuto all'intervento di altri fattori nel meccanismo catalitico. Potrebbe esserci ad esempio un ruolo del TEG nel binding del substrato o nella catalisi: coordinando H_2O o OH^- potrebbe sostituirsi ad una seconda unità metallica. Tuttavia in studi precedenti [44] su sistemi simili, in cui il TEG era sostituito da un semplice alchiltiolo le costanti catalitiche ottenute erano simili. Quindi probabilmente la matrice organica stessa interagisce con la parte idrofobica del substrato, aumentando la concentrazione

locale dello stesso, favorendo quindi l'attacco idrofobico, in modo analogo a quanto avviene nei sistemi micellari.

Prima di formulare ipotesi più precise quindi sono stati effettuati ulteriori esperimenti per una migliore comprensione del sistema.

6.4.3 CINETICHE VARIANDO IL RAPPORTO TACN/Zn A Zn COSTANTE

Lo studio è proseguito realizzando un esperimento analogo a quanto fatto in precedenza con i dendrimeri. Diverse distribuzioni del sito attivo sulle nanoparticelle sono state realizzate mantenendo fissa la concentrazione di Zn^{2+} e variando la quantità di nanoparticelle funzionalizzate al 100% con Tacn. In tal modo si hanno diversi rapporti tra legante e ione metallico, che si distribuirà su una quantità via via maggiore di nanoparticelle. Si ipotizza che la distribuzione in questo modo sia di tipo statistico e quindi sarà di utile confronto con i dati precedenti.

Per ogni rapporto Zn(II)/Tacn sono stati ricavati i grafici di saturazione (figura 6.23) e dal fitting con l'equazione di Michaelis-Menten sono stati ricavati i parametri catalitici (tabella 6.5).

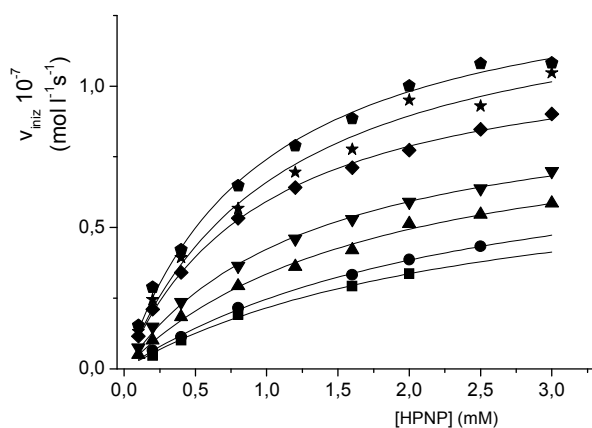


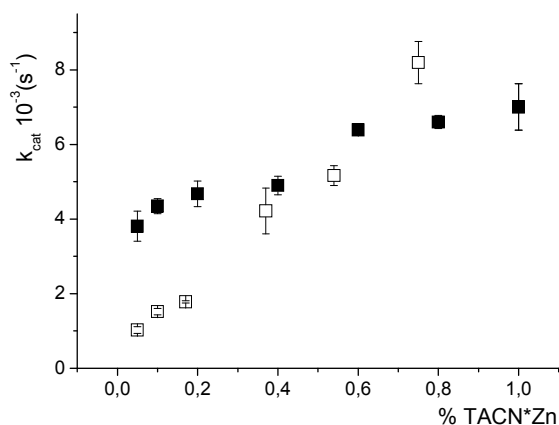
Figura 6.23 Velocità iniziale della reazione catalizzata in funzione della concentrazione di HPNPP: ■ Zn/Tacn = 0.05, ● Zn/Tacn = 0.1, ▲ Zn/Tacn = 0.2, ▼ Zn/Tacn = 0.4, ◆ Zn/Tacn = 0.6, ◆ Zn/Tacn = 0.8, ★ Zn/Tacn = 1. [Tacn] = $0.2 - 4 \cdot 10^{-4}$ M, [HPNPP] = $0.1 - 3 \cdot 10^{-3}$ M, $[Zn^{2+}] = 2 \cdot 10^{-5}$ M, [HEPES] = $1 \cdot 10^{-2}$ M, pH=7.5, T= 40°C. Le curve rappresentano il fitting con l'equazione di Michaelis-Menten per i dati presentati.

Tabella 6.5 Parametri catalitici di Michaelis-Menten per Au-MPC (100% Tacn-tiolo) a diversi rapporti Zn/Tacn.

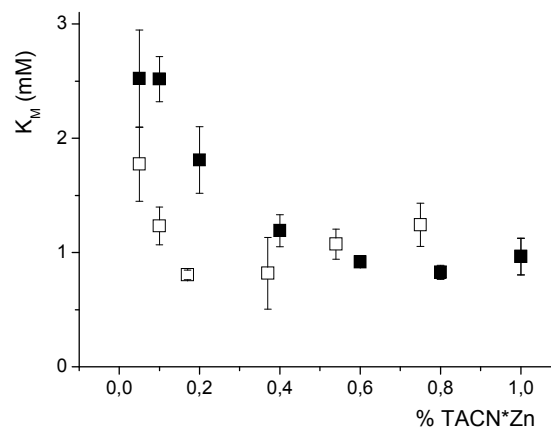
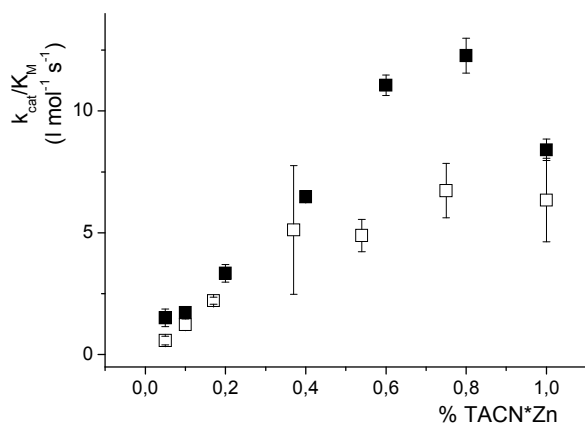
Rapporto Zn/Tacn	$k_{cat} 10^{-3}$ (s^{-1})	$K_M 10^{-3}$ ($mol\ l^{-1}$)	k_{cat}/K_M ($l\ mol^{-1}\ s^{-1}$)	$k_{cat}/k_{uncat}^a 10^3$
0.05	3.8 ± 0.4	2.5 ± 0.4	1.5 ± 0.4	19
0.1	4.3 ± 0.2	2.5 ± 0.2	1.7 ± 0.2	21.7
0.2	4.7 ± 0.3	1.8 ± 0.3	2.6 ± 0.4	23.3
0.4	4.9 ± 0.2	1.2 ± 0.1	4.1 ± 0.7	24.5
0.6	6.4 ± 0.1	0.92 ± 0.05	6.9 ± 0.4	31.9
0.8	6.6 ± 0.2	0.83 ± 0.06	8.0 ± 0.7	33.0
1	7.0 ± 0.6	0.96 ± 0.16	7.3 ± 0.9	35.0

a = tale costante, calcolata eseguendo lo stesso esperimento senza NP, è pari a $2 \cdot 10^{-7} s^{-1}$ [43].

a)



b)

**Figura 6.24** a) k_{cat} e b) K_M in funzione del rapporto Zn^{2+} -Tacn (■) e confronto con NP Tacn/TEG (□).**Figura 6.25** k_{cat}/K_M in funzione del rapporto Zn^{2+} -Tacn (■) e confronto con NP Tacn/TEG (□).

Le costanti ricavate sono state confrontate con quelle relative alle nanoparticelle miste Tacn/TEG. Riguardo alla k_{cat} si vede che i valori aumentano al crescere del rapporto Zn/Tacn, ma di poco (la variazione è solo da 4 a $7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), e rispetto al sistema precedente l'attività a bassi rapporti è molto più elevata (figura 6.24a).

La K_M invece decresce in modo uniforme e a bassi rapporti è maggiore, anche se non di molto, rispetto alle NP Tacn/TEG (figura 6.24b). Come risultato l'efficacia catalitica aumenta in maniera lineare, ma non si discosta molto dall'altro esperimento, specie a bassi rapporti di gruppo attivo, dove anzi è maggiore (figura 6.25).

I dati ottenuti, in particolare quelli della k_{cat} , sono difficilmente spiegabili assumendo una semplice catalisi bimetallica in presenza di una distribuzione casuale. D'altra parte ci sembra improbabile che gli ioni metallici si distribuiscano in cluster sulle nanoparticelle, in ogni caso questo non chiarirebbe del tutto perchè la k_{cat} sia maggiore rispetto al sistema Tacn/TEG per cui abbiamo ipotizzato una distribuzione a domini. Un'ipotesi più sostenibile, alla luce dei dati sperimentali, è che si instauri un altro meccanismo catalitico, per cui anche il singolo ione metallico assuma un'attività catalitica.

Il ruolo del secondo ione metallico potrebbe essere assunto dalle ammine protonate di un triazaciclononano non legante posto vicino, queste potrebbero interagire con la carica negativa del fosfato o intervenire in un meccanismo acido-base (figura 6.26). Questo effetto, che non era stato evidenziato nei dendrimeri, potrebbe essere favorito nelle nanoparticelle da una maggiore vicinanza tra i gruppi funzionali, e dalla presenza di un layer organico di tipo idrofobico.

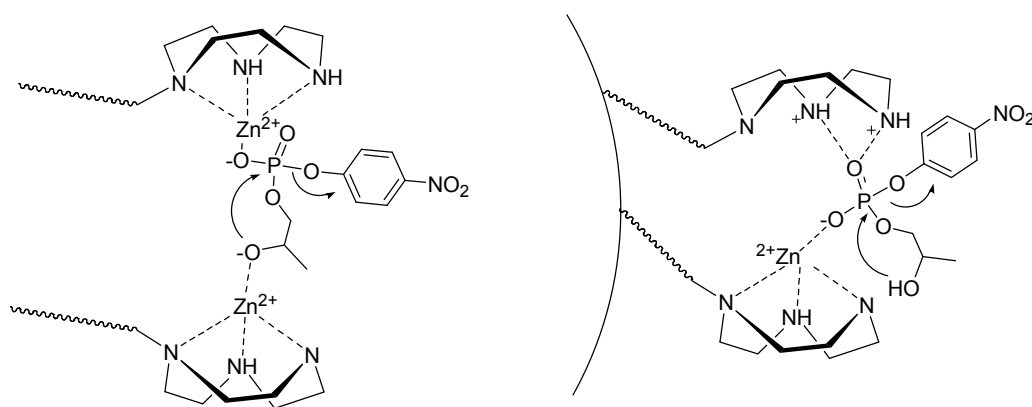
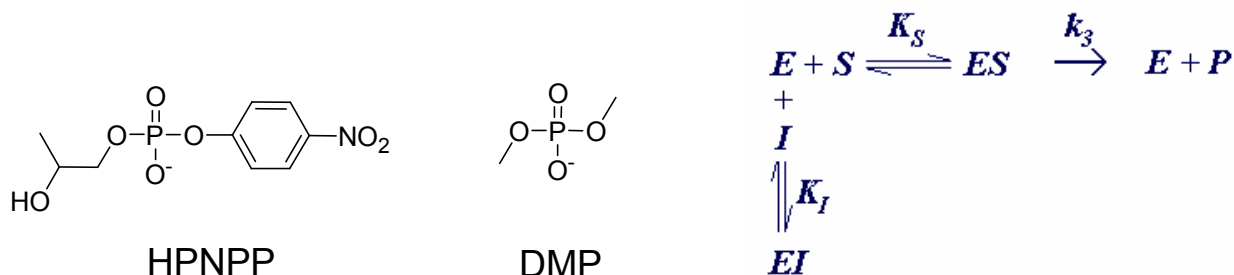


Figura 6.26 Possibili meccanismi per l'idrolisi dell'HPNPP.

6.4.4 CINETICHE DI INIBIZIONE CON DIMETILFOSFATO

Il dimetil fosfato (DMP) è un inibitore reversibile nei confronti dell'idrolisi dell'HPNPP, esso compete con il substrato nell'occupazione del sito attivo del catalizzatore. Per studiare l'affinità del substrato per il catalizzatore sono stati effettuati degli esperimenti catalitici utilizzando le NP(100% Tacn) aumentando la quantità di DMP presente, e misurando il conseguente calo della velocità di idrolisi dell'HPNPP.



Schema 6.8 Inibizione da parte del dimetilfosfato.

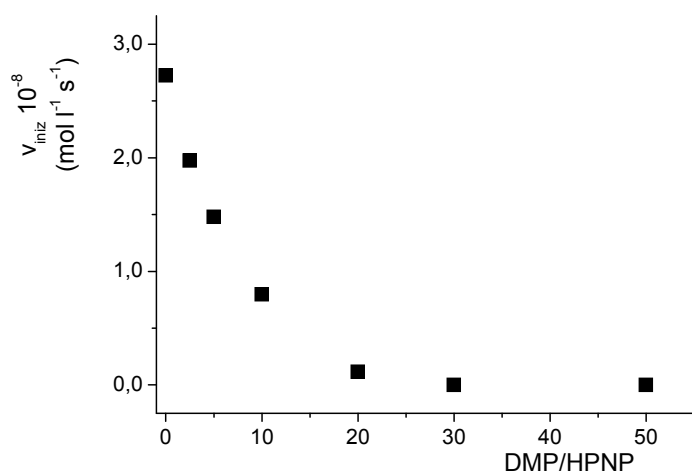


Figura 6.27 Velocità iniziali in presenza di dimetilfosfato per NP(100% Tacn): [HPNPP]= $2 \cdot 10^{-4}$ M, [DMP]= $0 - 1 \cdot 10^{-2}$ M, [Tacn]= $2 \cdot 10^{-5}$ M, [Zn²⁺]= $2 \cdot 10^{-5}$ M, [HEPES]= $1 \cdot 10^{-2}$ M, pH= 7.5, T= 40°C.

Come si vede dai dati per inibire quasi del tutto l'idrolisi dell'HPNPP è necessario un eccesso di 20 volte del dimetilfosfato, ciò significa che l'HPNPP ha un'affinità molto superiore per il catalizzatore (figura 6.27). Dal momento che entrambi sono fosfati monocarichi, la causa è da imputarsi alla maggiore idrofobicità dell'HPNPP che gli permette di interagire con il layer organico della nanoparticella. Questo è una conferma del ruolo che può assumere nella catalisi lo strato organico dei nanocluster e può spiegare la K_M inferiore rispetto a quella ricavata per i dendrimeri.

6.5 CONCLUSIONI

I nostri studi sulle nanoparticelle funzionalizzate hanno portato a risultati sicuramente interessanti. Per prima cosa la metodologia di sintesi e la successiva derivatizzazione dei nanocluster d'oro si è rivelata adatta a questo tipo di studi: oltre ad essere semplice da un punto di vista pratico, ha permesso di ottenere nanoparticelle con la composizione del monolayer desiderata. Usando miscele di tioli infatti il loro rapporto sulla superficie del cluster corrisponde a quello usato per la sintesi.

Dal punto di vista delle proprietà catalitiche le nostre nanoparticelle si sono dimostrate ottimi catalizzatori per l'idrolisi dell'HPNPP. Questa elevata reattività è da imputarsi alla struttura del monolayer che permette interazioni cooperative ottimali tra i gruppi funzionali. Inoltre la loro efficacia catalitica è risultata elevata anche a basse percentuali di unità attiva nel monolayer, questo sembra indicare una distribuzione a domini dei tioli nei Au-MPC misti. Gli esperimenti non escludono comunque la presenza di altri effetti dovuti al monolayer organico, per cui ulteriori esperimenti saranno sicuramente utili.

Nel prossimo futuro sarà poi nostro interesse studiare l'azione di queste nanoparticelle nei confronti del DNA e dell'RNA, sia per il binding, sia per l'idrolisi; per la multivalenza delle nanoparticelle e per la natura polimerica del substrato ci attendiamo infatti interazioni molto forti.

6.6 PARTE SPERIMENTALE

Reagenti e solventi

I reagenti e i solventi commerciali (Aldrich, Fluka, Acros, Iris Biotech) sono stati utilizzati senza particolari purificazioni.

Strumentazione

NMR, ESI-MS, UV-VIS, esperimenti cinetici: vedi capitolo 2.5

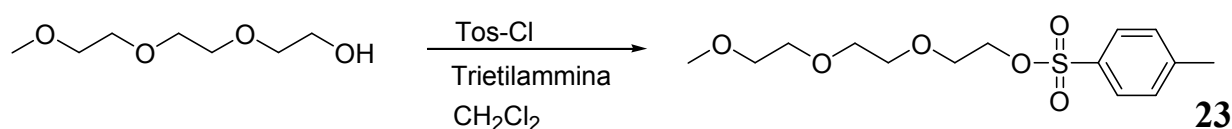
IR: gli spettri sono stati misurati utilizzando un FT-IR Thermo Nicolet 5700.

Analisi TEM : gli spettri TEM ad alta risoluzione sono stati acquisiti dal prof. Stefano Polizzi dell'Università di Venezia, presso il dipartimento di Chimica Industriale per mezzo di uno strumento Jeol 3010 operante a 300 kV, dotato di detector CCD slow scan Gatan 794.

Termogravimetria: le misure sono state effettuate dal Dott. Valerio Causin, utilizzando uno strumento SDT 2960 modello TA. La temperatura è stata variata da 30 a 800 °C con una rampa di 20 °C/min sotto N₂.

6.6.1 SINTESI TEG-TIOLO

2-[2-(2-Metossietossi)-etossi]-1-etil-p-toluensolfonato (23)



10 ml di trietilenglicole monometil etero (63 mmoli) sono stati sciolti in 20 ml di trietilammina, e sono stati aggiunti goccia a goccia a 12,0 g di tosil cloruro (63 mmoli, 1 eq) sciolti in 20 ml di diclorometano anidro. La reazione è proseguita per 18 h sotto N₂. TLC: SiO₂ (etere di petrolio / acetato di etile 1:1) Rf: 0.7 (UV, Tos-Cl), 0.3 (UV + Blue shift, prodotto), 0.1 (Blue shift, TEG-OH). La soluzione è stata lavata 2x20 ml HCl 6M, 2x10 ml NaHCO₃ 5%, 2x10 ml H₂O, anidrificata con Na₂SO₄ ed evaporata. Sono stati ottenuti 14.84 g di prodotto sotto forma di olio giallo (resa 75 %).

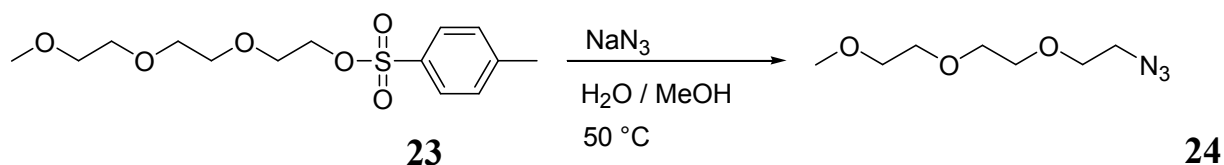
6 - NANOPARTICELLE D'ORO

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 7.82-7.34 (m, 4H, C_6H_4); 4.16 (t, 2H, CH_2SO_2); 3.68 (t, 2H, Tos-O- CH_2); 3.62-3.51 (m, 8H, O- CH_2); 3.37 (s, 3H, O- CH_3); 2.45 (s, 3H, Ph- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.9 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 143.86, 131.92, 128.86, 126.95, 70.87, 69.53, 68.32, 67.62, 58.01, 20.64.

IR (NaCl) cm^{-1} : 2878, 1598, 1453, 1356, 1292, 1247, 1190, 1177, 1098, 1019, 923, 818, 776, 664, 584, 555.

2-[2-(2-Metossietossi)-etossi]-1-etil-azide (24)



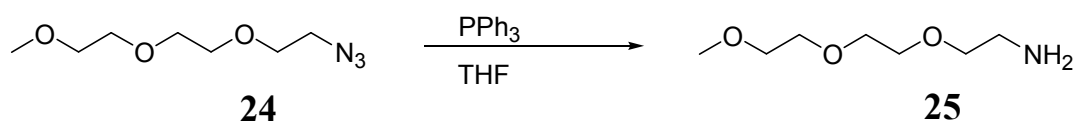
A 5.02 g di TEG-Tos (**23**) (15.7 mmoli) sciolti in 20 ml di metanolo sono stati aggiunti 12.2 g di sodio azide (0.18 moli, 12 eq) sciolti in 40 ml di H_2O . La reazione è proseguita a 50°C per una notte. TLC: SiO_2 (etere di petrolio / acetato di etile 1:1) Rf: 0.4 (Blue shift, prodotto), 0.3 (UV + Blue shift, TEG-Tos). Il metanolo è stato evaporato e la soluzione acquosa rimasta è stata estratta 5x20 ml con CH_2Cl_2 , le fasi organiche riunite sono state anidificate con Na_2SO_4 ed evaporate. Si sono ottenuti 2.69 g di prodotto come olio giallo (resa 93 %).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 3.59-3.29 (m, 15H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.9 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 71.77, 70.53, 70.50, 70.44, 69.90, 58.84, 50.51.

IR (NaCl) cm^{-1} : 2875, 2106, 1453, 1347, 1302, 1287, 1250, 1200, 1110, 1030, 937, 853.

2-[2-(2-Metossietossi)-etossi]-etilammina (25)



A 2.0 g di TEG-azide (**24**) sciolti in 30 ml di THF anidro (10.8 mmoli) sono stati aggiunti a 0°C 3.2 g di trifenilfosfina (12 mmoli, 1.1 eq.), quindi la reazione è proseguita a T ambiente per una notte. TLC: SiO_2 (etere di petrolio / acetato di etile 1:1) Rf: 0.4 (Blue shift, TEG-azide), 0.2 (Blue shift + ninidrina, TEG- NH_2). Alla scomparsa del reagente di partenza sono stati aggiunti 10 ml di H_2O e la reazione è proseguita per un'ora. La soluzione è stata evaporata e ripresa con 40 ml di H_2O , la soluzione è stata lavata con 2x15 ml di toluene e l'acqua è stata allontanata per liofilizzazione. Il

residuo è stato ripreso con diclorometano, anidrificato con Na_2SO_4 ed evaporato. Si sono ottenuti 1.25 g di prodotto come olio giallo chiaro (resa 71 %).

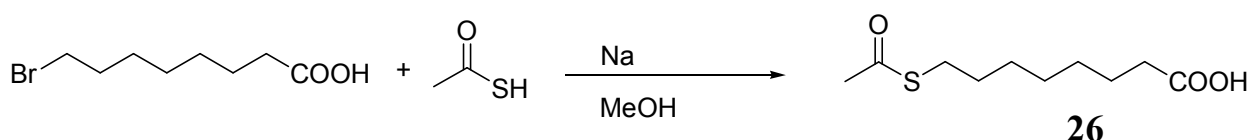
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 3.60-3.44 (m, 10H, O- CH_2); 3.33 (s, 3H, O- CH_3); 2.81 (t, 2H, $J=5.4$, $\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 2.05 (s, 2H, NH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.9 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 72.30, 71.48, 70.35, 70.09, 58.86, 41.61.

IR (NaCl) cm^{-1} : 3370, 3304, 2874, 1594, 1457, 1351, 1303, 1248, 1200, 1107, 1028, 937, 851.

ESI-MS, m/z : 164 (100, $\text{M}+\text{H}^+$); 186 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

Acido S-acetil-8-mercaptottanoico (26)



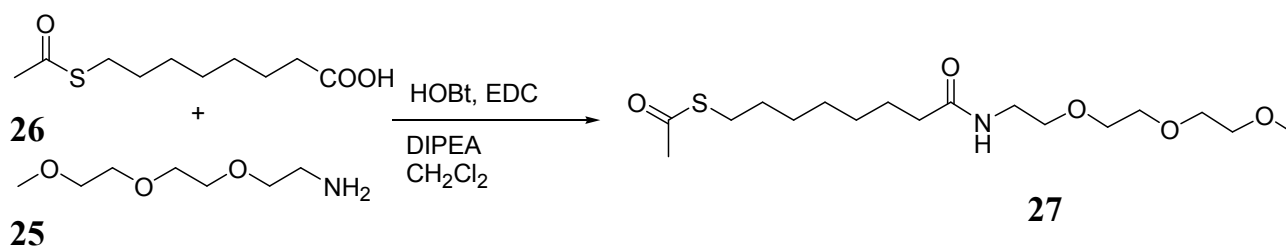
2.0 g di sodio metallico (87 mmoli, 4 eq.) sono stati sciolti in atmosfera di N_2 in 100 ml di metanolo anidro. Al termine dello sviluppo di H_2 sono stati aggiunti 6.6 ml di acido tioacetico (91 mmoli, 4 eq.) e 5.0 g di acido 8-bromoottanoico (22 mmoli, 1 eq.). La reazione è proseguita a 40°C sotto flusso di azoto per 18 h. TLC: SiO_2 (etere di petrolio / acetato di etile 2:1) Rf: 0.8 (Blue shift, acido Br-ottanoico), 0.65 (Blue shift + UV, prodotto). Il solvente è stato eliminato per distillazione, il residuo è stato ripreso con toluene e distillato per eliminare l'acido tioacetico in eccesso. Il residuo è stato ripreso con 50 ml di KHSO_4 5 % e sono state effettuate 5x20 ml estrazioni con diclorometano. Le fasi organiche riunite sono state anidificate con Na_2SO_4 ed evaporate. Si sono ottenuti 4.0 g di prodotto come solido giallo (resa 81 %).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 2.86 (t, 2H, 8- CH_2COOH); 2.35 (t, $J=7.3$, 2H, 2- CH_2SC); 2.33 (s, 3H, CH_3); 1.60 (m, 4H, 3- CH_2 e 7- CH_2); 1.30 (m br, 6H, 4,5,6- CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.9 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 196.38, 180.16, 34.19, 30.84, 29.59, 29.25;29.03, 28.90, 28.72, 24.74.

IR (KBr) cm^{-1} : 2929, 2854, 1696, 1471, 1429, 1410, 1289, 1253, 1217, 1136, 1105, 630.

7-({2-[2-(2-Metossietossi)etossi]etil}carbammoil)eptiletantiolato (27)



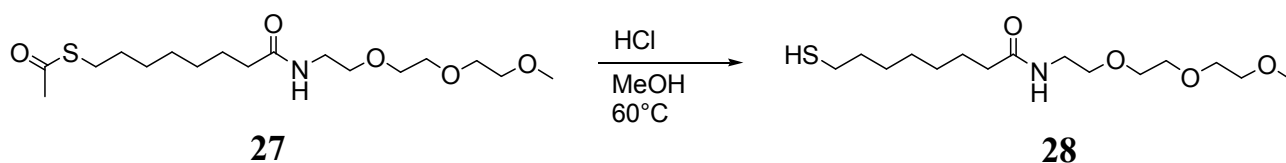
A 800 mg di Acido S-acetil-8-mercaptoottanoico (**26**) (3.7 mmoli, 1.2 eq) sciolti in 10 ml di diclorometano anidro sono stati aggiunti a 0°C nell'ordine 620 mg di idrossibenzotriazolo (4.6 mmoli, 1.4 eq) e 880 mg di EDC (4.6 mmoli, 1.5 eq) e, per solubilizzare, 5 ml di dimetilformammide. Dopo 30' sono stati aggiunti 500 mg di 2-[2-(2-Metossietossi)-etossi]-etilammina (**27**) sciolti in 2 ml di CH₂Cl₂ con 1 ml di DIPEA (6.1 mmoli, 2 eq). La reazione è proseguita una notte in atmosfera di N₂ a temperatura ambiente. TLC: SiO₂ (etere di petrolio / acetato di etile 1:2) Rf: 0.5 (UV + Blue shift, acido), 0.15 (UV + Blue shift, prodotto), 0.1 (UV + Blue shift, ammina). La miscela è stata lavata con: 2x10 ml di NaHCO₃ 5 %, 1x10 ml KHSO₄ 10 %, 1x10 ml NaCl saturo, 1x10 ml H₂O; la fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ ed evaporata. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia SiO₂ Flash (Etere di petrolio / etile acetato 1:2, aumentando la % di etile acetato). Sono stati ottenuti 694 mg di prodotto (resa 62 %).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 6.13 (s, 1H, NH); 3.62-3.53 (m, 10 H, O-CH₂); 3.43 (m, 2H, CH₂-NH); 3.37 (s, 3H, O-CH₃); 2.83 (t, 2H, J=7.27, CH₂-S); 2.30 (s, 3 H, CH₃CO) 2.15 (t, 2H, J=8.0, CH₂CONH); 1.62-1.51 (m, 4H CH₂); 1,29 (m, 6 H, CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 62.9 MHz) δ(ppm): 196.25, 173.34, 72.08, 70.65, 70.30, 70.10, 59.19, 39.24, 36.75, 30.81, 29.59, 29.22, 28.99, 28.76, 25.78.

IR (KBr) cm⁻¹: 3315, 2929, 2859, 1691, 1650, 1547, 1462, 1354, 1132, 1108, 1028, 627.

ESI-MS, m/z: 364,2 (M + H⁺); 386,2 (M+Na⁺), 402,1 (M+K⁺).

N-({2-[2-(2-Metossietossi)etossi]etil}-8-mercapto ottilammide (**28**) (TEG-TIOLO)

44 mg del TEG-tiolo protetto (**27**) sono stati sciolti in 10 ml di HCl 1.25 M in metanolo, la soluzione è stata scaldata a 60°C e la reazione è proseguita per 3 h. Al termine il solvente è stato

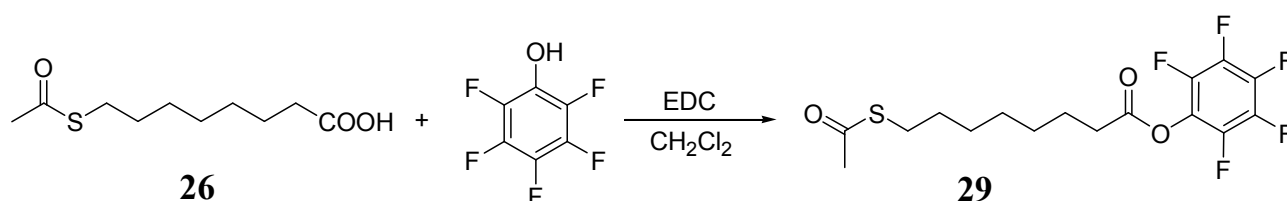
distillato a pressione ridotta. Sul prodotto è stata effettuata l'analisi NMR, quindi è stato sciolto in 5 ml di metanolo. La concentrazione di tiolo libero in soluzione è stata determinata con test di Ellmann e il valore ottenuto, unitamente allo spettro NMR, conferma che la deprotezione è stata completa e non si è avuta la formazione di disolfuro.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.57-3.47 (m, 10H, O- CH_2); 3.20 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 3.32 (s, 3H, O- CH_3); 2.63(t, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$); 2.15 (t, 2H, CH_2CONH); 1.67-1.26 (m, 10H CH_2).

ESI-MS (m/z) : 322 ($\text{M}+\text{H}^+$), 344 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

6.6.2 SINTESI TACN-TIOLO

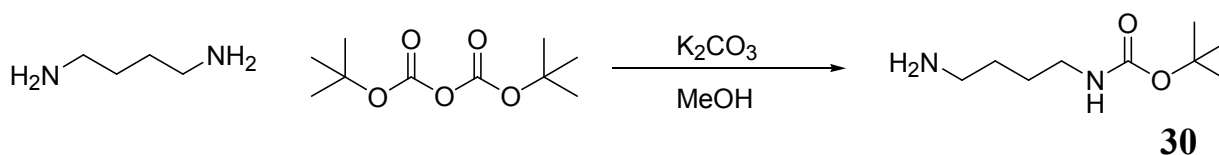
Pentafluorofenil S-acetil-8-mercaptotannoato (29)



A 0.5 g di acido S-acetil-8-mercaptotannoico (**26**) sciolti in 10 ml di diclorometano anidro (2.3 mmoli) sono stati aggiunti sotto flusso di azoto 0.5 g di pentafluorofenolo (2.7 mmoli, 1.2 eq). La soluzione è stata raffreddata a 0°C e sono stati aggiunti 0.52 g di EDC (2.7 mmoli, 1.2 eq). La reazione è proseguita a temperatura ambiente per una notte. TLC: SiO_2 (etere di petrolio / acetato di etile 2:1) Rf: 0.75 (Blue shift + UV, prodotto), 0.6 (Blue shift + UV, acido), 0.55 (Blue shift + UV, pentafluorofenolo). Sono stati aggiunti 30 ml di CH_2Cl_2 , quindi la soluzione è stata lavata 2x15 ml con una miscela 1:1 di KHSO_4 5 % e NaCl saturo. La soluzione organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 ed evaporato. Si sono ottenuti 900 mg di prodotto come olio giallo chiaro (resa quantitativa).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.87(t, 2H, 2- CH_2); 2.65 (t, 2H, 8- CH_2); 2.33 (s, 3H, CH_3); 1.76-1.58 (br, 4H, 3,7- CH_2); 1,38 (m br, 6H, 4,5,6- CH_2).

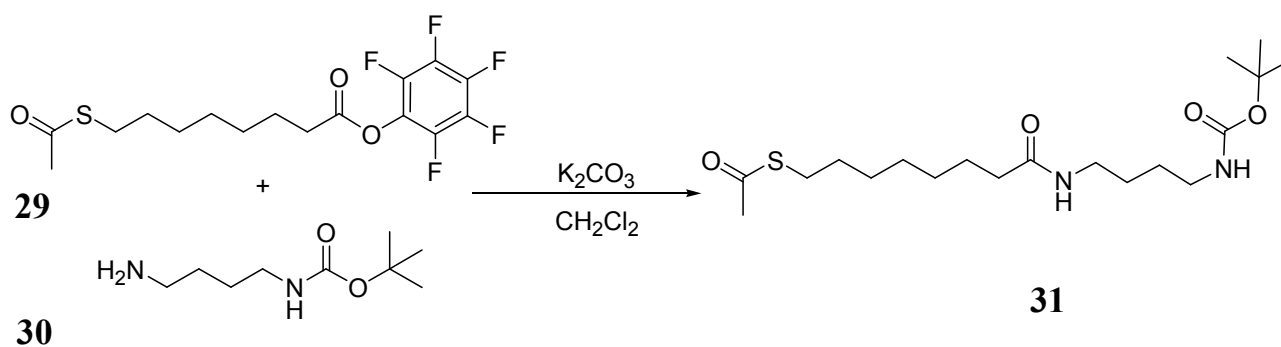
IR (NaCl) cm^{-1} : 2935, 2929, 1790, 1686, 1521, 1004, 904, 734.

N-Boc-diamminobutano (30)

In 40 ml di metanolo sono stati sciolti 1.8 ml di diamminobutano (17.8 mmoli, 2 eq) e sono stati aggiunti 5 g di K_2CO_3 . 1.96 g di Boc-anidride (9 mmoli) sono stati sciolti in 15 ml di metanolo e aggiunti goccia a goccia per un ora alla soluzione precedente, quindi la reazione è proseguita per 15 h. TLC: SiO_2 ($CHCl_3$ / metanolo 5 %) Rf: 0.9 (nin, di-Boc ammina), 0.1 (nin., prodotto), 0 (nin, reagente). La soluzione è stata filtrata ed evaporata, il residuo è stato ripreso con CH_2Cl_2 e estratto con 3x30 ml di acido acetico 1M. La fase acquosa è stata basificata con NaOH ed estratta con 4x20 ml di CH_2Cl_2 , le fasi organiche riunite sono state anidricate con Na_2SO_4 ed evaporate. Sono stati ottenuti 980 mg di prodotto in forma di olio trasparente (resa 58 % rispetto al Boc).

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 5,09 (s, $NHCO$), 3,13 (m, 2H, CH_2NHBoc); 2,71 (m, 2H, CH_2NH_2); 1,43 (m, 13H, Boc + CH_2 interni).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 62.9 MHz) δ (ppm): 156.14, 79.02, 41.6, 40.47, 31.31, 30.90, 28.49, 27,54.

N-Boc-N'-8-tioacetilottanoil-etilendiammina (31)

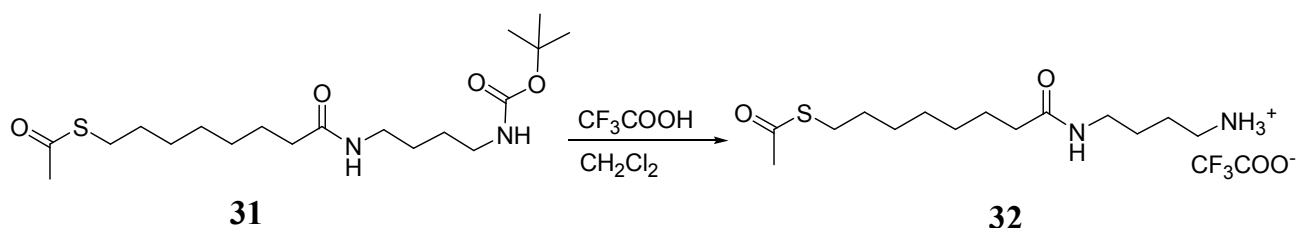
In 10 ml di diclorometano anidro sono stati sciolti in atmosfera di azoto 480 mg di Pentafluorofenil S-acetil-8-mercaptoottanoato (**29**) (1.2 mmoli, 1 eq) ed è stata aggiunta una punta di spatola di K_2CO_3 . Alla soluzione sono stati aggiunti goccia a goccia 560 mg di N-Boc-diamminobutano (**30**) (3 mmoli, 2.4 eq) sciolti in 5 ml di CH_2Cl_2 e la reazione è proseguita per 2 h. TLC: SiO_2 ($CHCl_3$ / metanolo 5 %) Rf: 0.8 (UV, pentafluorofenil estere), 0.5 (UV + nin., prodotto), 0.1 (nin., ammina). La soluzione è stata filtrata, lavata con 10 ml di $KHSO_4$ al 10 % e con 10 ml di NaCl saturo, quindi la fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 ed evaporata. Sono stati ottenuti 360 mg del prodotto come solido bianco (resa 77 %).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 5.69 + 4.61 (s br, 2H, NHCO); 3.27 (t, 2H, CH_2NHBoc), 3.14 (t, 2H, CH_2NHCO), 2.85 (t, 2H, CH_2SCO), 2.32 (s, 3H, CH_3CO), 2.15 (t, 2H, CH_2CONH), 1.63-1.31 (br, 23H, CH_2 della catena alifatica).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.9 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 196.37, 173.36, 156.33, 79, 39.25, 36.93, 30.85, 29.61, 29.26, 29.23, 28.94, 28.75, 27.82, 26.90, 25.84.

ESI-MS (m/z): 389.2 ($\text{M}+\text{H}^+$); 411.2 ($\text{M}+\text{Na}^+$); 289 ($\text{M}+\text{H}^+ - \text{Boc}$)

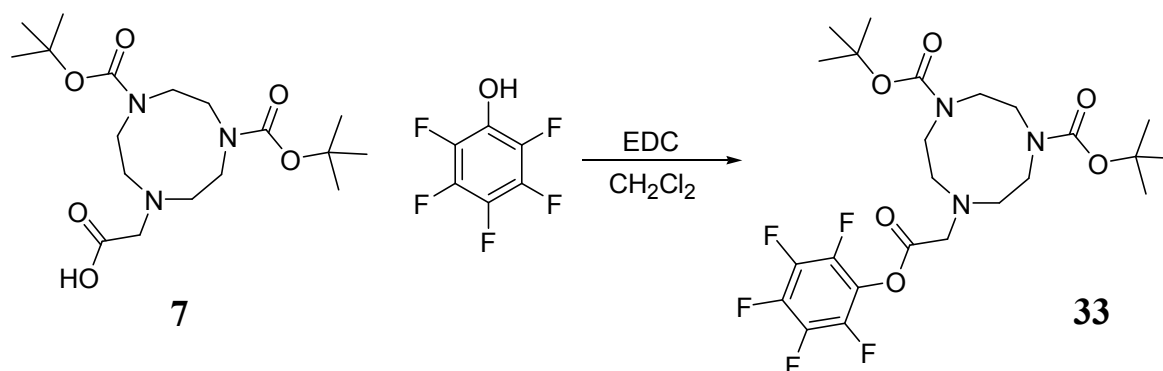
N-8-tioacetilottanoil-etilendiammina *TFA (32)



125 mg di N-Boc-N'-8-tioacetilottanoil-etilendiammina (**31**) sono stati sciolti in 5 ml di diclorometano e sono stati aggiunti 1.8 ml di acido trifluoroacetico. La reazione è proseguita per due ore, dopo le quali il solvente è stato distillato a pressione ridotta ottenendo il prodotto con resa quantitativa in forma di sale trifluoroacetato.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 3.19 (t, 2H, CH_2NH_2), 2.93 (t, 2H, CH_2NHCO), 2.84 (t, 2H, CH_2SCO), 2.28 (s, 3H, CH_3CO), 2.17 (t, 2H, CH_2CONH), 1.59-1.31 (br, 10H, CH_2 catena alifatica), 1.33 (br, 4H, CH_2 catena alifatica).

Pentafluorofenil{1-[4,7-diBoc-1,4,7-triazaciclononan]}acetato (33)

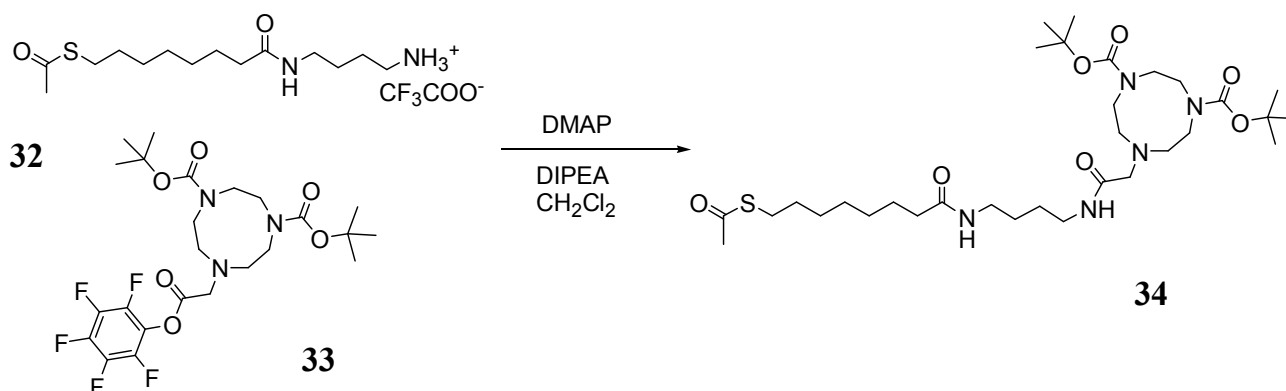


In 3 ml di diclorometano anidro sono stati sciolti sotto flusso di N_2 382 mg di Acido 2-(Di-Boc-triazaciclononan)acetico (**7**) (1 mmole). Sono quindi stati aggiunti 290 mg di pentafluorofenolo (1.6 mmoli, 1.6 eq) e, a 0°C , 306 mg di EDC (1.6 mmoli, 1.6 eq). La reazione è proseguita a temperatura ambiente per una notte. TLC: SiO_2 ($\text{CHCl}_3/\text{metanolo}$ 5 %) Rf: 0.4 (UV + nin., prodotto), 0.15 (UV,

pentafluorofenolo), 0 (nin., acido). La soluzione è stata diluita con 5 ml di CH_2Cl_2 ed è stata lavata con 2x5 ml di una soluzione 1:1 KHSO_4 5 % e NaCl saturo. La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 ed evaporata. Sono stati ottenuti 462 mg di prodotto come olio giallo (resa 80 %).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.48 (s, 18H, t-Bu), 2.93 (br, 4H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{Ac})\text{CH}_2$), 3.32 (m br, 4H, $\text{N}(\text{Boc})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Ac})$), 3.47 (m br, 4H, $\text{N}(\text{Boc})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Boc})$), 3.87 (m br, 2H, $\text{CH}_2\text{COOC}_6\text{F}_5$).

diBOC-Triazaciclononan-tiolesteri (34)

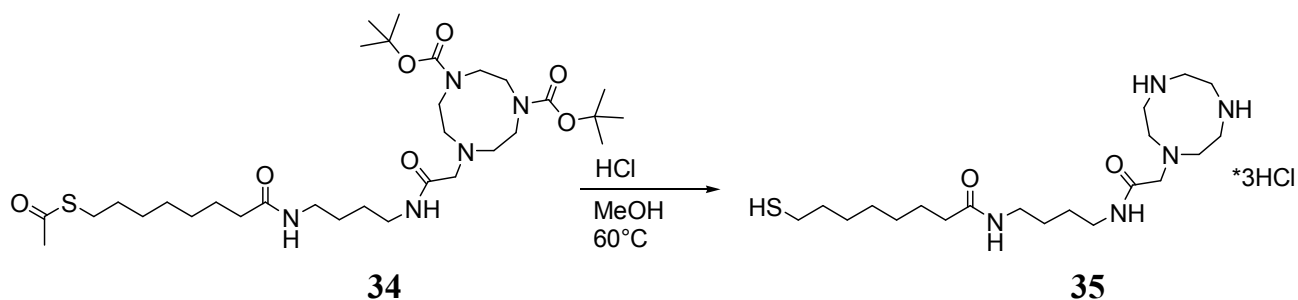


In 5 ml di diclorometano anidro sono stati sciolti 300 mg di N-8-tioacetilottanoil-etilendiammina *TFA (**32**) (0.74 mmoli, 1eq), a cui sono stati aggiunti 560 mg di Pentafluorofenil{1-[4,7-diBoc-1,4,7-triazaciclononan]}acetato (**33**) (0.98 mmoli, 1.3 eq) sciolti in 5 ml di CH_2Cl_2 . Alla soluzione sono stati aggiunti 12 mg di N,N-dimetilamminopiridina (0.1 mmoli, 0.13 eq) e 840 μl di DIPEA (5 mmoli, 6.6 eq). La reazione è proseguita in atmosfera di N_2 per una notte. TLC: SiO_2 (CHCl_3 /metanolo 5 %) Rf: 0.8 (UV + nin, pentafluorofenilestere), 0.43 (UV + nin, prodotto), 0.4 (UV, pentafluorofenolo), 0.2 (UV + nin, DMAP). La soluzione è stata lavata con 10 ml di NaHCO_3 al 5 %, con 10 ml di KHSO_4 al 10 % e con 10 ml di NaCl saturo, quindi la fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 ed evaporata. Il residuo è stato purificato mediante colonna cromatografica SiO_2 Flash (CHCl_3 , MeOH 1 %). Sono stati ottenuti 311 mg di prodotto come olio trasparente (64 % di resa).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.26 (s, 1H, NH) 3.52 (br, 2H, COCH_2N triaz), 3.23 (m br, 12H, CH_2NHCO + $\text{CH}_2\text{N}(\text{Boc})$ + $(\text{Boc})\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.84 (t, 2H, CH_2SCO), 2.69 (m, 4H, CH_2NCH_2) 2.32 (s, 3H, CH_3CO), 2.18 (t, 2H, CH_2CONH), 1.57-1.48 (br, 24H, CH_2 alifatici + CH_3 Boc), 1.30 (br, 8H, CH_2 alifatici).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.9 MHz) δ (ppm): 196.40, 173.36, 155.91, 80.33, 55.29, 54.28, 51.11, 50.33, 49.18, 39.46, 38.58, 38.82, 36.91, 30.90, 29.67, 29.26, 29.23, 28.94, 28.82, 27.74, 26.47, 25.91.

ESI-MS (m/z): 658.3 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Triazaciclonoan-tiolo (Tacn-TIOLO) (35)

100 mg del TEG-tiolo protetto (**34**) sono stati sciolti in 10 ml di HCl 1.25 M in metanolo, la soluzione è stata scaldata a 60°C e la reazione è proseguita per 3 h. Al termine il solvente è stato distillato a pressione ridotta. Sul prodotto è stata effettuata l'analisi NMR, quindi è stato sciolto in 5 ml di metanolo. La concentrazione di tiolo libero in soluzione è stata determinata con test di Ellmann e il valore ottenuto, unitamente allo spettro NMR, conferma che la deprotezione è stata completa e non si è avuta la formazione di disolfuro.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 3.67 (m, 4H, NHCH₂CH₂NH Tacn); 3.51(s, 2H, COCH₂N-Tacn), 3.27 (m br, 8H, CH₂NHCO + CH₂NH Tacn), 3.03 (br, 4H, CH₂NCH₂), 2.46 (t, 2H, CH₂SH); 2.30 (s, 2H, CH₂CONH), 1.47 (br, 8H, CH₂ alifatici), 1,28 (m, 6H, CH₂ alifatici).

6.6.3 SINTESI AU-MPC**Sintesi nanoparticelle d'oro**

In 7 ml di H₂O distillata sono stati sciolti 102 mg di acido tetracloroaurico triidrato (HAuCl₄*3H₂O, 0.26 mmoli), conservato e pesato in glove-box. Quindi è stata preparata una soluzione di 5.50 g di tetraottilammonio bromuro (3 mmoli) in 250 ml di toluene precedentemente degasato in bagno ad ultrasuoni. La soluzione acquosa di Au(III) è stata estratta con 3x15ml di soluzione di TOABr, portando in fase organica l'oro, che forma una soluzione rossa. Alla soluzione di TOABr rimanente sono stati aggiunti 4.3 ml di diottilammina (14 mmoli, 55 eq), la soluzione ottenuta è stata aggiunta sotto vigorosa agitazione alla soluzione di Au in toluene ricavata dalle estrazioni. La soluzione è stata mantenuta sotto agitazione in atmosfera di N₂ per 30', al termine dei quali si ha la completa decolorazione della soluzione. Sono stati quindi aggiunti sotto agitazione molto sostenuta 46 mg di sodioboridruro (1.2 mmoli, 4.6 eq) sciolti in 2 ml di H₂O, provocando l'immediata formazione di colloidi di oro con comparsa di un'intensa colorazione marrone. La soluzione è stata mantenuta sotto agitazione in atmosfera anidra per 3 h, al termine delle quali la fase acquosa è stata separata.

6 - NANOPARTICELLE D'ORO

La soluzione di colloidi d'oro in toluene è stata conservata sotto azoto ed è stata passivata con i tioli entro le 24 ore successive.

Ricopertura NP d'oro con vari rapporti TEG-tiolo / Tacn-tiolo

250 ml di soluzione di nanoparticelle d'oro metastabili in toluene sono state divisi in 5 batch da 50 ml ciascuno. Ciascuna di queste porzioni è stata passivata con una diversa composizione percentuale dei due tioli, aggiungendo miscele a diversi rapporti tra i due componenti. La quantità di tiolo aggiunta per la ricopertura è stata calcolata in 2 equivalenti rispetto a quella prevista dalla formula minima $Au_{214}RSH_{92}$, calcolata basandosi su un diametro delle nanoparticelle di 2 nm. Come soluzioni madre sono state utilizzate due soluzioni dei tioli in metanolo:

Soluzione TEG-tiolo $C = 2.68 \cdot 10^{-2} M$

Soluzione Tacn-tiolo $C = 2.38 \cdot 10^{-2} M$

Nei vari batch sono state quindi aggiunte le seguenti quantità di tioli (ogni batch contiene $5.2 \cdot 10^{-5}$ moli di Au):

Tabella 6.6

Batch	% TEG	% Tacn	V(TEG-SH)	V(Tacn-SH)
A	80	20	1.50 ml ($3.6 \cdot 10^{-5}$ moli)	330 μ l ($8.8 \cdot 10^{-6}$ moli)
B	60	40	1.10 ml ($2.6 \cdot 10^{-5}$ moli)	655 μ l ($1.8 \cdot 10^{-5}$ moli)
C	40	60	740 μ l ($1.8 \cdot 10^{-5}$ moli)	990 μ l ($2.7 \cdot 10^{-5}$ moli)
D	20	80	370 μ l ($8.8 \cdot 10^{-6}$ moli)	1.30 ml ($3.5 \cdot 10^{-5}$ moli)
E	0	100	-	1.70 μ l ($4.6 \cdot 10^{-5}$ moli)

In seguito sono stati sintetizzati due ulteriori batch di nanoparticelle al 5% e al 10% di Tacn, utilizzando due porzioni da 50 ml di colloidi sintetizzati con la medesima procedura (ogni batch contiene $1.2 \cdot 10^{-4}$ moli di Au).

Tabella 6.7

Batch	% TEG	% Tacn	V(TEG-SH)	V(Tacn-SH)
A1	95	5	4.10 ml ($1.1 \cdot 10^{-4}$ moli)	244 μ l ($5.8 \cdot 10^{-6}$ moli)
A2	90	10	3.73 ml ($1.0 \cdot 10^{-4}$ moli)	504 μ l ($1.2 \cdot 10^{-5}$ moli)

Le soluzioni dei due tioli sono prima state mescolate tra loro, quindi aggiunte sotto vigorosa agitazione alla soluzione di nanoparticelle, dopo circa 15 minuti si ha la completa decolorazione

delle soluzioni e la formazione di un precipitato marrone. La reazione è proseguita per 3 h in agitazione sotto azoto, quindi sono stati aggiunti 5 ml di H₂O e la reazione è proseguita per ancora 1h. In questo periodo le nanoparticelle passano nella fase acquosa, al termine questa è stata separata e recuperata, quindi sono stati effettuati i seguenti lavaggi: 2x10ml di toluene, 3x10 ml di etere etilico, 3x10 ml di acetato di etile. Gli eventuali solventi organici rimasti sono stati eliminati all'evaporatore rotante, quindi le soluzioni sono state liofilizzate ottenendo le nanoparticelle funzionalizzate come polvere solida.

6.6.4 ANALISI NANOPARTICELLE

Analisi NMR

I campioni sono stati preparati sciogliendo una punta di spatola di nanoparticelle (ca. 5 mg) in metanolo deuterato.

Per le misure dopo trattamento con I₂ all'interno del tubo NMR è stata aggiunta una scaglia di iodio bisublimato, e dopo una notte è stata effettuata la misura. La reazione provoca il cambiamento del colore della soluzione da marrone a violetto e la formazione di un precipitato nero di Au.

Calcolo % tioli sulle nanoparticelle

Il calcolo in questione richiede dapprima l'esame degli spettri relativi al batch TEG e al batch E (100% Tacn), che consente di ottenere i rapporti tra le aree dei loro picchi distintivi (TEG: $\delta = 3.6$ ppm che rappresenta 10 idrogeni; Tacn: $\delta = 2.8$ ppm relativo a 4 H) rispetto ad un segnale comune ai due tioli (picco a $\delta = 2.16$ ppm, che integra per 2H). Si deve effettuare questa operazione preliminare poiché, a causa dell'allungamento del tempo di rilassamento spin-spin, soprattutto per ciò che riguarda i protoni più vicini al core metallico, i picchi sono molto allargati e gli integrali possono anche non corrispondere al reale rapporto tra i protoni nella molecola. Eseguito il primo calcolo descritto, per ciascun batch si calcola poi il rapporto tra l'area del picco distintivo rispetto a quello comune e lo si divide per il valore ottenuto per le NP al 100% Tacn (o 100% TEG); tale quoziente corrisponde alla percentuale di Tacn (o TEG) nella matrice organica.

Esempio di calcolo:

Spettro Tacn 100%:

Rapporto tra (picco a $\delta = 2.8$ ppm/picco a $\delta = 2.16$) = 1.35.

Spettro TEG 100%:

Rapporto tra (picco a $\delta = 3.6$ ppm/picco a $\delta = 2.16$) = 9.

Spettro batch D

6 - NANOPARTICELLE D'ORO

Rapporto tra (picco a $\delta = 2.8$ ppm/picco a $\delta = 2.16$) = 1.08

↓

%Tacn = $(1.08/1.35) * 100 = 80\%$

Rapporto tra (picco a $\delta = 3.6$ ppm/picco a $\delta = 2.16$) = 1.93

↓

%TEG = $[1.93/9] * 100 = 22\%$ %Tacn = 78%

Soluzione madre di nanoparticelle

In un matraccio da 2 mL si è introdotto una quantità pesata di nanoparticelle variabile tra 1 e 5 mg e si è portato a volume usando acqua milliQ. Per favorire il dissolvimento le soluzioni sono state agitate per scuotimento meccanico per una notte. Prima dell'utilizzo le soluzioni sono state filtrate mediante filtro Millipore per ottenere una soluzione limpida. La soluzione è stata conservata a 4 °C.

Titolazioni spettrofotometriche con Cu(II).

La titolazione è stata eseguita misurando l'assorbanza a 264 nm del complesso Tacn-Cu²⁺ che si viene a formare. Le nanoparticelle possiedono un'elevata assorbanza, dovuta al nanocluster di Au, nella zona spettrale di interesse, per cui per ottenere misurazioni accettabili è stata utilizzata come bianco una identica soluzione di NP, che è stata diluita in parallelo alla soluzione titolata.

In due cuvette da 800 μ l si sono introdotti 80 μ l di una soluzione 0.1 M di tampone MES a pH 6.5, 48 μ l della soluzione madre di nanoparticelle la cui concentrazione deve essere determinata e si è portato a volume con 672 μ l di H₂Omq.

Si è preparata la soluzione titolante formata da tampone MES a concentrazione 10mM e CuCl₂ a concentrazione $6 * 10^{-4}$ M (da soluzione madre $4 * 10^{-3}$ M). Infine è stata preparata una soluzione acquosa di tampone 10mM per la correzione del bianco.

Dopo aver acquisito l'autozero, si è proceduto alla titolazione: ogni misura ha previsto l'aggiunta di un volume noto di soluzione titolante alla cuvetta di misura e l'aggiunta di un equivalente volume di soluzione tampone al bianco, in modo tale da correggere la diluizione. Dopo l'aggiunta si è atteso qualche istante e si è registrato lo spettro nell'intervallo da 600 a 200nm.

Si è individuato il massimo della banda di assorbimento del complesso Cu-Tacn a 264 nm; una volta corretti i dati per il fattore di diluizione, si è costruito un grafico portando in ascissa l'assorbanza corretta e in ordinata il volume di Cu(II) aggiunto.

Trattamento dei dati: E' stata realizzata una regressione lineare dei dati sulla prima parte della curva e si è eseguita la stessa operazione per gli ultimi punti. Le due rette hanno per intersezione il punto di viraggio della titolazione: l'ascissa di tale punto corrisponde ai microlitri di Cu(II) da aggiungere affinché tutto il Tacn presente sia titolato. Noto tale dato, e poiché la stechiometria del complesso Cu/Tacn è 1:1, si sono ricavate le moli di Tacn presenti e quindi la sua concentrazione in ciascun batch.

Il confronto tra i dati di assorbanza delle nanoparticelle e le concentrazioni calcolate può dare una conferma delle percentuali di Tacn, valutate precedentemente con analisi $^1\text{H-NMR}$. Si calcola per tutti i campioni il rapporto tra la loro assorbanza e quella del Batch E (si utilizzano i dati relativi all'assorbanza delle nanoparticelle a 264 nm); si procede quindi al calcolo del rapporto tra la concentrazione di ogni batch e quella del batch E. Il quoziente tra il primo e il secondo valore rappresenta la percentuale di Tacn nel layer.

Tabella 6.8 Concentrazioni delle soluzioni madre di nanoparticelle.

Batch di NP	mg pesati	Concentrazione Tacn ($\times 10^{-4}\text{M}$)	%Tacn calcolata
A ₁ (Tacn 5%)	9.2	2.6 ± 0.3	7
A ₂ (Tacn 10%)	11.5	8.6 ± 1.9	11
A (Tacn 15%)	5	1.2 ± 0.2	25
B (Tacn 34%)	2.9	6.4 ± 1.3	31
C (Tacn 54%)	4.6	2.3 ± 0.4	56
D (Tacn 75%)	3	5.9 ± 1.0	72
E (Tacn 100%)	1.5	10.9 ± 0.1	100

6.6.5 STUDI CINETICI

Le reazioni sono state svolte direttamente nei pozzetti, realizzando dapprima il complesso NP-Zn in tampone HEPES 7.5 e aggiungendo solo alla fine il substrato (si porta a volume con $\text{H}_2\text{O}_{\text{mq}}$).

La reazione d'idrolisi è stata seguita per via spettrofotometrica, misurando nel tempo l'aumento di assorbanza a 405nm, dovuto al rilascio e conseguente accumulo del p-nitrofenolato come prodotto di reazione. Le cinetiche sono state condotte a 40°C e seguite per circa 3 ore, fino al raggiungimento di un plateau di assorbanza; i dati sono stati raccolti a intervalli di tempo di 30 secondi÷1 minuto.

Trattamento dei dati

E' stata eseguita una regressione lineare dei dati che costituiscono il tratto iniziale delle curve di assorbanza verso tempo, là dove cioè la percentuale di conversione è inferiore al 10%. Quindi i dati ottenuti, basandosi su una retta di taratura relativa al p-nitrofenolo, sono stati convertiti in velocità di idrolisi (unità di misura ($\text{mol l}^{-1}\text{s}^{-1}$)). Per ricavare k_{cat} e K_M , è stato eseguito un fitting numerico, utilizzando l'equazione di Michaelis-Menten, per mezzo del programma Origin[®].

Soluzioni madre: Nanoparticelle: vedi tabella 6.8
 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$: $2 \cdot 10^{-4}$ M in H_2O
HPNPP: $5 \cdot 10^{-3}$ M in H_2O
Dimetilfosfato: 0.1 M in MeOH
Tampone: HEPES 0.5 M in H_2O pH 7.5

Idrolisi HPNPP variando $[\text{Zn}^{2+}]$.

Condizioni utilizzate: $[\text{Tacn}] = 2 \cdot 10^{-5}$ M
 $[\text{Zn}^{2+}] = 0 - 6 \cdot 10^{-5}$ M
 $[\text{HPNPP}] = 2 \cdot 10^{-4}$ M
 $[\text{HEPES}] = 0.01$ M pH 7.5

Idrolisi HPNPP variando $[\text{HPNPP}]$.

Condizioni utilizzate: $[\text{Tacn}] = 2 \cdot 10^{-5}$ M
 $[\text{Zn}^{2+}] = 2 \cdot 10^{-5}$ M
 $[\text{HPNPP}] = 0.1 - 3 \cdot 10^{-3}$ M
 $[\text{HEPES}] = 0.01$ M pH 7.5

Idrolisi HPNPP variando $[\text{Tacn}]$ con NP(100% Tacn) a $[\text{Zn}^{2+}]$ costante.

I diversi rapporti sono stati realizzati, mantenendo fissa la quantità di Zn^{2+} aggiunto, e aumentando via via la quantità di nanoparticella al 100% Tacn.

Si esegue un esperimento di Michaelis-Menten per ogni rapporti Zn-NP (5-10-20-40-60-80-100%).

Condizioni utilizzate: $[\text{Tacn}] = 0.2 - 4 \cdot 10^{-4}$ M
 $[\text{Zn}^{2+}] = 2 \cdot 10^{-5}$ M
 $[\text{HPNPP}] = 0.1 - 3 \cdot 10^{-3}$ M per ogni rapporto Zn/Tacn
 $[\text{HEPES}] = 0.01$ M pH 7.5

Inibizione con dimetilfosfato.

Gli esperimenti sono stati svolti utilizzando una concentrazione fissa di NP-100% Tacn e di substrato HPNPP, aggiungendo varie quantità di dimetilfosfato. Per ogni cinetica è stata calcolata la velocità iniziale di idrolisi dell'HPNPP.

Condizioni utilizzate: [Tacn] = $2 \cdot 10^{-5}$ M
[Zn²⁺] = $2 \cdot 10^{-5}$ M
[HPNPP] = $2 \cdot 10^{-4}$ M
[DMP] = 0 – $1 \cdot 10^{-2}$ M
[HEPES] = 0.01 M pH 7.5

A-1 PUBBLICAZIONI

- Zauza, G.; Martin, M.; Prins, L.J.; Scrimin, P.
Determination of the activity of heterofunctionalized catalysts from mixtures
New J. Chem. **2006**, *10*, 1493-1497.
- Scarso, A.; Zauza, G.; Bodar Houillon, F.; Prins, L.J.; Scrimin, P.
Tripodal, cooperative and allosteric transphosphorylation metallocatalysts
J. Org. Chem. **2007**, *72*, 376-385.
- Guarise, C.; Manea, F.; Zauza, G.; Pasquato, L.; Prins, L.J.; Scrimin, P.
Cooperative nanosystems
J. Pept. Sci. **2008**, *14*, 174-183.
- Zauza, G.; Scrimin, P.; Prins, L.J.
Origin of the dendritic effect in multivalent enzyme-like catalysts
J. Am. Chem. Soc. **2008**, *130*, 5699-5709.
- Guarise, C.; Zauza, G.; Prins, L.J.; Scrimin, P.
Functionalization of tripodal scaffold molecules on solid support
Eur. J. Org. Chem. **2008**, *20*, 3559-3568.

A-2 BIBLIOGRAFIA

- 1) Stites, W.E.; *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1233-1250.
- 2) Kitov, P.I.; Bundle, D.R.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16271-16284.
- 3) Lee, R.T.; Lin, P.; Lee, Y.C. *Biochemistry* **1984**, *23*, 4255-4261.
- 4) Gestwicki, J.E.; Cairo, C.W.; Strong, L.E.; Oetjen, K.A.; Kiessling, L.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
- 5) Ehrlich, P.H. *J. Theor. Biol.* **1979**, *81*, 123-127.
- 6) Mammen, S. K. Choi, G. M. Withesides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2754-2794.
- 7) Seok-Ki Choi, *Synthetic Multivalent Molecules, Concepts and Biomedical Applications*. Wiley, **2004**
- 8) H. L. Handl, J. Vagner, H. Han, E. Mash, V. J. Hruby, R. J. Gillies, *Expert Opin. Ther. Targets*, **2004**, *8*, 565-586.
- 9) L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 2348-2368.
- 10) Guarise, C.; Manea, F.; Zaupa, G.; Pasquato, L.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 174-183.
- 11) Pasquato, L.; Rancan, F.; Scrimin, P.; Mancin, F.; Frigeri, C. *Chem. Commun.* **2000**, 2253-2254.
- 12) Tomalia, D.A. *Aldrichimica Acta*, **2004**, *37*, 39-57.
- 13) Boas, U.; Heegaard, P.M.H. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43-63.
- 14) Bosman, A.W.; Janssen, H.M.; Meijer, E.W. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1665-1688.
- 15) Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F. *Synthesis* **1978**, 155-158.
- 16) Tomalia, D.A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym. J.* **1985**, *17*, 117.
- 17) Hawker, C.J.; Wooley, K.L.; Fréchet, J.M.J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 1287-1297.
- 18) Hawker, C.J.; Fréchet, J.M.J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1010-1011.
- 19) Wooley, K.L.; Hawker, C.J.; Fréchet, J.M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11496-11505.
- 20) Tomalia, D. A.; Huang, B.; Swanson, D. R.; Brothers, H. M., II; Klimash, J. W. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3799.
- 21) Dirksen, A.; Meijer, E.W.; Adriaens, W.; Hackeng, T.M. *Chem. Commun.* **2006**, 1667-1669.
- 22) Agarwal, A.; Saraf, S.; Asthana, A.; Gupta, U.; Gajbhiye, V.; Jain, N.K. *Int. J. Pharm.* **2008**, *350*, 3-13.
- 23) Fischer, D.; Li, Y.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Kissel, T. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1121-1131.
- 24) Wallimann, P.; Marti, T.; Furer, A.; Diederich, F. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1567-1608.

- 25) Boas, U.; Sontjens, S.H.; Jensen, K.J.; Christensen, J.B.; Meijer, E.W. *Chembiochem.* **2002**, *3*, 433-439.
- 26) Andre, S.; Pieters, R.J.; Vrasidas, I.; Kaltner, H.; Kuwabara, I.; Liu, F.T.; Liskamp, R.M.; Gabius, H.J. *Chembiochem.* **2001**, *2*, 822-830.
- 27) Sadler, K.; Tam, J.P. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 195-229.
- 28) Bay, S.; Lo-Man, R.; Osinaga, E.; Nakada, H.; Leclerc, C.; Cantacuzene, D. *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 620-625.
- 29) Liang, C.; Fréchet, J.M.J. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 385-402.
- 30) Astruc, D.; Chardac, F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2991-3023.
- 31) Breinbauer, R.; Jacobsen, E.N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3604-3607.
- 32) Helms, B.; Fréchet, J.M.J. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1125-1148.
- 33) Kofoed, J.; Reymond, J.-L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 656-664.
- 34) Douat-Casassus, C.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15642-15643.
- 35) Delort, E.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15642-15643.
- 36) Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U.; *Chem. Commun.* **2005**, 2540-2548.
- 37) Williams, N.H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 485-493.
- 38) Morrow, J.R.; Iranzo, O. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 192-200.
- 39) Albedyhl, S.; Schnieders, D.; Jancsó, A.; Gajda, T.; Krebs, B. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, *6*, 1400-1409.
- 40) Iranzo, O.; Kovalevsky, A.Y.; Morrow, J.R.; Richard, J.P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1988-1993
- 41) Livieri, M.; Mancin, F.; Saielli, G.; Chin, J.; Tonellato, U. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2246-2256.
- 42) Scarso, A.; Zaupa, G.; Bodar Houillon, F.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 376-385.
- 43) Martin, M.; Manea, F.; Fiammengo, R.; Prins, L.J.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6982-6983.
- 44) Manea, F.; Bodar-Houillon, F.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6165-6169.
- 45) Guarise, C.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11670-11674.
- 46) Albericio, F. *Biopolymers*, **2000**, *55*, 123-139.
- 47) Guibé, F. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 2967-3042.
- 48) Rosowsky, A.; Wright, J.E. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5551-5558.
- 49) Guarise, C.; Zaupa, G.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *20*, 3559-3568.

- 50) Posnett, D.; McGrath, H.; Tam, J.P. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1719-1725.
- 51) Takeda, K.; Akiyama, A.; Konda, Y.; Takayanagi, H.; Harigaya, Y. *Tetr. Lett.* **1995**, *34*, 113-114.
- 52) Kimura, S.; Bill, E.; Bothe, E.; Weyhermüller, T.; Wieghardt, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6025-6039.
- 53) Gaggini, F.; Porcheddu, A.; Reginato, G.; Rodriguez, M.; Taddei, M. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 805-810.
- 54) Zaupa, G.; Scrimin, P.; Prins, L.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5699-5709.
- 55) Williams, N. H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 485-493.
- 56) Morrow, J.R.; Iranzo, O. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 192-200.
- 57) Avenier, F.; Domingos, J.B.; Van Vliet, L.; Hollfelder, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7611-7619.
- 58) Molenveld, P.; Stikvoort, W.M.G.; Kooijman, H.; Spek, A.L.; Engbersen, J.F.J.; Reinhoudt, D.N. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3896-3906.
- 59) Feng, G.; Natale, D.; Prabakaran, R.; Mareque-Rivas, J.C.; Williams, N.H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7056-7059.
- 60) Pansare, S.V.; Huyer, G.; Arnold, L.D.; Vederas, J.C. *Organic Synthesis*, **1998**, *9*, 58.
- 61) Hollfelder, F.; Kirby, A. J.; Tawfik, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9578-9579.
- 62) Helms, B.; Fréchet, J.M.J. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1125-1148.
- 63) Dahan, A.; Portnoy, M. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1197-1200.
- 64) Krattiger, P.; Kovasy, R.; Revell, J.D.; Ivan, S.; Wennemers, H. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1101-1103.
- 65) Daniel, M. C.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293-346.
- 66) Pengo, P.; Baltzer, L.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 400-404
- 67) Smith, R.K.; Reed, S.M.; Lewis, P.A.; Monnel, J.D.; Clegg, R.S.; Kelly, K.F.; Bumm, L.A.; Hutchinson, J.E.; Weiss, P.S. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 1119-1122.
- 68) Tamada, K.; Hara, M.; Sasabe, H.; Knoll, W. *Langmuir*, **1997**, 1558-1566.
- 69) Duchesne, L.; Wells, G.; Fernig, D.G.; Harris, S.A.; Lévy, R. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2127-2134.
- 70) Ghosh, P.S.; Verma, A.; Rotello, V.M. *Chem. Comm.* **2007**, 2796-2798.
- 71) Jackson, A.M.; Myerson, J.W.; Stellacci, F. *Nature Materials*, **2004**, *3*, 330-336.
- 72) Jackson, A.M.; Hu, Y.; Silva, P.J.; Stellacci, F.; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11135-11149
- 73) Uzun, O.; Hu, Y.; Verma, A.; Chen, S.; Centrone, A.; Stellacci, F. *Chem. Commun.* **2008**, 196-198.
- 74) Ackerson, C. J.; Jadzinsky, P. D.; Kornberg, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6550-6551.

- 75) Templeton, A. C.; Cliffel, D. E.; Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7081-7089.
- 76) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R.
J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1994**, 801-802.
- 77) Manea, F.; Bindoli, C.; Polizzi, S.; Lay, L.; Scrimin, P. *Langmuir* **2008**, *24*, 4120-4124.

A-3 ABBREVIAZIONI

ACN	Acetonitrile
ATANP	Acido 2-ammino-3-[1-(1,4,7-triazaciclononan)]propanoico
Au-MPC	Monolayer Protected Gold Nanocluster
BNPP	Bis-nitrofenilfosfato
Boc	t-butyl-ossicarbonile
Boc-ON	2-(<i>t</i> -Butossicarbonilossimmino)-2-fenilacetoneitrile
DAP	Acido 2,3-diamminopropanoico
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCM	Diclorometano
DEAD	dietilazodicarbossilato
DIPEA	di-isopropil-etilammina
DMAP	N,N-dimetilamminopiridina
DMF	Dimetilformammide
DMP	Dimetilfosfato
DTNB	5,5'-ditio-bis(acido p-nitrobenzoico)
EDC	N-(3-Dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide
Fmoc	Fluorenil-metossicarbonile
HBTU	O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio esafluorofosfato
HEPES	Acido N-(2-idrossietil)-piperazin-N'-2-etansulfonico
HOBt	1-idrossibenzotriazolo
HPNPP	p-nitrofenil-2-idrossipropil fosfato
MAP	Multiple Antigenic Peptide
Mmt	4-metossitritile
NMM	N-metil morfolina
NMP	N-metilpirrolidone
NP	Nanoparticelle
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildiidrobenzofuran-5-sulfonile
Pmc	2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonile
PNP	p-nitro-fenolo
PNPB	p-nitrofenil-butirrato
PS	polistirene

PyBOP	(Benzotriazol-1-ilossi)tripirrolidinofosfonio esafluorofosfato
RAM	Rink-amide linker
SAM	Self Assembly Monolayer
SPPS	Solid Phase Synthesis
Tacn	Triazaciclononano
TAS-F	tris(dimetilammino)solfuro di trimetilsilildifluoruro
TBAF	Tetrabuttilammonio fluoruro
TEA	triethylammina
TEG	triethylenglicole
Teoc	(trimetilsilil)-etossicarbonile
TFA	Acido trifluoroacetico
THF	Tetraidrofurano
TOABr	Tetraottillammonio bromuro
Tren	Tris(2-etilammino)ammina
Trt	tritile
Z	Benzil-ossicarbonile

A-4 RIASSUNTO

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Chimiche
Scuola di Dottorato in Scienze Molecolari

Sistemi multivalenti e cooperativi per la catalisi biomimetica

Dottorando: Giovanni Zaupa

Supervisore: Dott. Leonard J. Prins

Coordinatore: Prof. Maurizio Casarin

I processi altamente efficienti di riconoscimento molecolare e di catalisi osservati in natura hanno origine da interazioni cooperative tra gruppi funzionali. Entrambi i processi di riconoscimento e catalisi si fondano su due proprietà chiave:

- *Multivalenza*. La presenza di molteplici gruppi funzionali aumenta l'affinità del binding tra due strutture, originandosi dall'unione di numerose interazioni deboli. Una cooperatività simile è generalmente osservata nel sito catalitico degli enzimi, dove differenti funzionalità agiscono simultaneamente sul substrato.
- *Diversità di gruppi funzionali*. Intrinsecamente le proteine sono strutture eterofunzionali che comprendono un'ampia varietà di gruppi funzionali per il riconoscimento e la conversione del substrato.

Basandosi su questi concetti, questo progetto di ricerca si propone di sviluppare sistemi multivalenti artificiali che mostrino una catalisi di tipo enzimatico, caratterizzate da un andamento a saturazione [1].

La prima parte della ricerca è stata quindi dedicata allo studio di una metodologia sintetica per la funzionalizzazione su fase solida di scaffold molecolari e di dendrimeri di bassa generazione. In particolare è stato sviluppato un protocollo sintetico per la funzionalizzazione simmetrica di poliammine (come quelle in figura 1). Le poliammine sono state legate ad un residuo di lisina attaccato su una resina Cl-tritile tramite la sua catena laterale.

In seguito la simmetria del sistema è stata ristabilita legando lisine ai gruppi amminici non reagiti della poliammina. Grazie ad una scelta appropriata di gruppi protettori ortogonali, l'ammina in α può venire in seguito funzionalizzata e, dopo il distacco dalla resina, i prodotti desiderati sono stati ottenuti con buona resa e purezza. La procedura è applicabile a scaffold con tre o quattro ammine (schema 1) [2].

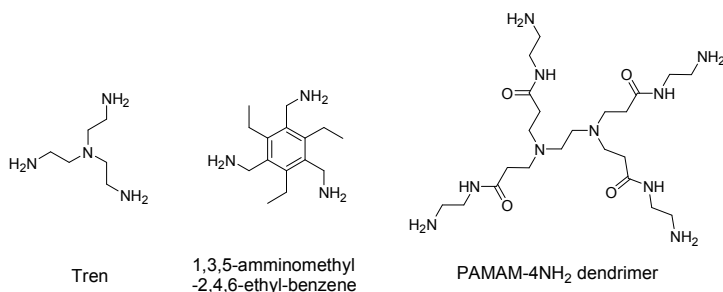
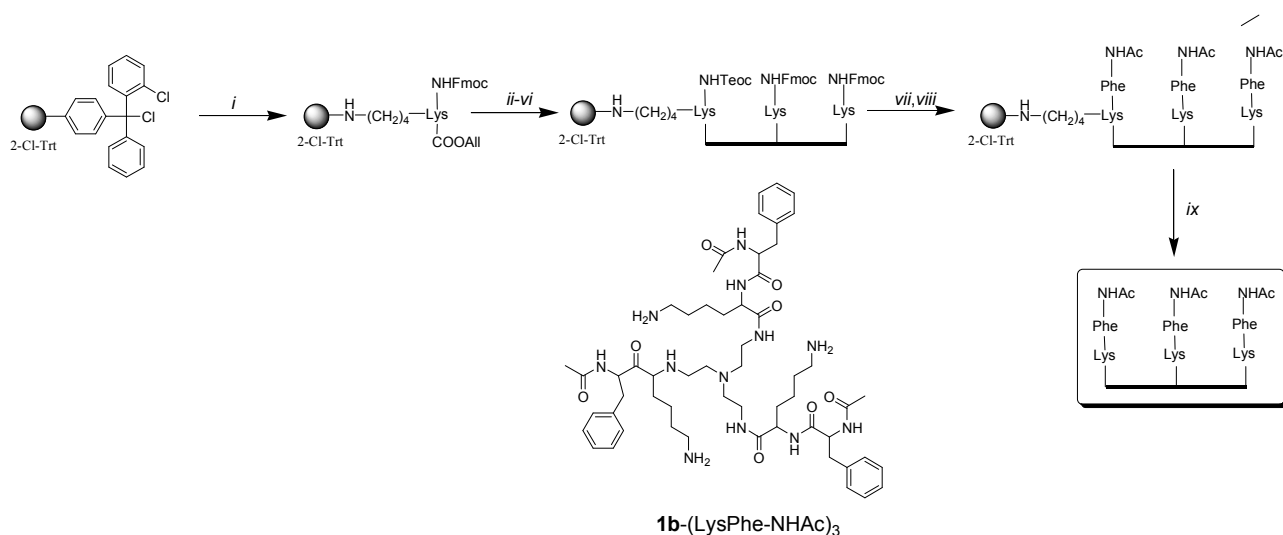


Figura 1 Poliammine utilizzate



Schema 1 Sintesi del composto **1b-(LysPhe-NHAc)₃** su resina 2-Cl-tritile; *i*) Fmoc-Lys-OAll.TFA, DIPEA, CH₂Cl₂; *ii*) piperidina 20% in DMF; *iii*) Teoc-ONp, DIPEA, CH₂Cl₂, 50%; *iv*) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, CH₂Cl₂; *v*) Tren, PyBOP, NMM, DMF/CH₂Cl₂; *vi*) Fmoc-Lys(Boc)-OH, PyBOP, NMM, DMF/CH₂Cl₂; *vii*) TBAF, DCM, 50 °C; *viii*) N-Ac-Phe-OH, HBTU, HOBT, NMM, DMF/CH₂Cl₂; *ix*) TFA, CH₂Cl₂, iPrSiH, H₂O.

Successivamente sono state studiate strutture multivalenti che potessero agire come catalizzatori biomimetici cooperativi per la scissione di fosfodiesteri. Spesso le fosfatasi implicate nell'idrolisi di DNA e RNA sono metalloenzimi, che contengono più di uno ione metallico nel loro sito attivo (solitamente Zn²⁺). Ricerche precedenti del nostro gruppo avevano dimostrato che un'attività catalitica nei metalloenzimi artificiali ha origine quando due complessi metallici di zinco o rame sono posti in prossimità tra loro su di uno scaffold molecolare.

A questo scopo, sono state sintetizzate strutture dendrimeriche a base di lisina funzionalizzate alla periferia con triazaciclononano, (TACN) una poliammina ciclica capace di complessare Zn(II) con

elevata affinità. Quindi è stata studiata la loro attività catalitica al variare della valenza della struttura multivalente, per la reazione di scissione dell'HPNPP, un substrato modello dell'RNA (figura 2).

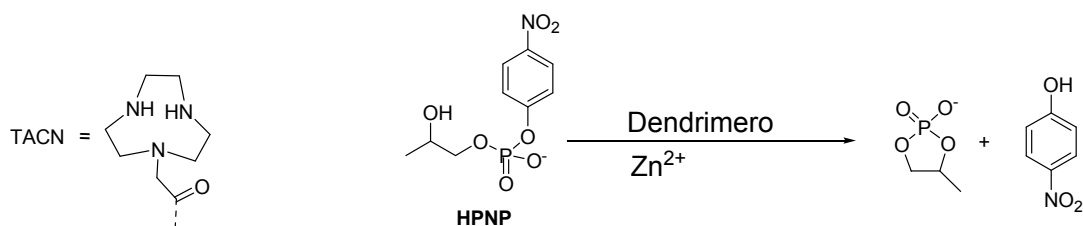


Figura 2

Inizialmente sono state studiate delle strutture dendritiche legate ad un supporto solido, ottenute per derivatizzazione con TACN di polilisine su resina Tentagel MAP-4 e MAP-8. I catalizzatori eterogenei hanno dimostrato buona attività, e misurando l'andamento di saturazione sono stati ottenuti i parametri di Michaelis-Menten. Raddoppiando la valenza del dendrimer, non si ha variazione della costante catalitica k_{cat} , ma si aumenta l'affinità del binding (K_M diminuisce), il che causa un aumento dell'efficacia catalitica per il dendrimer MAP-8.

L'efficienza catalitica è limitata dalla diffusione lenta del substrato e dei prodotti tra la soluzione e la resina, per cui bisogna considerare i parametri catalitici condizionati dalla cinetica del trasferimento di fase e dall'assorbimento del p-nitrofenolo da parte della resina.

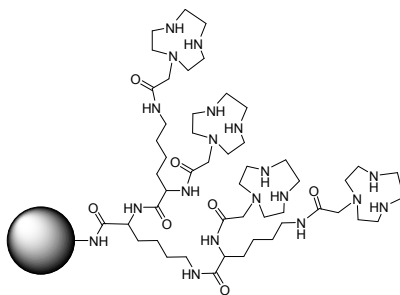
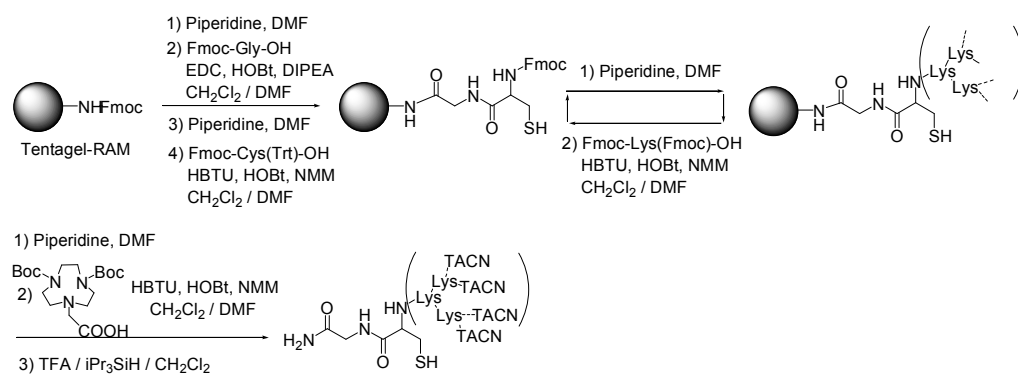


Figure 3 Resina MAP-4 Tentagel derivatizzata con TACN

Di conseguenza l'attenzione è stata rivolta a sistemi omogenei. Utilizzando la sintesi su fase solida è stata sintetizzata una serie di dendroni a base di polilisina, terminanti con 2, 4, 8, 16 gruppi TACN (schema 2). Per dimerizzazione dei dendroni sono stati ottenuti i corrispondenti dendrimeri a valenza 4, 8, 16, 32, sfruttando la formazione di un ponte disolfuro tra i residui di cisteina del linker (figura 4).



Schema 2 Sintesi su fase solida di dendroni di poli-lisina con TACN

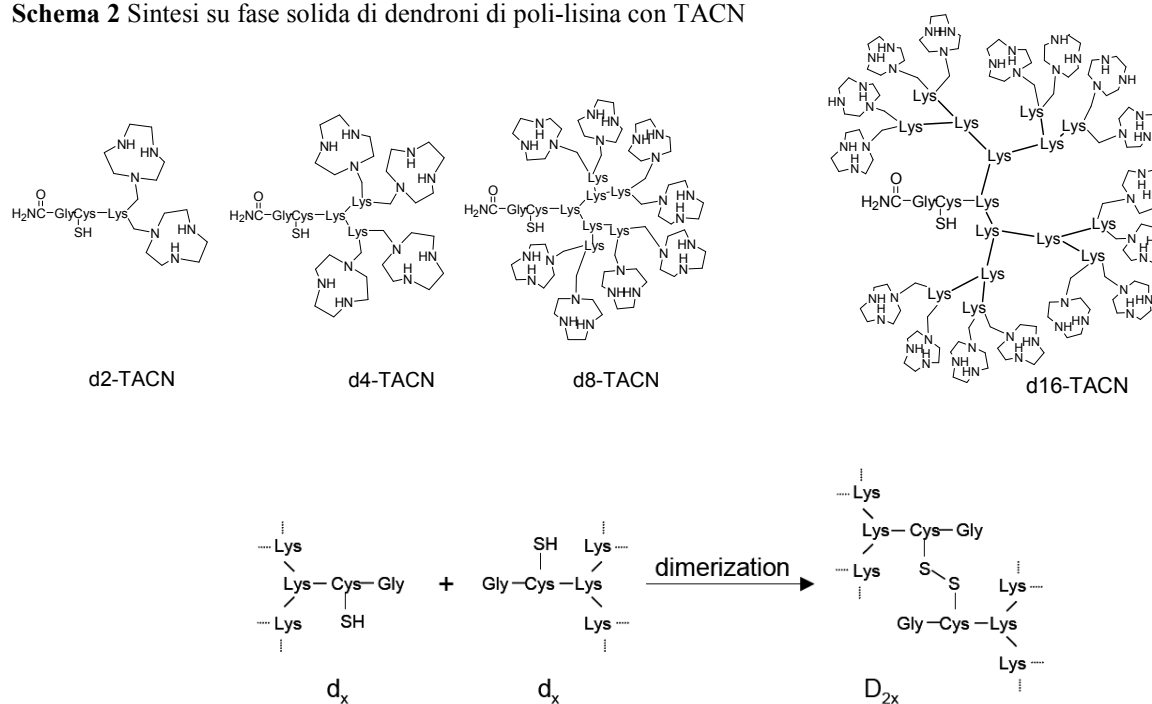


Figura 4 Dendroni a base di poli-lisina con TACN sintetizzati, e dimerizzazione per ottenere i dendrimeri.

La misura della velocità iniziale variando la concentrazione di HPNPP ha fornito il grafico di Michaelis-Menten, dal quale sono stati ricavati i parametri catalitici k_{cat} e K_M per ciascun catalizzatore. L'efficienza catalitica ($k_{cat,den}/K_M$) mostra un aumento non lineare nei confronti della valenza, evidenziando un effetto dendrimerico positivo, simile a quanto osservato precedentemente in altri sistemi dendrimerici (figura 5).

Un'analisi di questi parametri fornisce una spiegazione all'effetto dendrimerico. Esso ha origine da una diminuzione di K_M (una maggiore affinità) piuttosto che da un aumento dell'attività del sito catalitico (k_{cat}) (figura 6). Nei nostri dendrimeri dividendo la costante di velocità $k_{cat,den}$ per il numero di unità catalitiche si vede che l'attività del singolo sito catalitico raggiunge un massimo e in seguito diminuisce per i dendrimeri più grandi.

Al contrario il valore di K_M diminuisce in modo continuo all'aumento della valenza.

Modelli teorici dimostrano che l'origine della maggiore affinità è di tipo statistico: il clustering delle unità catalitiche in un sistema multivalente causa un aumento della concentrazione apparente di siti attivi, portando ad una costante di binding "apparente" per il substrato più elevata (minore K_M).

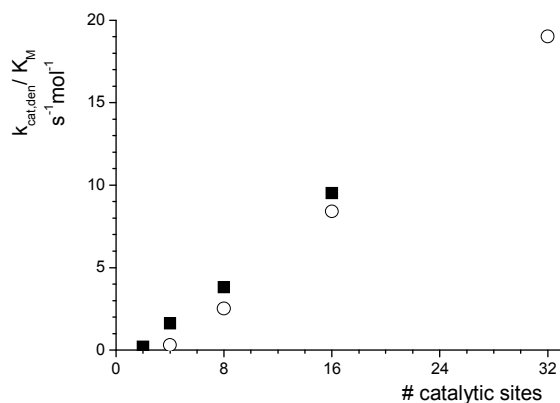
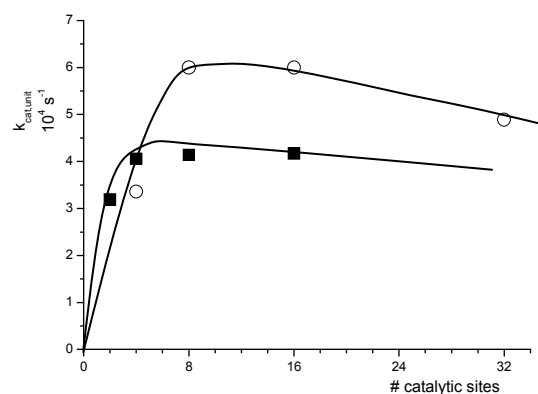


Figura 5 Grafico dell'efficienza catalitica (k_{cat} / K_M) vs. la valenza del catalizzatore (○ dendrimeri, ■ dendroni).

a)



b)

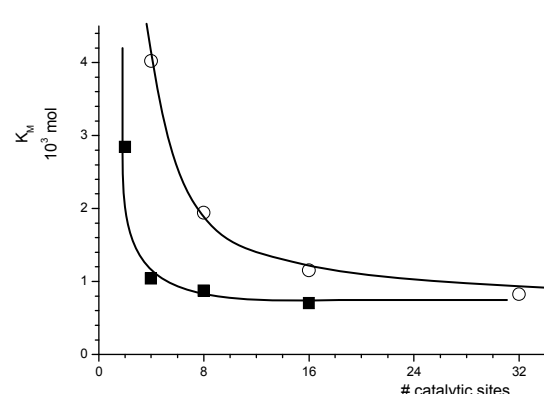


Figura 6 Grafico di $k_{cat,unit}$ (a) e K_M (b) vs. la valenza del catalizzatore (○ dendrimeri, ■ dendroni).

E' stato sviluppato un modello teorico di un catalizzatore multivalente, e l'andamento dei parametri ottenuti da simulazioni numeriche è risultato in accordo con i dati sperimentali. Basandosi sulle analisi si è dedotto che l'effetto dendrimerico è una conseguenza intrinseca del clustering di unità catalitiche in una struttura multivalente, nel caso il meccanismo della reazione coinvolga due o più unità catalitiche [3].

In seguito abbiamo sintetizzato una piccola libreria combinatoriale di dendrimeri eterofunzionalizzati, derivatizzando dendrimeri con 8 gruppi terminali con miscele 50-50 di TACN e una serie di 9 differenti amminoacidi. La sintesi su fase solida si è dimostrata molto adatta ad uno studio in parallelo, essendo una tecnica semplice e tollerante verso un'ampia gamma di gruppi

funzionali. Uno screening catalitico ha rivelato un'attività significativamente maggiore per le combinazioni di TACN con arginina e omoarginina (figura 7).

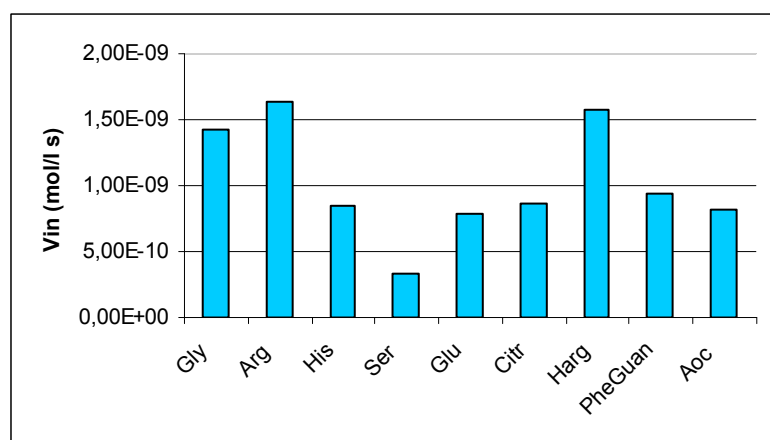


Figura 7: Screening dei dendrimeri eterofunzionali TACN/A.a. nell'idrolisi di HPNPP.

Infine sono stati sintetizzati una serie di dendrimeri funzionalizzati con differenti rapporti tra TACN e glicina, per studiare la correlazione tra l'attività catalitica e la percentuale di derivatizzazione con TACN. Il risultato è stato un incremento non lineare in attività all'aumento della percentuale di TACN (figura 8). Questo è il risultato atteso per una distribuzione statistica dei gruppi TACN, poiché il numero di siti catalitici bimetallici aumenta in modo non lineare.

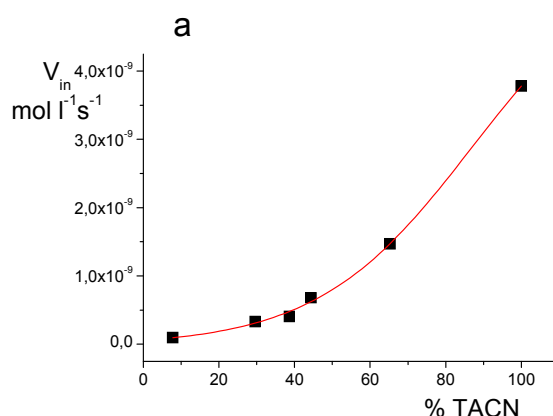


Figura 8 Velocità iniziale di idrolisi dell'HPNPP al variare della % di TACN in dendrimeri misti TACN-Gly

Strutture interessanti per ottenere catalizzatori biomimetici sono le nanoparticelle metalliche ricoperte con un monolayer organico. In particolare i nanocluster d'oro possono essere ricoperti con un processo di self-assembly da tioli funzionalizzati. E' stata quindi preparata una serie di nanoparticelle d'oro funzionalizzate con miscele di tioli, allo scopo di studiare l'attività catalitica in funzione della ricopertura superficiale con unità catalitiche (TACN).

In particolare si era interessati a comprendere attraverso questi studi se i differenti tioli sulla superficie fossero organizzati in maniera statistica o strutturati in domini.

Usando una procedura sintetica sviluppata dal nostro gruppo [4] cluster d'oro di circa 1.2 nm sono stati ottenuti e in seguito passivati con miscele di un tiolo con TACN e di un tiolo con TEG in vari rapporti (da 100:0 a 5:95). Le nanoparticelle ottenute sono solubili in acqua, e il rapporto superficiale tra i tioli, calcolato dagli spettri NMR, corrisponde al rapporto usato per la passivazione. Le nanoparticelle sono state analizzate mediante NMR a gradiente di campo, microscopia TEM, termogravimetria e titolazioni UV-VIS.

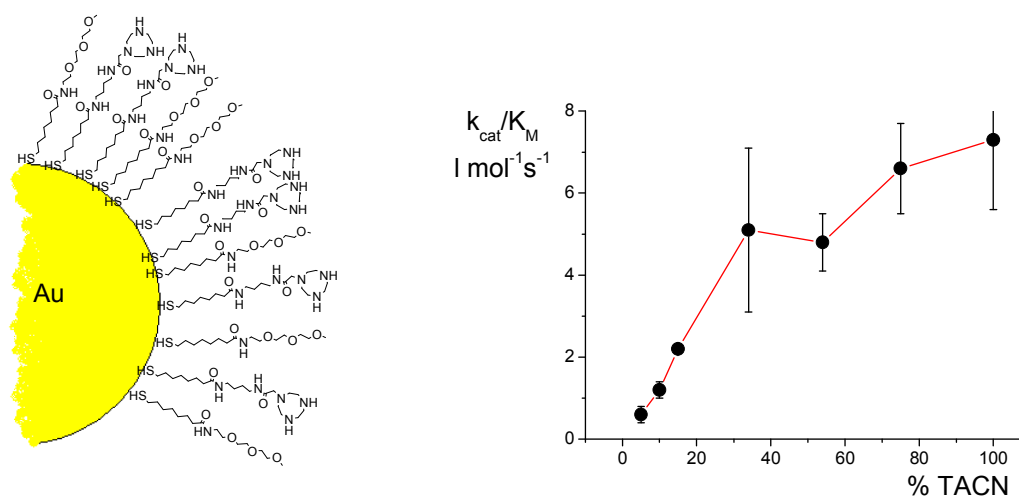


Figura 9 Nanoparticelle miste ricoperte da tioli, e grafico dell'efficienza catalitica vs % di TACN nel monolayer.

Gli studi catalitici sono stati effettuati nelle stesse condizioni dei dendrimeri, usando HPNPP come substrato, e si sono ottenuti i parametri di Michaelis-Menten dalle curve di saturazione. Le nanoparticelle risultano catalizzatori molto efficaci, fino a 100 volte migliori rispetto ai dendrimeri alla stessa concentrazione di TACN. Inoltre a differenza dei dendrimeri risultano attive anche a basse percentuali di TACN, e il massimo di attività è già raggiunto per una copertura del 40 % di TACN. Una concentrazione superficiale maggiore di complesso metallico non migliora l'attività del catalizzatore (figura 9). Questo potrebbe derivare da una separazione dei differenti tioli in domini sulla superficie, ma potrebbe essere anche spiegato da un effetto del layer organico o da un comportamento di tipo micellare; per avere maggiori evidenze saranno necessari ulteriori esperimenti e simulazioni.

- 1) Guarise, C.; Manea, F.; Zaupa, G.; Pasquato, L.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 174-183.
- 2) Guarise, C.; Zaupa, G.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *20*, 3559-3568.
- 3) Zaupa, G.; Scrimin, P.; Prins, L.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5699-5709.
- 4) Manea, F.; Bindoli, C.; Polizzi, S.; Lay, L.; Scrimin, P. *Langmuir*, **2008**, *24*, 4120-4124.

A-5 SUMMARY

Università degli Studi di Padova
Department of Chemical Science
Doctorate School on Molecular Science

Multivalent and cooperative systems for biomimetic catalysis

Ph.D. Student: Giovanni Zaupa

Supervisor: Dr. Leonard J. Prins

Coordinator: Prof. Maurizio Casarin

The exceptionally efficient molecular recognition and catalysis events observed in Nature results from a highly cooperative interplay between functional groups. Both the processes of recognition and catalysis rely on two key issues:

- *Multivalency*. The presence of multiple functional groups enhances the binding affinity between two entities because it allows for the development of multiple weak interactions. A similar cooperativity is generally observed in the catalytic site of enzymes where different functional groups cooperatively act on a substrate.
- *Functional group diversity*. Intrinsically, proteins are heterofunctional structures exploiting a wide variety of functional groups for substrate recognition and conversion.

Based on these concepts, this research project aims at developing artificial multivalent systems that display enzyme-like catalysis, *i.e.* characterized by saturation behaviour. [1].

The first part of the research has been dedicated to the study of synthetic methodologies for the functionalization of molecular scaffolds and low generation dendrimers on solid support. In particular we have developed a synthetic protocol for the symmetrical functionalization of poly-amine structures (like the scaffolds in figure 1) The poly-amines were attached to Lys-residue anchored on a Cl-trityl resin via its side chain. Next, the symmetry of the scaffold was restored by coupling Lys-residues to the unreacted amino-groups of the scaffold. With a right choice of orthogonal protecting groups the α -amino groups could be further functionalized and, after the

cleavage, the desired products were obtained with good yield and purity. The procedure is applicable to scaffolds with three or four amines (scheme 1) [2].

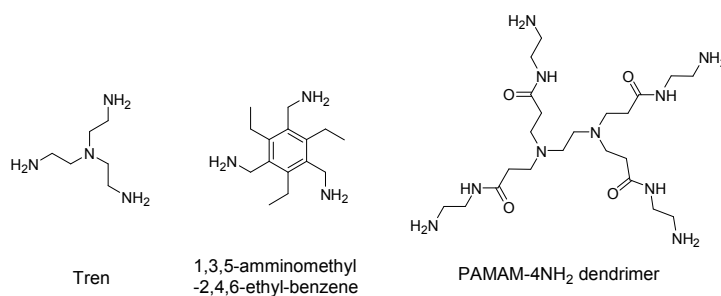
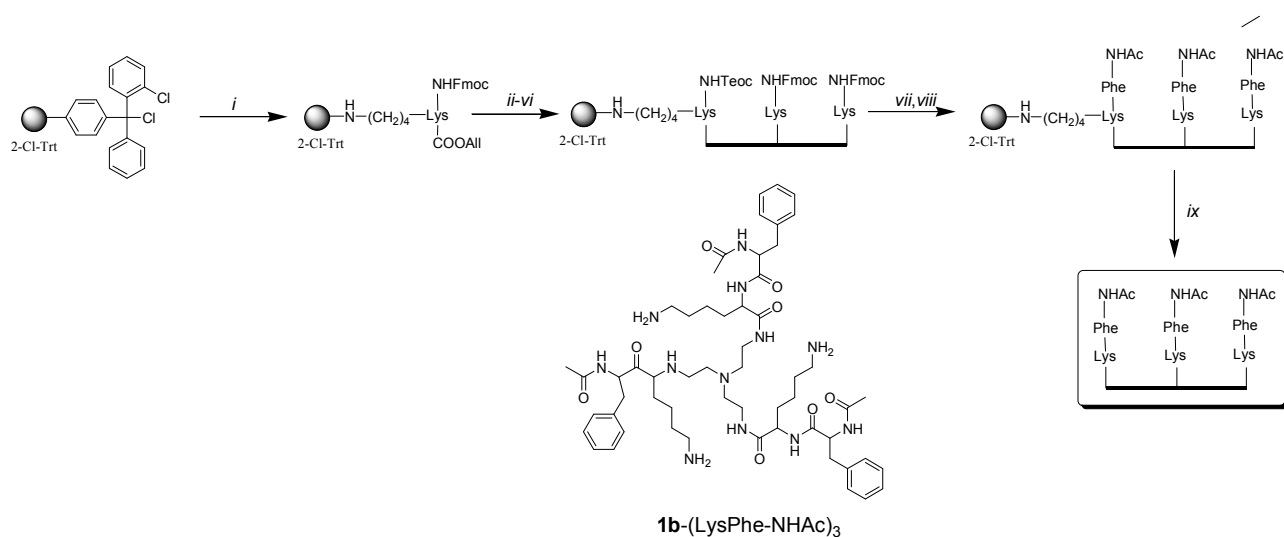


Figure 1: polyammino scaffolds



Scheme 1. Synthesis of compound **1b**-(LysPhe-NHAc)₃ on 2-Cl-tritylresin; *i*) Fmoc-Lys-OAll.TFA, DIPEA, CH₂Cl₂; *ii*) piperidine 20% in DMF; *iii*) Teoc-ONp, DIPEA, CH₂Cl₂, 50%; *iv*) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, CH₂Cl₂; *v*) Tren, PyBOP, NMM, DMF/CH₂Cl₂; *vi*) Fmoc-Lys(Boc)-OH, PyBOP, NMM, DMF/CH₂Cl₂; *vii*) TBAF, DCM, 50 °C; *viii*) N-Ac-Phe-OH, HBTU, HOBT, NMM, DMF/CH₂Cl₂; *ix*) TFA, CH₂Cl₂, iPrSiH, H₂O.

Subsequently, we have prepared multivalent structures that can act as biomimetic catalysts for the cooperative cleavage of phosphodiester. Frequently, phosphatases involved in the cleavage of DNA or RNA are metalloenzymes, containing multiple metal ions in their active site (often Zn^{II}). Earlier studies in our group have shown that catalytic activity is observed in artificial metalloenzymes in case two metal complexes of zinc or copper are brought in close proximity on a molecular scaffold.

For this purpose, we have synthesized lysine-based dendrimeric structures functionalized at the periphery with a triazacyclononane (TACN) moiety, which is a cyclic polyamine capable of complexing Zn(II) ions with high affinity. Next, we have studied their catalytic activity as a function of the valency of the multivalent structure in the cleavage of HPNPP, a RNA-model substrate (figure 2).

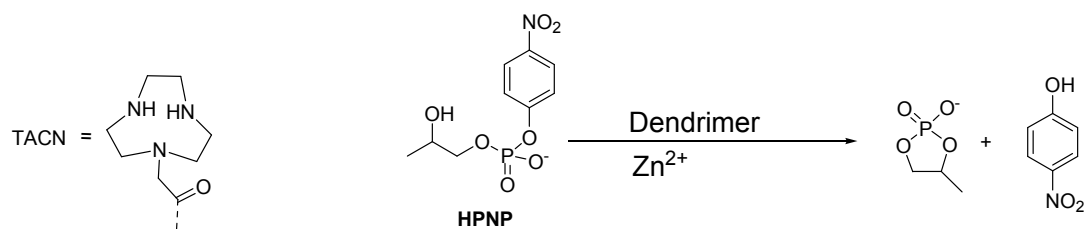


Figure 2

We have first studied dendritic structures bound to a solid support, obtained by the derivatization of poly-lysine MAP-4 and MAP-8 Tentagel beads with TACN. The heterogeneous catalysts have showed good activities, and the Michaelis-Menten parameters were obtained by measuring the saturation behaviour. Doubling the valency of the dendrimer, does not affect the catalytic constant k_{cat} , but results in an increased binding affinity (K_M decreases), which is the origin of the increase of the catalytic efficacy of the MAP-8 dendrimer. The catalytic efficiency is limited by the slow diffusion of the substrate and the products between the solution and the resin beads, so we have to consider that our catalytic parameters are affected by the phase transfer kinetics and the absorption of p-nitrophenol by the beads.

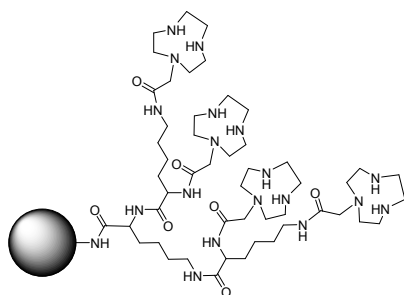
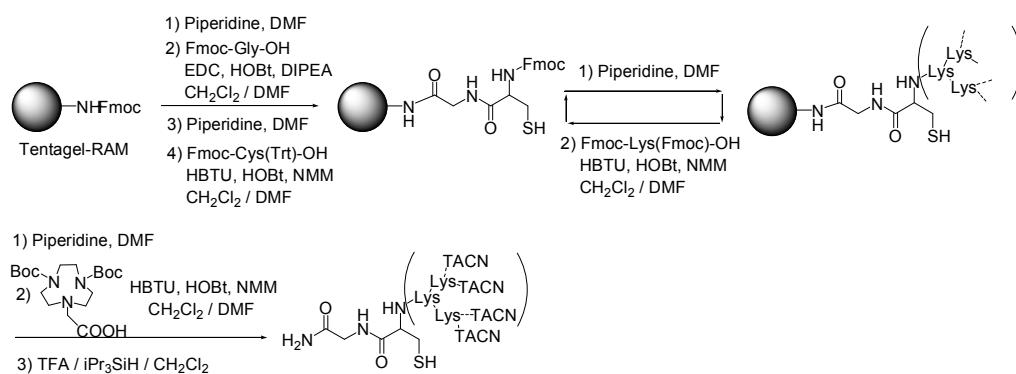


Figure 3: MAP-4 Tentagel resin derivatized with TACN

Therefore we turned our attention to homogeneous systems. Using solid-phase synthesis, a series of poly-lysine dendrons terminated with 2, 4, 8, or 16 TACN moieties were prepared (scheme 2). The corresponding dendrimers with valency 4, 8, 16, 32 were obtained by the dimerization of the dendrons, via the formation of a disulfide bridge between cysteine residues in the linker (figure 4).



Scheme 2: Solid phase synthesis of poly-lysine dendrons with TACN

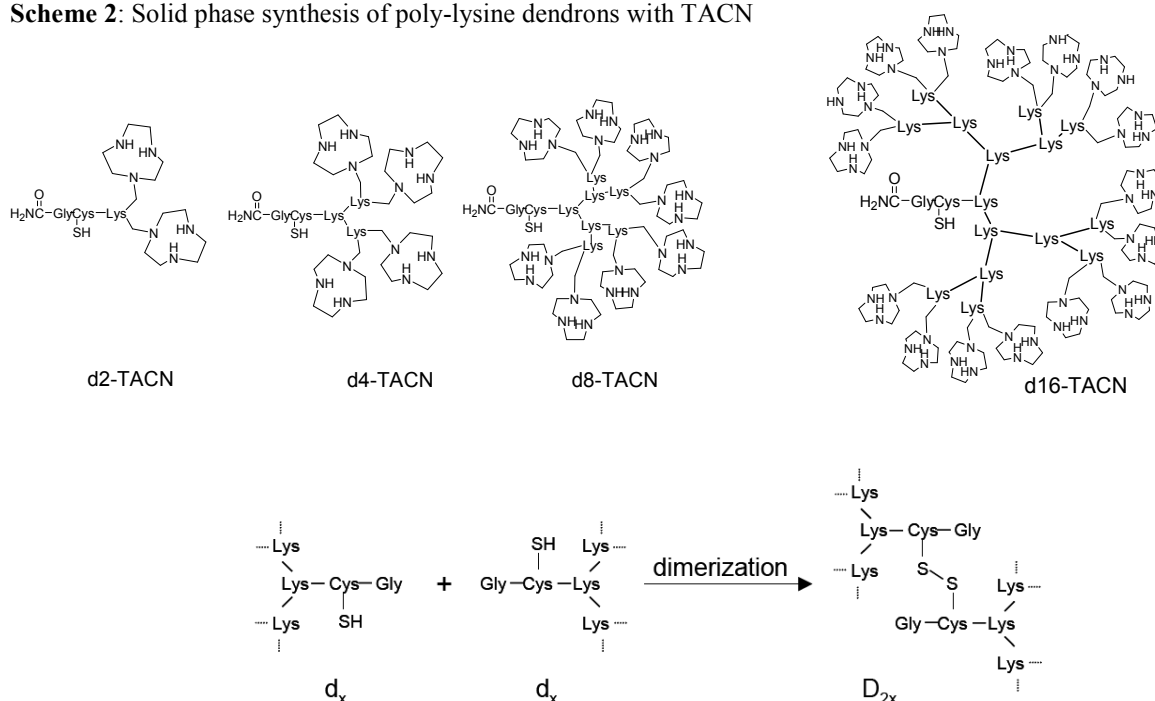


Figure 4: poly-lysine dendrons with TACN synthesized, and dimerization to the dendrimers.

Measurement of the initial rate varying the HPNPP concentration gave a Michaelis-Menten plot from which the parameters k_{cat} and K_M were obtained for each multivalent catalyst. The catalytic efficiency ($k_{\text{cat,den}}/K_M$) against valency shows a non-linear increase, indicating a positive dendritic effect, similar as observed previously for other multivalent dendrimers (figure 5). A theoretical analysis of these parameters gave an explanation for the dendritic effect. It appears to originate from a decrease in K_M (higher binding affinity) rather than an increase of the activity of the catalytic site (k_{cat}) (figure 6). In our dendrimers the division of the rate constants $k_{\text{cat,den}}$ by the number of catalytic units, shows that the activity of the individual catalytic site reaches a maximum and, in fact, decreases for the larger dendrimers. On the contrary, the K_M value shows a continuous decrease upon increasing the valency. Theoretical models show that the origin of the increased binding affinity is statistical. The clustering of catalytic units in a multivalent system causes an

increase of the apparent concentration of active sites, resulting in a stronger “apparent” substrate binding constant (lower K_M).

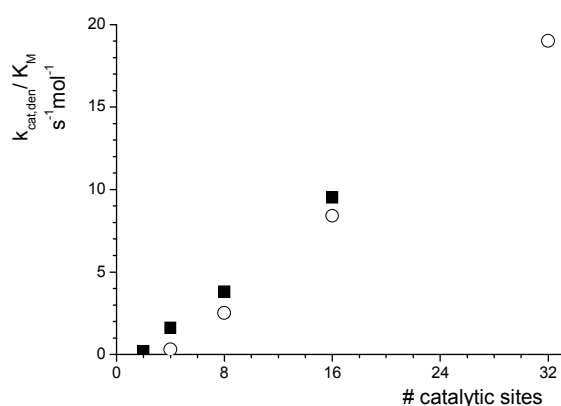


Figure 5: Plot of catalytic efficiency (k_{cat} / K_M) vs. catalyst valency (○ dendrimers, ■ dendrons).

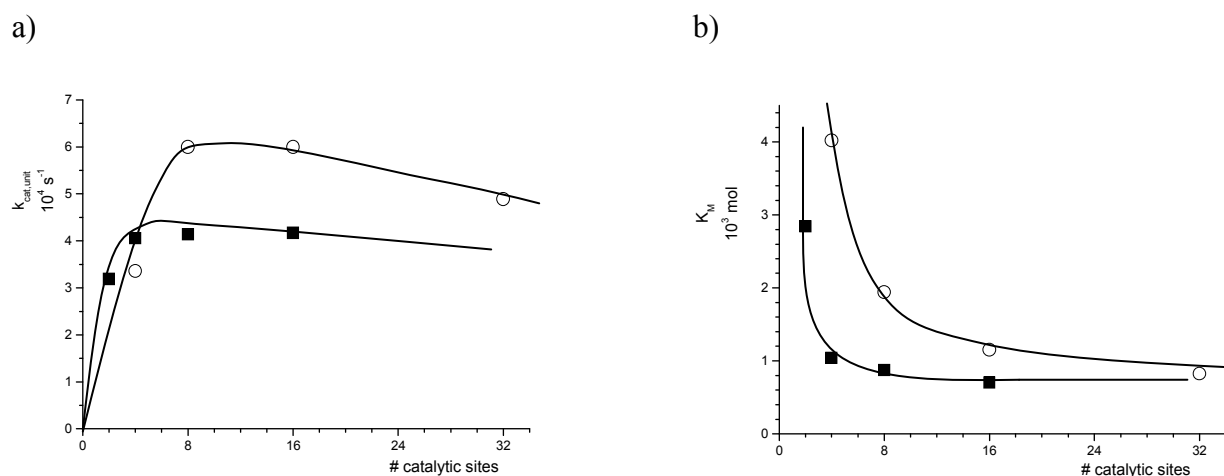


Figure 6: Plot of $k_{cat,unit}$ (a) e K_M (b) vs. catalyst valency (○ dendrimers, ■ dendrons).

A theoretical model of a multivalent cooperative catalyst was developed and the trend of the parameters obtained from numerical simulations was in agreement with the experimental data. Based on this analysis, we deduced that the dendritic effect is an intrinsic consequence of clustering catalytic units in a multivalent structure, in case the catalytic pathway involves two or more catalytic units [3].

Subsequently, we have synthesized a small combinatorial library of heterofunctionalized dendrimers, by the derivatization of dendrimers with 8 endgroups with 50-50 mixture of TACN and a series of 10 different aminoacids. The solid-phase synthesis has proven very useful for the parallel study, being a simple technique tolerant towards different functional groups. A screen of the catalytic activity revealed an significantly higher catalytic activity of the combinations of TACN with arginine and homoarginine. (Figure 7)

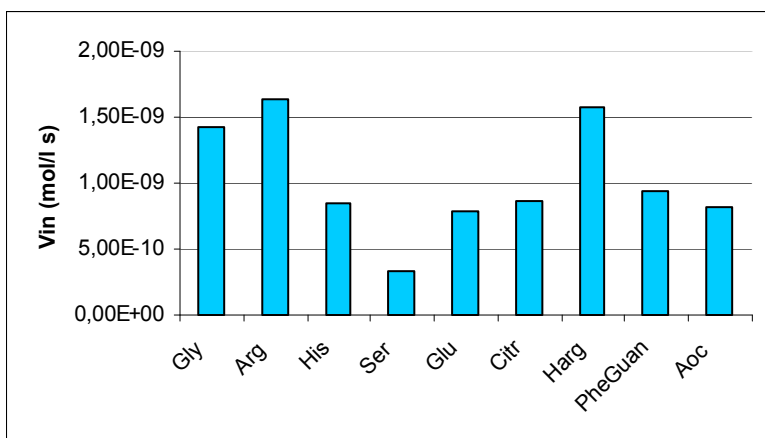


Figure 7: Screening of the heterofunctional TACN/A.a. dendrimers for HPNPP hydrolysis

Finally, a series of dendrimers functionalized with different ratios of TACN and glycine were prepared in order to study the correlation between the catalytic activity and the percentage of surface covering with TACN. The result is a non linear increase in activity as the ratio of TACN increase (figure 8). This is the result expected for a statistical distribution of the TACN groups, because number of bimetallic cooperative catalytic sites grows in non linear manner.

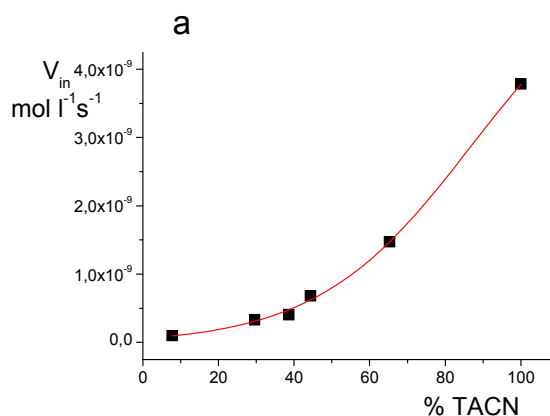


Figure 8: Initial rate of hydrolysis of HPNPP at the variation of TACN ratio in mixed TACN-Gly dendrimers

Others interesting multivalent structures for the preparation of biomimetic catalysts are metal nanoparticles covered with an organic monolayer. In particular, gold nanoclusters can be covered via a self-assembly process by functionalized thiols. We have prepared a series of gold nanoparticles functionalized with mixed thiols with the aim of exploring their catalytic activity as a function of the surface coverage with catalytic units (TACN). In particular, we were interested whether these studies would reveal whether the different thiols on the gold surface were organized in a statistical manner or structured in domains.

Using a synthetic procedure developed earlier by the Scrimin group [4] gold cluster of about 1.2 nm were obtained and passivated with mixtures of a TACN-thiol and a TEG-thiol in various ratios (ranging from 100:0 to 5:95). The obtained nanoparticles are water soluble, and the surface ratio of thiols, calculated from the NMR spectra, corresponded to the ratio used for passivation. The nanoparticles are characterized by field-gradient NMR, TEM microscopy, thermogravimetry and UV-VIS titration.

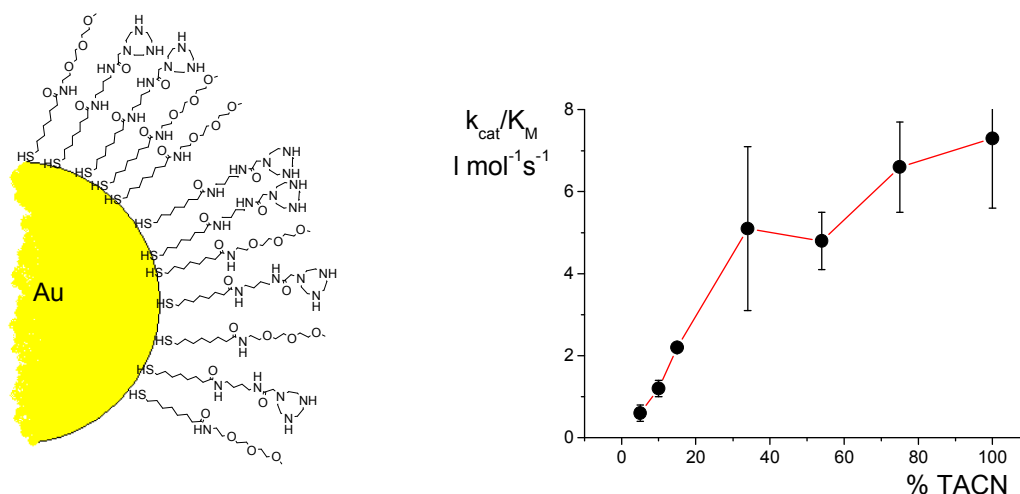


Figure 9: Mixed thiol covered gold nanoparticle, and plot of the catalytic efficiency vs % of TACN in the monolayer

Catalytic tests were performed in the same conditions as for the dendrimers using HPNPP as a substrate and the Michaelis-Menten parameters were obtained from the saturation curves. The nanoparticles resulted very efficient catalysts, up to 100 times better than the corresponding dendrimers at the same nominal concentration of TACN. However, unlike the dendrimers, they result already active at low percentages of TACN, and, moreover, a maximum activity is already reached at a surface coverage of 40 % (TACN). A further increase in surface concentration does not alter the catalytic performance (figure 9). This could originate from a separation of the different thiols in domains on the surface, but may also be explained by an effect of the organic layer, or by a micellar-like behaviour; further experiments and simulations are needed to provide conclusive evidence.

- 1) Guarise, C.; Manea, F.; Zaupa, G.; Pasquato, L.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 174-183.
- 2) Guarise, C.; Zaupa, G.; Prins, L.J.; Scrimin, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *20*, 3559-3568.
- 3) Zaupa, G.; Scrimin, P.; Prins, L.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5699-5709.
- 4) Manea, F.; Bindoli, C.; Polizzi, S.; Lay, L.; Scrimin, P. *Langmuir*, **2008**, *24*, 4120-4124.

Alla fine di questi tre anni desidero ricordare brevemente le persone che hanno contribuito a rendere questo periodo proficuo, piacevole e formativo.

In primo luogo desidero ringraziare il prof. Scrimin, che ha seguito con la sua esperienza e competenza il lavoro, e il dott. Leonard Prins, che giorno dopo giorno ha trasmesso la sua passione per la ricerca, sostenendomi con entusiasmo, sia quando abbiamo avuto soddisfazioni, sia quando le cose non sono andate come volevamo.

Ritengo poi doveroso menzionare il prof. Casarin per il coordinamento della Scuola di Dottorato, che si è dimostrata un'opportunità di formazione di alto livello, e i membri della commissione, i prof. Rizzi, Peggion e Dolmella, per aver seguito con interesse il mio percorso.

Desidero quindi ringraziare la prof.ssa Licini, e tutti i professori e ricercatori con cui ho potuto interagire e avere consigli, inoltre un particolare grazie va alla prof.ssa H. Wennemers dell'Università di Basilea, per avermi ospitato nei suoi laboratori per un interessante periodo di visita.

Riguardo a quanto presentato in questa tesi un ringraziamento ed un elogio particolare va alla dott.ssa Claudia Mora, per la parte sulle nanoparticelle, oggetto della sua tesi di laurea, per la quantità e la qualità del lavoro svolto.

Desidero inoltre ringraziare il Prof. Polizzi per le misure TEM, il dott. Causin per la parte di TGA, e il personale tecnico del dipartimento per l'aiuto fornito.

Alla fine (ma solo su questo foglio) vorrei ricordare tutti coloro con i quali ho condiviso le giornate in laboratorio e i ragazzi dell'ITM, con un grazie per i momenti piacevoli trascorsi assieme. Non vi cito, per non dimenticare nessuno, ma una menzione se la merita Giulio per avermi sopportato per tutti questi anni.